

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA & DIP/GENÉTICA & BIOTECNOLOGIA

Cristiane dos Santos

**Identificação de proteínas e validação de genes envolvidos na resistência de
Brassica oleracea a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

TESE DE DOUTORADO

**Juiz de Fora
2019**

CRISTIANE DOS SANTOS

**Identificação de proteínas e validação de genes envolvidos na resistência de
Brassica oleracea a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial a obtenção do grau de Doutora em Genética e Biotecnologia: Proteômica, interação planta-patógeno.

Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco
Co-orientadora: Dra. Angela Mehta

**Juiz de Fora
2019**

DEDICATÓRIA

*Aos meus companheiros de jornada
dedico.*

AGRADECIMENTOS

“A gratidão é um bálsamo para aqueles que desejam viver dias melhores. Assim, aprender a ser grato pode lhe proporcionar uma vida com mais harmonia, simplicidade e júbilo.” (Évilin Santos e Fábio Lemos).

Agradeço a Deus quem me deu saúde e sustento nessa caminhada e acredito que *“Jamais verei a mão de Deus em tudo o que me acontece, sem atribuir nada à pessoa alguma [...]”*, por isso, agradeço a todos que participaram da minha formação, principalmente os que estiveram diretamente envolvidos:

Dedico aos meus sobrinhos queridos, Kássio meu companheirinho. À minha igreja (IBMNA) pelo apoio e orações.

À Dra. Angela Mehta, por prover recursos necessários para o desenvolvimento do trabalho em seu laboratório, pela orientação e apoio desde o Mestrado. Aos meus colegas do Laboratório de Genômica e Proteômica-LGP - Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia. Ao Dr. Octávio Luiz Franco por me integrar à equipe.

A todos os meus professores, foram eles que contribuíram diretamente por minhas conquistas acadêmicas (essa é a prova de que fui bem “doutrinada”). Aos meus amigos, especialmente a Catarina e Fabiana, amo vocês.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biotecnologia da UFJF, especialmente ao professor Marcelo Santos.

Ao departamento de Bioquímica da Universidade de Córdoba (UC)-Espanha liderado pelo Dr. Jesús Valentin Jorrín-Novo, o qual me recebeu muito bem em seu laboratório, para realizar as atividades durante o Doutorado Sanduíche. Às minhas queridas italianas, Bárbara, Ilari e Sabina.

À colaboração do Dr. Fábio Nogueira e Dr. Gilberto Domont do Laboratório de Química de Proteínas - Unidade Proteômica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); à colaboração do Dr. Wagner Fontes do Laboratório de Química de Bioquímica e Proteínas da Universidade de Brasília (UnB) e aos colaboradores do Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga, LIMPP, Embrapa.

À EMBRAPA (pela estrutura para desenvolvimento das atividades de laboratório); CAPES; CNPq e FAPDF, pelo investimento financeiro.

“Ciência e vida não podem nem devem ser separadas. Ciência, para mim, dá uma explicação parcial da vida. É baseada em fatos, na experiência e em experimentos. Suas teorias são aquelas que você e muitas outras pessoas acham mais fácil e mais agradável de acreditar, mas, até onde eu posso ver, não têm nenhum outro fundamento que não levam a uma visão agradável da vida [...]. Concordo que a fé é essencial para o sucesso na vida [...]. Em minha opinião, tudo que é necessário para a fé é a crença de que, ao fazer o nosso melhor vamos chegar mais perto do sucesso e que o sucesso em nossos objetivos... vale apenas alcançar [...].”

(Rosalind Elsie Franklin)

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.”

(Marie Curie)

RESUMO

A determinação da função gênica, visando a confirmação do envolvimento de genes em determinada condição biológica, ainda é um desafio da era pós-genômica, sendo que a análise proteômica se mostra uma técnica poderosa para essa finalidade. O enriquecimento de organelas também pode contribuir para a identificação de proteínas menos abundantes na análise de amostras complexas de plantas. No presente estudo, folhas jovens de *Brassica oleracea* var. *capitata* (repolho) de cultivares moderadamente resistente (Astrus Plus) e suscetível (Veloce) foram infiltradas com suspensão de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), (solução NaCl 0,85% e Xcc, OD₆₀₀=0,6) e coletadas 24 h após a infecção. Para a condição controle, folhas de ambas as cultivares foram infiltradas com solução de NaCl 0,85%. As proteínas foram extraídas, do extrato de folhas e cloroplastos, com fenol e precipitadas em acetato de amônio em metanol. As amostras foram analisadas por LC-MS/MS e os espectros gerados foram analisados com os softwares *Progenesis Q1* e *PEAKS7*[®] para identificação e quantificação de proteínas. Após a comparação da cultivar resistente inoculada com a não inoculada (RI:RC) foram identificadas 2680 proteínas, enquanto 2686 proteínas foram encontradas na comparação entre a cultivar suscetível inoculada comparada ao controle (SI:SC). Mais de 300 proteínas diferencialmente abundantes, em ambas as cultivares, foram identificadas. Do total geral, o enriquecimento de cloroplasto contribuiu com mais 600 proteínas em RI:RC e mais de 900 em SI:SC, que não foram detectadas nas amostras do extrato de folha. Foram analisados ainda 30 genes por RTq-PCR em ambas as cultivares. Na cultivar resistente, 9 genes tiveram nível de expressão diferencial estatisticamente significativo em relação ao controle (7 com expressão aumentada e 2 diminuída) na cultivar resistente, enquanto a cultivar suscetível mostrou 13 genes validados (10 regulados positivamente e 3 negativamente). Entre os genes diferencialmente expressos, com significância estatística, avaliados por RTq-PCR, três genes, potencialmente envolvidos na defesa da planta, foram escolhidos para validação funcional por superexpressão gênica em planta modelo. Os genes de repolho, *BoCHB4*, *BoESP* e *BoRGP1*, expressos em *Arabidopsis*, foram validados demonstrando expressão aumentada nas plantas transgênicas (578, 22.000 e 7,5 vezes, respectivamente) quando comparado com as plantas não transformadas (*wild type-WT*). Este trabalho, além de contribuir para o enriquecimento do banco de dados e identificação de proteínas de adaptação ao estresse pela planta, pode fornecer informações de genes candidatos para programas de melhoramento genético.

Palavras-chaves: Interação planta-patógeno, Podridão negra, Proteômica, Superexpressão gênica, Repolho.

ABSTRACT

Gene function determination, among at the confirmation of genes involvement in certain biological condition, is still a post-genomic era challenge, being that the proteomic analysis is a powerful technique for this purpose. Cellular organelles enrichment can also contribute for the less abundant proteins identification in the complex plant samples analysis. In the present study, young leaves of *Brassica oleracea* var. *capitata* (cabbage) of moderately resistant (Astrus Plus) and susceptible (Veloce) cultivars were infiltrated with *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, (NaCl 0.85% and Xcc OD₆₀₀ = 0.6 solution) and collected 24 h after infection. For the control condition, the both cultivars leaves were infiltrated with NaCl 0.85% solution. Proteins from leaf extract samples and chloroplasts were extracted with phenol and precipitated with ammonium acetate in methanol. The samples were analyzed by LC-MS/MS and the generated spectra were submitted to software's Progenesis Q1 and PEAKS7[®] for protein identification and quantification. After the comparison of the resistant inoculated cultivar with the control (RI:RC) resulted in 2680 identified proteins, while 2686 proteins were found in the susceptible inoculated cultivar compared to the control (SI:SC). More than 300 differentially abundant proteins, in both cultivars, were identified. The chloroplast enrichment contributed with more than 600 proteins in RI:RC and more than 900 in SI:SC, not identified in leaf extract samples. We further analyzed 30 genes by RTq-PCR in both cultivars. In resistant cultivar, 9 genes had differential expression level statistically significant when compared with control (7 up-regulated and 2 down-regulates), while the susceptible cultivar showed 11 validated genes (10 up-regulated and 3 down-regulated). Among the differentially expressed genes, with statistical significance, evaluated by RTq-PCR, three genes, potentially involved in plant defense were choose for functional validation by genic overexpression in model plant. The genes, *BoCHB4*, *BoESP* e *BoRGP1*, expressed in *Arabidopsis*, were validated and showed up-expression in transgenic plants in RTq-PCR analysis (578, 22,000 and 7.5-fold, respectively), when compared with non-transformed plants (wild type, WT). This work besides of to contribute for protein database enrichment and identified proteins of stress adaptation by the plant provide information of potential genes candidates in genetic enhancement programs.

Keywords: plant-pathogen interaction, cabbage, proteome, genic overexpression, cabbage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. O diagrama “Triângulo U” (modificado pelo autor) ilustrando as relações genômicas entre as seis espécies do gênero <i>Brassica</i> , originadas do repolho selvagem.....	23
Figura 2. Árvore filogenética, ilustrativa, de algumas espécies do táxon Brassicales incluído espécies do gênero <i>Brassica</i> componentes do triângulo “U” (<i>B. nigra</i> , <i>B. rapa</i> e <i>B. oleracea</i>) e <i>A. thaliana</i>	24
Figura 3. Ciclo de desenvolvimento e disseminação da podridão negra em repolho. Xcc (<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>). Fonte: figura produzida pelo próprio autor (com informações retiradas de KLISIEWICZ; POUND, 1961; SCHAAD; ALVAREZ, 1993).	27
Figura 4. Ilustração de como ocorre a penetração de Xcc nos tecidos vegetais. A infecção por Xcc, pode ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento da planta.....	28
Figura 5. Mapa representando as regiões onde ocorre maior produção de sementes de crucíferas.....	29
Figura 6. Modelo zig-zag proposto para exemplificar o sistema de defesa da planta.	35
Figura 7. Ilustração do fluxo de trabalho da proteômica <i>shotgun</i>	40
Figura 8. Desenho experimental com o delineamento do experimento aplicado para identificação das proteínas expressas por <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> na interação com a bactéria <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> e validação dos genes potencialmente envolvidos na defesa da planta.....	55
Figura 9. Diagrama de <i>Venn</i> mostrando as diferentes comparações realizadas.....	66
Figura 10. <i>Heatmap</i> mostrando a correlação entre a abundância protéica (PA - <i>protein abundance</i>) e os níveis de expressão gênica (GE - <i>gene expression</i>).....	76
Figura 11. Classificação de ontologia gênica (GO) na categoria de função biológica.	79
Figura 12. Subclassificação das proteínas envolvidas na resposta a doença/defesa.	85
Figura 13. Desenho esquemático de um modelo de interação das proteínas identificadas na proteômica de extrato de folha e cloroplasto isolado de plantas resistentes, durante a interação com Xcc.....	86
Figura 14. <i>Southern blot</i> das linhagens T2 transformadas via <i>Agrobacterium</i> , por floral dip (a).	98
Figura 15. Diferença das plantas transgênicas <i>BoESP</i>	99
Figura 16. Plantas com aproximadamente 15 dias de idade, cultivada em meio não seletivo em tubo de ensaio.....	101
Figura 17. Resultado do bioensaio com inoculação de <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Xcc) para avaliação fenotípica das linhagens transgênicas (<i>BoCHB4</i> , <i>BoESP</i> e <i>BoRGP1</i>) e não transformadas (controle – <i>WT wild type</i>).....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DE – *two-dimensional gel eletrophoresis*

ABA – *Absisic acid* - Ácido absísico

ACN – Acetonitrila

ACT – Proteína actina

AF – Ácido fórmico

AGC – *Automatic Gain Control* – controle automático de ganho

AIG2 – *Avirulence-induced gene 2 protein1*

AJ - Ácido jasmônico

AS – Via do ácido salicílico

At – *A. thaliana*

BAG – *Bcl2 associated anthogene*

WRKY gene –WRKY transcription factor gene

Bj – *B. juncea*

Bna – *B. napus*

Bo – *B. oleracea*

Br – *B. rapa*

C₂H₄INO - Iodoacetamida

Ca²⁺ - Cálcio

CaMV – *Cauliflower mosaic virus*

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulphonate

CHB4 – *Basic chitinase* CHB4

CID – (*collision-induced dissociation*) – dissociação induzida por ativação colisional

Clp – Cloroplasto

ClpFC – Cloroplasto isolado de folhas não inoculadas, controle

ClpFI – Cloroplasto isolado de folhas inoculadas

ClpRC – Cloroplasto de planta resistente controle

ClpRI – Cloroplasto de planta resistente inoculada

ClpRC – Cloroplasto de planta suscetível controle

ClpSI – Cloroplasto de planta suscetível inoculada

cm – centímetros

CNPH – Centro Nacional de Pesquisas em Hortaliças

CO₂ – gás carbônico

Col-0 – Columbia
ddH₂O – *Double-distilled water*
dpi – dia pós-inoculação
DNA – *Deoxyribonucleic acid*
dNTP – deoxynucleotide
DTT – Ditioneitol (C₄H₁₀O₂S₂)
EC – *enzyme code*
EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid
e. g - *exempli gratia* (por exemplo)
EGTA – Ethylene glycol tetraacetic acid
EF-1 α – fator de alongação 1-alfa
EFC – Extrato de folhas não inoculadas – controle
EFI – Extrato de folhas inoculadas
EFRC – Extrato de folha resistente – controle
EFRI – Extrato de folha resistente inoculada
EFSC – Extrato de folha suscetível controle
EFSI – Extrato de folha suscetível inoculada
EMBL-EBI – *European Bioinformatics Institute*
ESI – *Electro-spray ionization*
ESP – epithiospecifer protein
ET – Etileno
ETS – *Effectors-triggered susceptibility*
EST – *Expression sequence tags*
ESP - Epithiospecifer
ETI – *Effectors-triggered immunity*
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S) – Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid
FAL – Fenilalanina amônio-liase
FDR – *False Discovery rate*
Fold-change – valor que corresponde quantas vezes mais ou menos abundantes está as proteínas em relação ao controle.
Flg22 – flagelina 22
FSD1 – gene da superóxido dismutase Fe
g* - aceleração da força de gravidade da terra (força gravitacional)

g – grama
GAPDH - proteínas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GE – *Gene expression*
Gene *Avr* – Gene de avirulência
Gene R – gene de resistência
GN - Gene
GO – Gene ontology
GSL - glicosinolatos
Gly – *Glycine*
GRP – *Glycine-rich protein*
GTs – glicosil-transferases
H – Hora (s)
HR – *Host-resistance*
HRGP – *Hydroxyproline-rich glycoprotein*
ISPP – *International Society for Plant Pathology*
iTOL – *Interactive tree of life*
in silico – simulação computacional
K⁺ – potássio
Km - kanamycin
KOH – Hidróxido de potássio
H⁺ – hidrogênio
Hpi – horas pós-inoculação
L - litro
LB – Luria-bertani medium
LRRP – *Leucine rich repeat protein*
Leu – *Leucine*
LC – *liquid chromatography*
Label-free – livre de marcação
LC-MS – *Liquid chromatography with mass spectrometry*
LGP – Laboratório de genômica e proteômica (Embrapa)
LRR-RLK – receptores quinase ricos em leucina
MALDI – *matrix-assisted laser desorption/ionization*
MAMP – *Microbe-associated molecular pattern*
MDH – *Malate dehydrogenase*

MeSA – Metil-salicilato
min – minuto (s)
mg – miligrama
mm – milímetros
mM – milimolar
MPK – Mitogen p
MPSS – *Massively parallel signature sequencing*
m/z – massa/carga
MAPK – *Mitogen activated protein kinase* – proteína ativada por mitógenos
MassIVE - *Mass spectrometry interactive virtual environment*
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
mg - miligrama
mL - mililitros
MS – *Mass spectrometry*
MS medium – *Murashige and Skoog medium*
mRNA – RNA mensageiro
mt – mitocôndria
NA – Não anotada
NaCl – Cloreto de sódio
NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio
nL – nanolitro
nanoLC-MS/MS (ou MS²) – *automated nano liquid chromatography tandem mass spectrometry*
NB – *nucleotide binding*
NB-LRR – *Nucleotide-binding site leucine-rich repeat*
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
ND – Não diferencial
NGS – *Next generation sequencing*
NI – Não identificada
NYG – *Nutrient yeast glycerol*
OD – *Optical density*
Overnight – tempo considerado entre 10-12 horas
ORBITRAP – Analisador de massa de armadilha de íons
PA – *Protein abundance*

PAMP – *Pathogen-associated molecular pattern*

PBS – *Prunus bacterial spot*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pH – potencial hidrogênico

PIR – *Protein Information Resource*

p value (*p*) – medida de quanta evidência você tem contra a hipótese nula

Planta AR – Planta altamente resistente

Planta AS – Planta altamente suscetível

Planta MR – Planta moderadamente resistente

Planta MS – Planta moderadamente suscetível

Plantas S – Planta suscetível

PTI – *PAMP-triggered immunity*

ppm – partes por milhão

PR – *Pathogenesis-related*

Pro – *Proline*

PRRs – *Pattern recognition receptors*

PRX - peroxiredoxina

PSM – *Peptide Spectral Matches*

Q-OT-qIT - *quadrupole/linear ion trap/Orbitrap tribrid mass spectrometer*

RAW data – dados brutos

RC – resistente controle

REST – *Relative Expression Software*

Rf – Rifampicina

R – resistente

RI – resistente inoculada

RGP – *Reversibly glycosylated polypeptide*

RH – Resposta de hipersensibilidade

PROTEÔMICA SHOTGUN – técnicas proteômicas na identificação de proteínas em misturas complexas usando a combinação de cromatografia de alta performance e espectrometria de massa.

RTq-PCR – *Real time quantitative polymerase chain reaction*

s – segundos

SIB – *Swiss Institute of Bioinformatics*

RNA – *Ribonucleic acid*

ROS – *reactive oxygen species*
RSA – Resposta sistêmica adquirida
RSI – Resistência sistêmica induzida
S - suscetível
SAGE – *Serial analysis **of** genes expression*
SC – Suscetível controle
SCAI – *Servicio central de apoyo a la investigación*
SCR – *S-cystein rich*
SDS – Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE – *polyacrylamide gel eletrophoresis*
SI – Suscetível inoculada
SRK – *S-receptor kinase*
St – Streptomicina
Sp – Spectinomicina
SST3 – sistema de secreção tipo 3
SVD – Severidade da doença
T0 – *transgenic plant – primary transformants*
Tabela S – tabela suplementar
TBE – Tampão tris/borato/EDTA
TBP - proteína de ligação TATA-box
TCA – *tricarboxylic cycle acid*
Ti – *tumor-inducing*
TFA – trifluoroacetic acid
Th – *Thompson = atomic mass unit/número de cargas elementares*
RPM – rotação por minuto
RUBQ – *Rice ubiquitin*
U – unidade
UAM – UDP-arabinopiranosose mutase
UBQ1 – ubiquitina ribossomal 60S L40
UCO – *Universidad de Córdoba*
UFC – Unidade formadora de colônias
UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro
USP – *Ubiquitin proteasome system*

V – Volts

Var - variação

Vr – virulento

WT – *Wild type*

XbaI – Endonuclease de restrição, enzima isolada da bactéria *Xanthomonas barii*

Xcc – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

XIC – área do pico extraído

μL – microlitros

μg – microgramas

μM – micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1 BRASSICA	22
2.1.1 Características e importância econômica	22
2.2 O GÊNERO <i>XANTHOMONAS</i>	25
2.2.1 Podridão negra	26
2.3 INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO	30
2.3.1 A importância de hormônios vegetais na interação planta-patógeno	31
2.3.2 Envolvimento de fatores genéticos, moleculares e bioquímicos na interação planta-patógeno	33
2.3.3 Sistema de defesa da planta, coevolução planta-patógeno	34
2.4 ANÁLISE PROTEÔMICA	36
2.4.1 Proteômica <i>shotgun</i> e LC-MS	38
2.4.1.1 Proteômica quantitativa <i>label-free</i>	42
2.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	45
3 OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 MATERIAL VEGETAL	49
4.2 CULTIVO DA BACTÉRIA XCC E INFILTRAÇÃO DAS FOLHAS.....	49
4.3 ISOLAMENTO DE CLOROPLASTO	49
4.4 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA E PREPARO PARA ANÁLISE EM NANOLC-MS/MS50	
4.4.1 Fracionamento padrão por eletroforese em gel de acrilamida	51
4.4.2 Digestão de proteínas	51
4.5 AQUISIÇÃO DE DADOS.....	52
4.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	53
4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À DEFESA DA PLANTA56	
4.7.1 Desenho de primers	56
4.7.2 Seleção dos genes de referência	57
4.7.3 Extração de RNA e síntese de cDNA	57
4.7.4 Análise de RTq-PCR	58
4.8 OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS.....	58

4.8.1	Transformação e recuperação de células de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
4.8.2	Amplificação de DNA e sequenciamento para comprovação de inserção	59
4.8.2.1	Minipreparação do DNA plasmidial	59
4.8.3	Obtenção das plantas transformadas	60
4.8.4	Análise por <i>Southern blot</i>, RTq-PCR e bioensaio	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	PERFIL PROTEÔMICO DE FOLHAS DE BRASSICA INFECTADAS POR XCC	63
5.2	CATEGORIAS DE GO DAS PROTEÍNAS RESPONSIVAS A XCC NA INTERAÇÃO RESISTENTE E SUSCETÍVEL	77
5.2.1	Proteínas do metabolismo energético.....	80
5.2.2	Proteínas envolvidas no processo de fotossíntese, biossíntese e processamento de proteínas.....	81
5.2.3	Proteínas envolvidas na resposta de doença/defesa.....	83
5.3	MODELO DA INTERAÇÃO RESISTENTE <i>B. OLERACEA</i> -XCC	84
5.4	VALIDAÇÃO FUNCIONAL POR SUPEREXPRESSÃO EM <i>A. THALIANA</i>	91
5.4.1	Proteínas escolhidas para validação dos respectivos genes	92
5.4.1.1	Endoquitinase.....	92
5.4.1.2	Proteínas <i>Epithiospecifer-like</i>	94
5.4.1.3	UDP-arabinopiranosose mutase 1	95
5.4.2	Transformação genética de <i>A. thaliana</i>	96
5.4.3	Caracterização molecular e Bioensaio	97
	CONCLUSÃO	106
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
	APENDICE 1: FIGURAS SUPLEMENTARES.....	131
	APÊNDICE 2: TABELAS SUPLEMENTARES.....	134
	TABELA S2: PROTEÍNAS COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NA INTERAÇÃO RESTENTE - INOCULADO:CONTROLE.....	137
	PROTEÍNAS COM ABUNDÂNCIA DIMINUÍDA NA INTERAÇÃO RESISTENTE - INOCULADO:CONTROLE	140
	TABELA S3. PROTEÍNAS COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NA INTERAÇÃO SUSCETÍVEL INOCULADO:CONTROLE.....	145
	TABELA S4. PROTEÍNAS COM ABUNDÂNCIA DIMINUÍDA NA INTERAÇÃO SUSCETÍVEL INOCULADO:CONTROLE.....	150

APENDICE 4 – ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	154
ARTIGO SUBMETIDO: COAUTORIA.....	154
PRÊMIO (2017).....	155
PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS: PALESTRANTE (SEMINÁRIO).....	155
PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS: PALESTRANTE (SEMINÁRIO).....	155
PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS: PALESTRANTE (WORKSHOP).....	155
PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS: MINISTRAÇÃO DE MINICURSO.....	155
PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS: PALESTRANTE	155
PARTICIPAÇÃO EM EVENTO INTERNACIONAL.....	155
PARTICIPAÇÃO EM EVENTO NACIONAL	156
CURSOS	156

1 INTRODUÇÃO

Brassica oleracea é considerada uma das espécies mais importantes da família Brassicaceae. O consumo dessa espécie aumentou em todo o mundo, e há década é superado apenas pelas solanaceas (por exemplo, batata e tomate) (ROSA, 1997; FILGUEIRA, 2000; DHALIWAL, 2017). Um dos problemas mundiais no cultivo de brássicas é a doença podridão negra causada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) o agente etiológico dessa bacteriose considerada uma das doenças mais destrutivas das crucíferas, e de maior importância econômica entre as brássicas (VORHÖLTER et al., 2003). Trata-se de uma doença considerada grave pois além de causar perdas de rendimento e qualidade, pode acometer a planta em qualquer fase do desenvolvimento (GHINI; HAMADA; BETTIOL, 2011).

A difícil contenção da doença pode estar relacionada à dificuldade de detecção. O acesso aos principais meios de detecção (testes de crescimento em casa de vegetação, métodos laboratoriais como a utilização de meios de cultura semisseletivo, sorologia e PCR), há muito tempo é o principal desafio dos produtores (CHANG et al., 1991; BERG et al., 2005; KOSITCHAROENKUL et al., 2011). Outro problema da contenção de fitopatógenos pode estar relacionado às modificações moleculares incluindo, mutações nos genes, aquisição de novos genes ou perda de outros que pode acontecer em ambas as espécies da interação planta-patógeno, ou seja, ao longo do tempo a medida que a planta desenvolve um mecanismo molecular de combate ao patógeno, o mesmo, na tentativa de burlar o mecanismo de defesa, devido a grande variabilidade genética, pode a nível molecular, diferenciar os mecanismo de virulência e/ou patogenicidade, incluindo moléculas efetoras (BARBIERI; CARVALHO, 2001; CARVALHO et al., 2008; BADEL et al., 2018).

Alguns genomas de brassica têm sido estudados incluindo o genoma A (*B. rapa*), o BC (*B. carinata*, originada do cruzamento dos genomas *B. nigra* e *B. oleracea*) e o genoma AC (*B. napus*, origem de *B. rapa* x *B. oleracea*). Em brassicas já foi caracterizado gene de resistência que pode conferir resistência duradoura à podridão negra para os genomas A e B (GUO; DICKSON; HUNTER 1991; KUGINUKI et al., 2000). Mesmo com o conhecimento acumulado ao longo dos anos sobre os genomas C (*B. oleracea*), informações sobre genes de resistência são

limitados, e não há fonte de resistência efetiva contra a doença da podridão negra para esse grupo genômico (CAMARGO; WILLIAMS; OSBORN, 1995; SHARMA, et al., 2016). Desta forma, é necessário elucidar a função dos genes envolvidos na defesa da planta, para desenvolver métodos de controle de doenças que sejam duradouros. Para o controle da podridão negra em repolho, uma medida que pode ser eficiente é o desenvolvimento de cultivares tolerantes e/ou resistente, com o auxílio da genômica funcional para explorar a expressão de genes de defesa para o desenvolvimento de tais cultivares. E contribuir ainda com as técnicas convencionais de obtenção de cultivares, ou seja, o cruzamento direto entre essas plantas para gerar plantas com tolerância e/ou resistência duradoura, contribuindo principalmente para o consumo, já que a aceitação de organismos modificados geneticamente (OGMs) ainda é uma barreira para engenharia genética de plantas.

As estratégias “ômicas” incluindo, transcriptômica, metabolômica, proteômica, permitiram avanços na análise celular comparativa. A proteômica mostrou ser um método de estudo poderoso, podendo contribuir diretamente em questões relacionadas com estudos de larga-escala da função gênica direcionadas em nível proteico (TULI; HENSSEM, 2009), de um modo geral, a proteômica permite conhecer o produto de um determinado gene, as propriedades químicas e locais de atuação na célula, através de metodologias reprodutíveis e sensíveis, que podem levar à análise mais abrangente do conteúdo proteico e modificações pós-traducionais.

Com dados obtidos na proteômica de plantas, a análise da abundância da proteína pode contribuir para a detecção de genes responsivos aos diferentes estresses, incluindo o estresse causado por agentes fitopatogênicos. O acúmulo de sequências genômicas e estudos proteômicos puderam abrir novas perspectivas na era pós-genômica, principalmente para explorar as modificações celulares dos organismos envolvidos na interação patógeno-planta. A associação da genômica funcional aplicada à interação patógeno-planta, pode levar ao estudo mais aprofundado na função de genes importantes para a defesa da planta.

A superexpressão de genes, uma abordagem da genética clássica, vem sendo explorada ao longo dos anos, inicialmente envolvendo técnicas de transformação de leveduras, construções de bibliotecas genômicas com vetores (BEGGS, 1978; HINNEN et al., 1978; CARLSON; BOTSTEINS, 1982; ROSE; BROACH, 1990). Ao longo dos anos com o aperfeiçoamento da técnica, foi possível

a aplicação da clonagem para análise de plantas. A superexpressão de genes em plantas transgênicas mostrou grande relevância para a elucidação da função de vários genes, em diferentes condições fisiológicas da planta, quando submetida a diferentes estresses, biótico e abiótico (KONDOU et al., 2010; revisado por PRELICH, 2012)

Dessa forma, a genômica funcional pode ser importante para explorar e compreender os mecanismos celulares outrora inexplorados, e contribuir para detecção de vias de sinalização importantes em relacionadas ao processo de infecção tanto em relação ao patógeno quanto na resposta do hospedeiro. As técnicas proteômicas podem fornecer a ligação entre a expressão gênica e a abundância de proteínas e ajudar a identificar as proteínas envolvidas na defesa e resistência das plantas (KAMAL, KIM et al., 2010, KOMATSU e HOSSAIN, 2017).

Neste contexto, no presente trabalho utilizando genômica funcional, foi realizado com o objetivo de identificar genes responsivos ao estresse causado por Xcc nas primeiras horas de infecção, assim como validação funcional de três genes, com expressão diferencial, para superexpressão em *Arabidopsis thaliana*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BRASSICA

2.1.1 Características e importância econômica

A família Brassicaceae possui aproximadamente 338 gêneros e 3.709 espécies (WARWICK et al., 2006). Acredita-se que espécies dessa família tenham originado do Oriente Médio, região do Mediterrâneo (PRAKASH; HINATA, 1980; WARWICK, 2011). Plantas da família Brassicaceae podem ser cultivadas para preparo de condimentos e como plantas ornamentais. Entre as espécies da família Brassicaceae, podem-se destacar algumas hortaliças do gênero *Brassica*, com representantes economicamente importantes amplamente cultivados e consumidos mundialmente (WARWICK, FRANCIS; AL-SHEHBAZ, 2006; WARWICK, FRANCIS; GURGEL, 2009). Estima-se que mais de 139 milhões de toneladas de vegetais desse gênero foram produzidos nos últimos anos movimentando mais de 14 bilhões de dólares (<http://faostat.fao.org/>).

O gênero *Brassica* compreende aproximadamente 50 espécies diferentes espalhadas pelo mundo, destacando-se *B. oleracea*, *B. rapa* e *B. nigra* (Figura 1), três espécies com grande diversidade morfológica e nas formas de cultivo (SONG; OSBORN; WILLIAMS, 1988). Vários estudos realizados para explorar as características agronômicas e moleculares das brássicas contribuíram para o desenvolvimento de um banco de dados (<http://www.brassica.info/>) onde são disponibilizadas informações sobre as características filogenéticas, genômicas e agronômicas, além de características terapêuticas da família Brassicaceae (WARWICK et al., 2009).

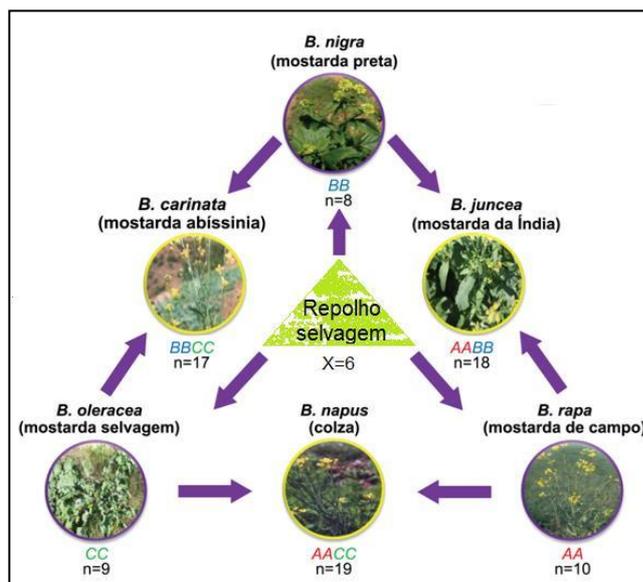


Figura 1. O diagrama “Triângulo U” (modificado pelo autor) ilustrando as relações genômicas entre as seis espécies do gênero *Brassica*, originadas do repolho selvagem. Essa teoria, publicada inicialmente por Woo Jan-choon em 1930, demonstra principalmente o cruzamento de três espécies entre si (vértice do triângulo), originando mais 3 novas. Os genomas são representados pelas letras A, B, C (*B. rapa*, *B. nigra*, *B. oleracea*, respectivamente) referindo às espécies diploides; n=número de cromossomos (NAGAHARU, 1935; JULES, 2009), fotos: (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

Estudos genéticos e morfológicos revelaram a existência de diversidade em algumas espécies de *Brassica* (*B. nigra*, *B. juncea*, *B. rapa*, *B. napus* e *B. oleracea*) subdividindo as espécies em variedades (Figura 2), de acordo com diferentes características apresentadas por seus representantes (PRAKASH; HINATA, 1980; WARWICK, 2011; SCHMIDT; BRANCROFT, 2011). Variedades de *B. oleracea* incluindo *capitata*, *sabauda*, *gemmifera*, *gongyloides*, *italica*, *viridis*, *costata*, *medullosa*, *sabellica*, destacam-se não apenas pela grande diversidade genética e morfológica, múltiplos grupos de cultivares (Figura 2), mas também pelo importante papel que ocupa na alimentação humana, uma vez que várias partes da planta são utilizadas para consumo (raízes, folhas, brotos, flores e sementes). Essas plantas também podem ser utilizadas como forragem, fonte de óleos e plantas ornamentais além de alguns representantes serem utilizados como organismos modelo (p.e. *Arabidopsis thaliana*) (PRAKASH; HINATA, 1980; WARWICK, 2011; SCHMIDT; BRANCROFT, 2011).

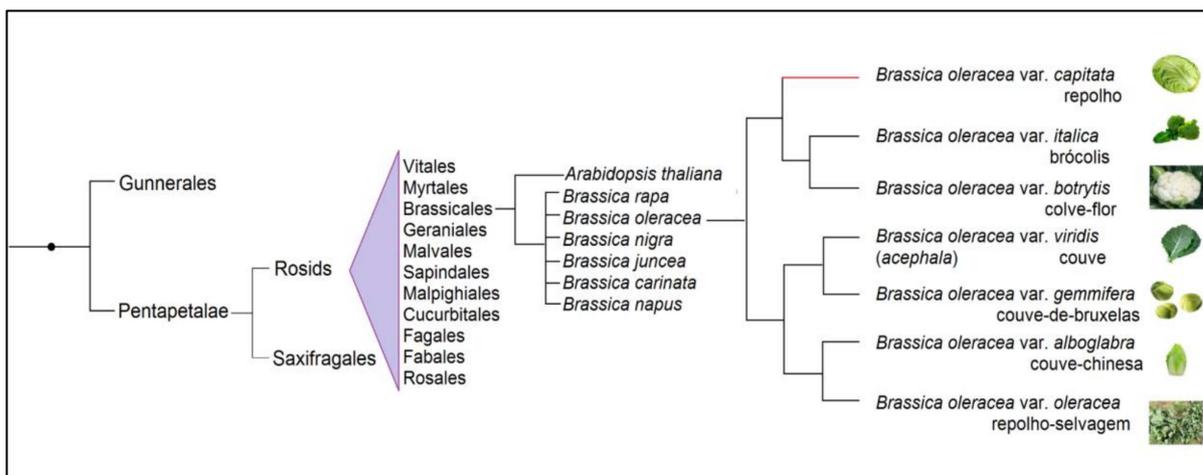


Figura 2. Árvore filogenética, ilustrativa, de algumas espécies do táxon Brassicales incluído espécies do gênero *Brassica* componentes do triângulo “U” (*B. nigra*, *B. rapa* e *B. oleracea*) e *A. thaliana*. A árvore com as espécies de interesse foi obtida utilizando a ferramenta phyloT, o gerador de árvores filogenéticas baseado na taxonomia das espécies presentes no banco de dados NCBI (<https://phyloT.biobyte.de/>), utilizando a ferramenta árvore da vida interativa (iTOL) (LETUNIC; BORK, 2016), na ilustração estão destacadas as principais variedades da espécie *B. oleracea*, com fotos de algumas variedades mais comuns. O ramo em vermelho indica a variedade utilizada no presente estudo; foto: repolho-selvagem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>).

A variedade *capitata* (repolho) tem se destacado pela importância socioeconômica, no Brasil devido ao alto nível de produção e consumo (REIS et al., 2017), é considerada uma variedade de grande importância na agricultura familiar, onde pode gerar empregos e evitar o êxodo rural devido a grande necessidade de mão-de-obra (SILVA et al., 2012; CASSOL; LENHARDT; GABRIEL, 2017). As regiões do Brasil que a produção de repolho tem maior expressão são as Sudeste e Sul. A cada ano a área plantada desses vegetais tem aumentado, a produção média só no estado de São Paulo, estado de maior produção nacional, é de aproximadamente 30 toneladas por hectares/ano, sendo que só em 2015 a área plantada foi de 5,9 mil hectares no estado (CARVALHO et al., 2016), o cultivo e aumento de consumo dessas plantas tem agregado grande importância agroeconômica, além de proporcionar benefícios à saúde humana devido ao alto valor nutricional, provendo energia e nutrientes importantes (revisado por, SANLIER; GULER SABAN, 2018).

No entanto, assim como em várias outras culturas importantes economicamente, a infecção por agentes patogênicos pode levar a grandes perdas econômicas. Espécies patogênicas do gênero *Xanthomonas* causam preocupação para o cultivo de *Brassicac*s em todo o mundo (LEYNS et al., 1984; RYAN et al., 2011).

2.2 O GÊNERO *Xanthomonas*

Xanthomonas consiste em um gênero composto por bactérias Gram-negativas. O nome *Xanthomonas* é originado do grego que quer dizer *xanthos*=amarelo e *monas*=entidade, devido à coloração amarela característica das colônias (revisado por Ryan et al., 2011). Estudos sobre características bioquímicas, fenotípicas, morfológicas e graus de patogenicidade levaram Dowson (1939) a descrever 60 espécies de *Xanthomonas*. Todavia, com o avanço tecnológico e desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, foram realizados estudos que reclassificaram as espécies de *Xanthomonas* (DE VOS; DE LEY, 1983; VAN DEN MOOTER; SWINGS, 1990; YANG et al., 1993). Em 1995, Vaüterin e colaboradores, utilizaram técnicas de hibridização de DNA e observaram que se tratava de um gênero com espécies muito complexas e devido a essa complexidade era necessária uma reclassificação. Além dos dados de hibridização, resultados de análise nutricional e da composição de ácidos graxos contribuíram para a reclassificação, de todas as espécies e patovares estudados. Após a reclassificação foi sugerido (VAÜTERIN et al., 1995) que apenas os patovares que infectavam brássicas fossem mantidos como pertencentes à espécie *Xanthomonas campestris* (pvs. *aberrans*, *armoraciae*, *barbareae*, *campestris*, *incanae* e *raphani*) e esses patovares são reconhecidos pela Sociedade Internacional de Patologia de Plantas (ISPP - do inglês *International Society for Plant Pathology*) (ISPP, 2006).

Espécies do gênero *Xanthomonas* provocam diversas doenças que afetam culturas economicamente importantes, no mundo todo tanto monocotiledônea (aproximadamente 124 plantas hospedeiras), quanto dicotiledônea (aproximadamente 268 plantas hospedeiras). Um grupo diversificado, com uma ampla variedade de espécies, linhagens e hospedeiros, faz esse gênero o maior grupo de bactérias fitopatogênicas (LEYNS et al., 1984; RYAN et al., 2011). Entre as doenças causadas por espécies desse gênero, podemos citar, por exemplo, a mancha bacteriana em plantas da família Solanaceae causado pela espécie *Xanthomonas axonopodis* pv. *citris* (DOIDGE, 1921; GARDNER; KENDRICK, 1921; GITAITIS; McCARTER; JONES, 1992; JONES et al., 2004), cancro cítrico em *Citrus* e plantas do gênero *Rutadea*, (LEITE JUNIOR, 1990; BRAITHWAITE et al., 2002), a doença denominada “*Prunus Bacterial Spot*” (PBS) em plantas do gênero *Prunus* e

híbridos (BRADBURY, 1994), podridão negra em *Brassicaceae*, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), sendo principal doença bacteriana das crucíferas (GHINI, HAMADA; BETTIOL, 2011).

X. campestris pv. *campestris* (Xcc) tornou-se uma das bactérias-modelo para estudos relacionados à interação planta-bactéria fitopatogênica. Algumas cepas de Xcc tiveram o genoma sequenciado (DA SILVA et al., 2002) e, com os dados disponíveis foi possível avançar com estudos comparativos entre os diferentes patovares (QIAN, et al., 2005; BOLOT et al., 2013).

2.2.1 Podridão negra

A podridão negra consiste em uma doença causada pela bactéria *X. campestris* pv. *campestris* que acomete todas as brássicas. Essa doença tem sido considerada muito grave, causando perdas em rendimentos e qualidade, podendo surgir em qualquer fase do desenvolvimento da planta (GHINI, HAMADA; BETTIOL, 2011). A podridão negra foi descrita pela primeira vez por Garman em 1894, como uma doença de couve, porém, o tipo de agente causal da doença não foi determinado. Em 1895, Pammel, observou em nabos uma doença semelhante causada por bactérias, formando colônias amarelas em meio de cultura, a qual acreditava ser *Bacillus campestris*. Porém, no sudeste de Wisconsin nos Estados Unidos, em 1898, Russel e Smith atribuíram a doenças de nabos e repolhos a *Xanthomonas campestris*, que devastou campos de repolho no país (RUSSELL, 1898; SMITH, 1898; BRADBURY, 1994).

A disseminação da doença pode ocorrer principalmente através das sementes infectadas (Figura 3), após alcançar o sistema vascular, a bactéria pode migrar através do pedúnculo floral e infectar as sementes, ficando viável por até três anos (KLISIEWICZ; POUND, 1961). A transmissão da doença pode também ocorrer via solo infectado, por transplantes infectados, pelo manejo de resíduos da colheita e até mesmo pela retirada de plantas daninhas (SCHAAD; ALVAREZ, 1993). A bactéria pode se estabelecer na planta através de poros nas margens da folha ou através de alguma injúria na superfície foliar. Os sintomas normalmente aparecem 10-14 dias após a penetração da bactéria na planta hospedeira. Xcc coloniza o sistema vascular, movimentando-se rapidamente por possuir flagelos (Figura 4).

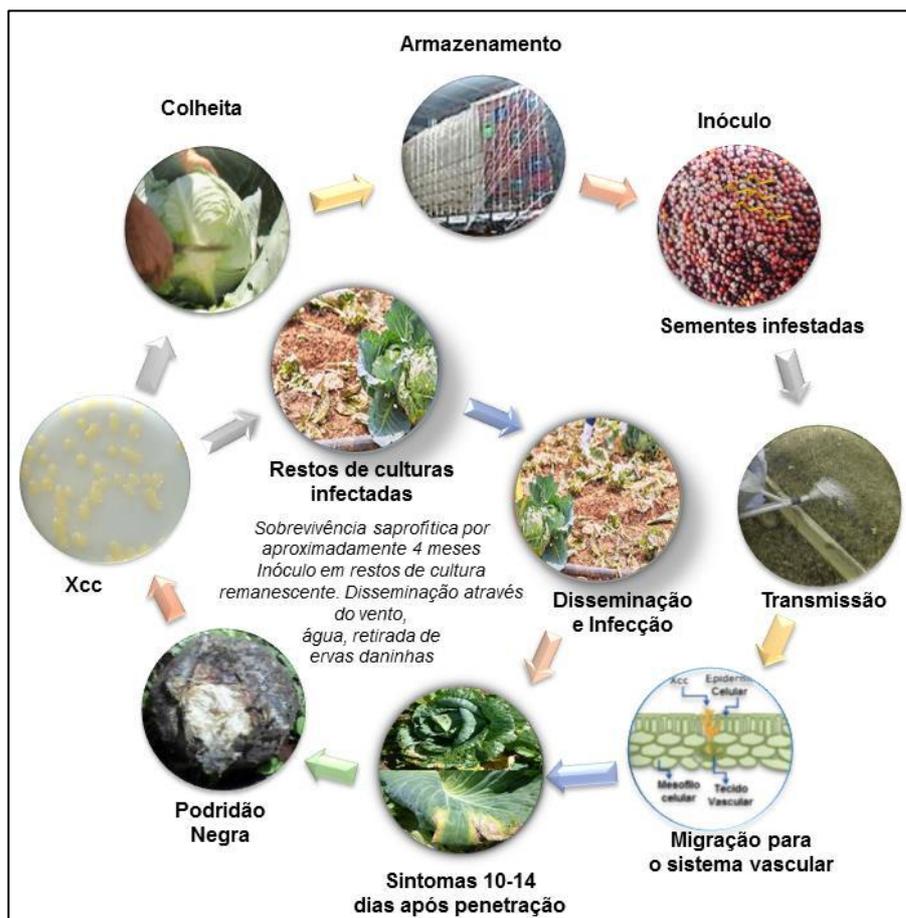


Figura 3. Ciclo de desenvolvimento e disseminação da podridão negra em repolho. Xcc (*X. campestris* pv. *campestris*). Fonte: figura produzida pelo próprio autor (com informações retiradas de KLISIEWICZ; POUND, 1961; SCHAAD; ALVAREZ, 1993).

Desde o seu primeiro relato, a doença foi identificada em todos os locais onde havia cultivo de Brassicaceae, levando os agricultores a se preocuparem em conter esse agente, devido à severidade com que atacou as culturas na época, (RUSSELL, 1898; SMITH, 1898; BRADBURY, 1994). Embora *Brassica oleracea*, planta economicamente importante, seja um hospedeiro de Xcc, outras culturas podem ser atacadas pela doença da podridão negra como rabanetes, crucíferas ornamentais e espécies de plantas daninhas (BRADBURY, 1994). Além disso, a planta modelo *A. thaliana* também é suscetível a essa doença (VICENTE; HOLUB, 2012).

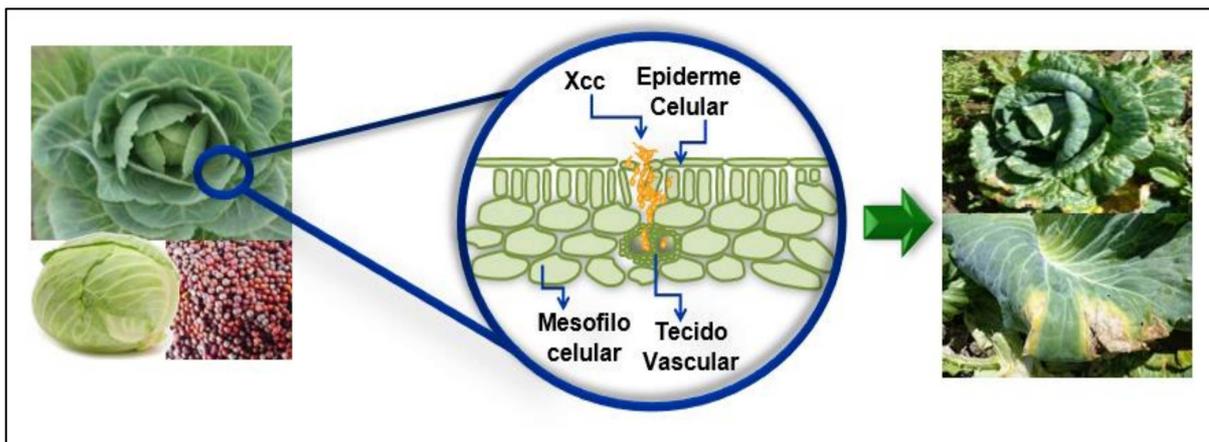


Figura 4. Ilustração de como ocorre a penetração de Xcc nos tecidos vegetais. A infecção por Xcc, pode ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento da planta. Após ocorrer alguma injúria na superfície foliar a bactéria pode penetrar através epiderme, invadir as células do mesófilo e colonizar rapidamente o sistema vascular causando lesões nas margens das folhas e/ou morte da planta (Santos, 2015).

Quando a temperatura for superior a 25°C, pode ocorrer a produção de grandes quantidades de xantana, um polissacarídeo que obstrui os vasos do xilema impedindo o fluxo de água e causando lesões cloróticas características (Figura 3), em forma de V, originadas nas margens das folhas (SUTTON; WILLIAMS, 1970). Foi observado que, após a colonização dos tecidos em 24 h, já pode ser observado presença de xantana preenchendo os espaços entre as células (SWINGS; CIVEROLO, 1993).

Em um estudo de viabilidade das cepas de Xcc, foi observado que essas bactérias podem sobreviver no solo de forma independente do hospedeiro, embora tenham capacidade de sobreviver por mais tempo dentro de restos de tecido vegetal do que em forma livre. No entanto, a disseminação do patógeno, e consequente propagação da doença, podem ser mais eficazes por tecidos frescos descartados no solo (onde a bactéria pode permanecer viável por até dois meses) do que pelos tecidos presentes no solo há mais tempo, cerca 4 meses (MICHEREFF, ANDRADE; MENEZES, 2005).

O desenvolvimento do patógeno pode estar diretamente ligado às condições climáticas que exercem um grande efeito sobre a suscetibilidade do hospedeiro, facilitando sua penetração na planta. A prevalência da doença é grande em climas quentes e úmidos, agindo de forma mais grave em regiões continentais tropicais, subtropicais e úmidas. Com a umidade, gotículas de água se formam favorecendo a infecção e contribuindo para a gravidade da doença, uma vez que a mesma se

espalha facilmente e rapidamente, retardando o desenvolvimento da planta (RUSSELL, 1898). Há também relatos de podridão negra em locais de climas frios (Europa e América do Norte), porém, raramente a doença progride para causar a destruição da planta (SMITH, 1898).

A contenção de Xcc torna-se ainda mais difícil quando sementes são infectadas, pois o desenvolvimento da doença pode ocorrer durante qualquer período do crescimento da planta e raramente o patógeno é detectado. A compra de grande quantidade de sementes inviabiliza o diagnóstico precoce, uma vez que os métodos para identificação disponíveis incluem testes de crescimento em casa de vegetação e métodos laboratoriais como a utilização de meios de culturas semisseletivo, sorologia e PCR, pouco acessíveis aos produtores (CHANG et al., 1991; BERG et al., 2005). A indução de floração nas culturas (principalmente para comercialização das sementes) é estimulada em regiões costeiras temperadas, locais onde o inverno é ameno, sendo ideais para a produção de sementes (Figura 5).

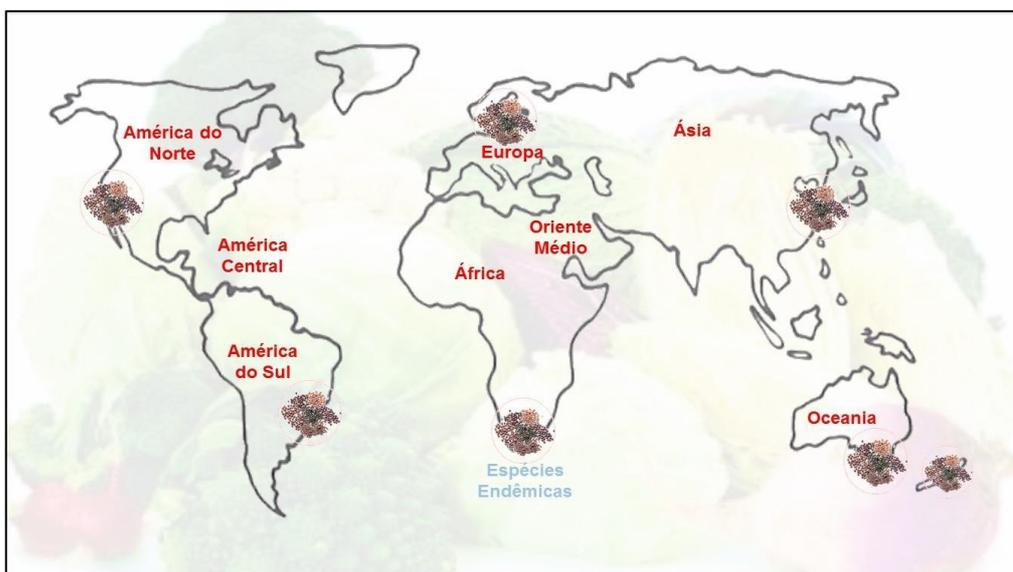


Figura 5. Mapa representando as regiões onde ocorre maior produção de sementes de crucíferas. Círculos em destaque indicam as principais regiões produtoras, na América do Norte e Sul, no sul da África (onde pode ser encontradas espécies endêmicas), na Ásia, Europa e Oceania (adaptado de WILLIAMS, 1980).

Durante a floração e maturação das sementes, pode ser difícil a detecção da bactéria, pois há grande desenvolvimento das plantas e senescência de folhas inferiores. Outro problema que dificulta a detecção de Xcc consiste na invasão sistêmica em hastes florais, a qual raramente resulta em sintomas externos típicos,

embora possa ocorrer escurecimento da veia interna dos colmos de sementes e queda prematura das folhas (WILLIAMS, 1980).

O conhecimento dos fatores genéticos, moleculares e bioquímicos da interação planta-patógeno pode fornecer informações importantes para o desenvolvimento de estratégias para o controle de doenças em plantas, pois o controle da doença ainda é concentrado na rotação de culturas, emprego de cultivares resistentes, além do emprego de defensivos agrícolas, principalmente fungicidas cúpricos, e agroquímicos incluindo pesticidas, herbicidas e inseticidas para evitar a disseminação da bactéria (FILGUEIRA, 2012; BARROSO, 2016; revisado por OMBUNA; NYANGERI; MAOBE, 2019). Os últimos métodos de controle citados podem contaminar tanto o solo e outros vegetais para consumo, como os lençóis freáticos, causando prejuízos ambientais. No caso da podridão negra em crucíferas, a recomendação é eliminar totalmente a fonte (MARINGONI, 2005). Assim, a utilização de culturas resistentes representa a melhor estratégia para evitar as perdas causadas por essa doença, além de levar a redução na utilização de pesticidas e fungicidas, reduzindo a contaminação do meio ambiente e os riscos para a saúde humana e animal (LEPPIK, 1970; STASKAWICZ et al., 1995).

2.3 INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO

Freeman e Beattie (2008) afirmam que a primeira linha de defesa da planta consiste em características presentes na superfície, mecanismo comum às plantas superiores, uma vez que todos os tecidos vegetais possuem estruturas que auxiliam a limitar a adesão, penetração e disseminação de patógenos. Essas características consistem em barreiras para impedir a penetração do fitopatógeno, uma vez que a principal via de penetração é através da epiderme. A resposta de defesa da planta envolve uma complexa rede de sinalização e uma extensiva amplificação dos sinais na tentativa de conter o patógeno (SUZUKI et al., 2003). Assim, as plantas podem responder ao agente agressor com vários mecanismos de defesa combinados, constitutivos e induzidos.

O mecanismo constitutivo ou pré-formado envolve fatores estruturais da planta incluindo cutícula, tricoma, estômatos, fibras/vasos condutores (constituintes da barreira mecânica da planta, considerada a principal linha de defesa contra

micro-organismos e insetos) e fatores bioquímicos como os metabólitos secundários (fenóis, glicosídicoalcaloides, lactonas insaturada, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos), proteínas (quitinases, β -1,3 glucanases) entre outros. Entre os fatores estruturais ligados ao mecanismo pós-formado estão papilas, halos, glicoproteínas ricas nos aminoácidos hidroxiprolina (HRGP – do inglês *Hydroxyproline-rich glycoprotein*) e proteínas ricas em glicina (GRP – do inglês *glycine-rich protein*), camada de cortiça, camadas de abscisão e tiloses. Quanto aos fatores bioquímicos também envolvidos na resposta induzida, podemos citar as fitoalexinas, as proteínas relacionadas à patogênese e as espécies reativas de oxigênio e hormônios vegetais importantes para o desenvolvimento e defesa da planta (PASCHOLATI; LEITE, 1994; TAIZ et al., 2017). Dependendo da necessidade e condições ambientais, os fitormônios podem agir como sinalizadores em plantas, desempenhando papel fundamental na regulação do crescimento, diferenciação celular e defesa (TAIZ et al., 2017).

2.3.1 A importância de hormônios vegetais na interação planta-patógeno

Estudos relacionados à sinalização de defesa demonstraram que os fitormônios, ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET), e apesar de a natureza dos sinalizadores primários ainda não ser conhecida (CONRATH et al., 2006; GOELLNER; CONRATH, 2008), podem ter um papel fundamental no desenvolvimento da planta e na resposta de defesa primária, esses hormônios podem estar envolvidos na regulação da resistência basal contra diferentes patógenos (TON et al., 2001; KOORNNEEF; PIETERSE, 2008),

O ácido salicílico, o salicilato e seus análogos são compostos químicos produzidos em resposta a infecção. Acredita-se que a resposta de hipersensibilidade (RH) possa desencadear a produção de AS, que por sua vez, pode induzir a produção de proteínas relacionadas à patogenicidade (PR - do inglês *Pathogenesis-related*). Sendo assim, AS pode ter um papel importante na indução de resistência, além de ser um regulador-chave na resposta sistêmica adquirida (RSA) (SPLETZER; ENYEDI, 1999). Além da RH, a produção de metil-salicilato (MeSA), durante o ataque do fitopatógeno, também pode resultar na indução da via AS, resultando na produção de PRs, conhecidas também pela ativação de genes de defesa contribuindo para a resistência da planta (SHULAEV et al., 1997).

Algumas evidências revelam que o fitormônio AJ, e seus derivados, distribuídos em tecidos das plantas, pode ser considerado um dos principais hormônios vegetais. Esse hormônio está intimamente envolvido no desenvolvimento, em vários processos fisiológicos (alongamento de raízes, abertura e fechamento de estômatos, senescências etc.) e, também, na defesa da planta. A indução da expressão de genes de defesa, causada pela presença de AJ foi proposto após verificar o aumento da concentração desse composto em locais da infecção, causado por agentes patogênicos ou lesão no tecido por agente abiótico (WASTERACK, 2007), outras evidências também corroboram para a participação AJ, juntamente com o etileno (ET), no processos de regulação positiva de genes de defesa (O'DONNELL et al., 1996).

O etileno consiste em um hormônio vegetal volátil proveniente do catabolismo do aminoácido metionina (KEND, 1993), e assim como o AJ, também participa de processos fisiológicos importantes nas plantas e pode ser considerado um potente regulador do desenvolvimento das mesmas (WAN, DANNING; BENT, 2002), mas sugere-se que esse hormônio possa estar associado a um sintoma e não à causa da indução da resposta de defesa (STICHER, MAUCH; METRAUX, 1997). No entanto, há evidências de participação direta do etileno nos processos de defesa da planta relacionados aos estresses abióticos ou bióticos (VAN DEN MOOTER; SWINGS, 1990). Algumas evidências sugerem que, o etileno, seja primordial na resistência sistêmica induzida (RSI), e o acúmulo do de ET, juntamente com o AS, pode ser essencial para o estabelecimento da resistência sistêmica adquirida (RSA) (DELANEY et al., 1994; TON et al., 2001). Os resultados demonstram a sinalização produção de moléculas de defesa basal pode ser AJ-AS-ET-dependente.

Em um novo modelo para a rede de defesa em *Arabidopsis*, foi proposto que a contenção do patógeno não está condicionada apenas a uma via específica, sugerindo que a resposta seja proveniente de uma mistura de componentes de vias distintas da resposta de defesa induzível (THOMMA et al., 2001). Os mecanismos envolvidos na interação, patógeno-planta, ainda precisam ser caracterizados e entendidos, portanto, faz-se necessário o aperfeiçoamento e desenvolvimento de técnicas ainda mais sensíveis com ferramentas de análises eficientes a fim de elucidar tais mecanismos.

2.3.2 Envolvimento de fatores genéticos, moleculares e bioquímicos na interação planta-patógeno

Os primeiros estudos genéticos e moleculares foram realizados por Flor (1971) e, apesar de todos esses anos, os resultados proporcionaram base teórica para o entendimento da interação patógeno-planta e forneceram suporte para hipóteses da participação de genes do patógeno e do hospedeiro no processo, inicial e tardio, da infecção. Além disso, os estudos iniciais de Flor (1971) contribuíram para a clonagem molecular dos genes de avirulência e de resistência (gene *Avr* do patógeno e o gene *R* de resistência da planta, respectivamente) (STASKAWICZ et al., 1995). Atualmente oito classes de genes *R* são reconhecidas com base na organização de motivos de aminoácidos e seus domínios de membrana, (GURURANI et al., 2012).

Importantes estudos envolvendo clonagem de genes de avirulência e elicitores fitopatogênicos corroboram para afirmar que a planta hospedeira pode desenvolver mecanismos capazes de identificar o agente patogênico (KEEN, 1990), além de fornecer resultados e evidências genéticas e bioquímicas que reforçam o modelo, receptor-elicitor, de reconhecimento de raças de patógenos incompatíveis pelas plantas, proposto por Flor em 1971.

A resistência hospedeiro-específica (HR - do inglês *host-resistance*) refere-se a cultivar resistente, e foi estabelecida baseando-se na teoria gene-a-gene, proposta por Flor (1971). A teoria da interação específica gene-a-gene propõe que, quando proteínas codificadas pelo gene *R* interagem, por reconhecimento, com proteínas codificadas pelo gene *Avr* do patógeno, não ocorre o desenvolvimento da doença. A interação *R-Avr* tem sido conhecida como interação incompatível, havendo uma complementaridade do produto *R* e *Avr* que provoca uma reação de hipersensibilidade (RH). Essa interação inicia a transdução de sinal que ativa os genes envolvidos na RH e a inibição do crescimento do agente patogênico. Em uma interação incompatível, o patógeno torna-se avirulento e a planta resistente à doença. (A interação compatível ocorre quando há ausência ou não funcionalidade do produto *R* responsável pelo reconhecimento do produto do gene *Avr*, assim classifica-se o patógeno como virulento (*vr*) (KEEN, 1990; GACHOMO, SHONUKAN; KOTCHONI, 2003). Reações fisiológicas de hipersensibilidade envolvem a oxidação rápida, o fluxo de íons (trocas de K^+ e H^+), a compartimentalização celular, produção

de antimicrobianos, indução de proteínas envolvidas na patogenicidade além do fortalecimento da parede celular da planta para conter a ação dos agentes patogênicos (KEEN, 1990).

2.3.3 Sistema de defesa da planta, coevolução planta-patógeno

O atual entendimento da interação planta-patógeno e resistência a doenças propõem que, quando ocorre a interação, a planta pode ser capaz de reconhecer e se defender de um agente patogênico quando o mesmo entra em contato com a superfície da célula vegetal, o fitopatógeno às vezes modifica o ambiente celular criando um ambiente favorável ao seu desenvolvimento, essa resposta de ambos os envolvidos pode ser um exemplo de coevolução. O desenvolvimento de duas linhas de defesas pode ser considerado nessa coevolução, uma com a utilização de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs – do inglês *pattern recognition receptors*) transmembrana e outra onde produtos de proteínas são utilizados para ativar as respostas de defesa. Os PRRs respondem de acordo com a evolução da doença ou a padrões moleculares associados ao patógeno (*PAMPs* - do inglês *pathogen-associated molecular pattern* ou *MAMPs* –*microbe-associated molecular pattern*), como por exemplo flagelinas bacterianas, lipo-oligossacarídeos, glucanas, entre outras (ZHANG; ZHOU, 2010). Como exemplo de proteínas utilizadas para desencadear resposta de defesa, podem ser citadas proteínas polimórficas NB-LRR caracterizadas por nucleotídeos de ligação (NB - do inglês *nucleotide binding*) e domínios ricos em repetições de leucina (LRR - do inglês *leucine rich repeat*). NBP e LRRP são proteínas codificadas por uma família gênica pertencente à classe mais numerosa de genes R. O domínio NB está envolvido na sinalização e inclui motivos altamente conservados e estritamente ordenados, tais como *P-loop*, *kinase-2* e *Gly-Leu-Pro-Leu* (MARONE et al., 2013). O domínio LRR, envolvido nas interações proteína-proteína, interage diretamente com o seu efetor cognato, controlando o reconhecimento específico (direto ou indireto) de raças de patógeno. Muitos LRRs podem interagir com outras proteínas transmembranares proporcionando também a capacidade de sinalização intracelular (HAMMOND-KOSACK; KANYUKA, 2001).

Em um modelo (*zig-zag*) proposto por Jones e Dangl (2006), são representadas quatro fases (Figura 6) no sistema de defesa da planta (exceto para vírus e herbívoros). Na primeira fase, quando o patógeno entra em contato com a

planta, ocorre o reconhecimento do patógeno por *PAMPs*. Esses padrões podem ser responsáveis por desencadear a resposta geral de defesa denominada, imunidade desencadeada por *PAMPs* (*PTI* - do inglês *PAMP-triggered immunity*). Em uma segunda fase, o fitopatógeno pode ser capaz de suprimir os diferentes componentes da *PTI* por proteínas efetoras injetadas/introduzidas na planta ocasionando suscetibilidade desencadeada por efector (*ETS* – do inglês *effectors-triggered susceptibility*).

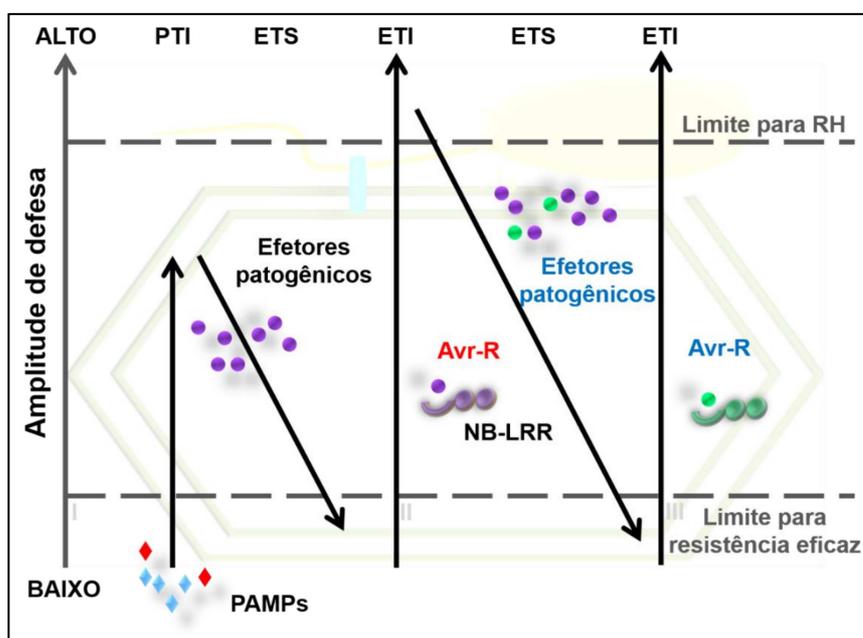


Figura 6. Modelo zig-zag proposto para exemplificar o sistema de defesa da planta. O esquema mostra que a amplitude final da resistência à doença ou a suscetibilidade pode ser proporcional [PTI – ETS + ETI] (JONES; DANGL, 2006), com modificações feitas por Santos (2015).

Na terceira fase, ocorre o reconhecimento de efetores específicos por genes de resistência (gene-R) provocando uma resposta mais específica, conhecida como imunidade desencadeada por efetores (*ETI* – do inglês *Effectors-triggered immunity*). Nesta fase, a proteína *NB-LRR* reconhece um dado efector resultando na *ETI*, uma resposta que pode ser imediata e amplificada por *PTI*. Esta resposta leva geralmente à resistência a doença, onde comumente ocorre a morte celular (RH) e evitando a infecção sistêmica. Por fim, na última fase, por mecanismo de seleção natural, os patógenos remanescentes, podem produzir moléculas estruturalmente diferentes das que anteriormente foram reconhecidas pela planta ou adquirem efetores adicionais para evitarem ou suprimirem a *ETI*. Em contato com as novas moléculas ou efetores, produzidos pelo patógeno, ao longo do tempo a planta pode

ser induzida a desenvolver novas estratégias de resistência, podendo novamente acionar a *ETI* para detecção e contenção do patógeno. Toda essa resposta, desenvolvida por ambos, patógeno e planta, pode ser um exemplo direto de coevolução (JONES; DANGL, 2006).

Em linhas gerais, observando o que já foi descrito, considerando a percepção celular vegetal, a respostas do agente infeccioso, e a indução de novos mecanismos genéticos, tanto a resistência do patógeno quanto a defesa da planta, pode estar relacionado a resposta evolutiva rápida ocorridas durante a coevolução entre a planta hospedeira e o fitopatógeno (BARBIERI; CARVALHO, 2001; CARVALHO et al., 2008). Por isso, a teoria gene-a-gene ainda é aceita, e pode estar relacionada aos mecanismos comuns ou semelhantes de reconhecimento e transdução de sinal. Há envolvimento desses diferentes mecanismos em vias de sinalização revelando a complexidade na resposta fisiológica da planta frente à infecção, provocando na maioria das vezes, uma cascata de sinalização envolvendo diversos genes (ZHANG et al., 2007).

Durante a interação com o patógeno vários mecanismos de defesas podem ser acionados pela planta. A resposta na interação planta-patógeno, e/ou planta-ambiente, pode levar a modulação da transcrição. Essa modulação pode ser fundamental para ativação de respostas intracelulares diante de diferentes condições de estresse (DRÖGE-LASER et al., 1997). Os mecanismos de respostas podem ser regulados por proteínas que podem mediar vias de sinalização utilizadas como mecanismos de defesa (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006). A abundância de proteínas pode significar resposta a um estresse específico e pode revelar respostas de genes responsivos aos variados estresses, por isso a proteômica pode ser uma ferramenta poderosa no estudo de função gênica, e explorar o mecanismo de resistência, por meio de estratégias envolvendo genômica funcional incluindo estudos proteômicos, pode fornecer informações importantes sobre resposta ao estresse biótico e abiótico.

2.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

A necessidade de entender melhor a funcionalidade celular, considerando a abundância proteica, exigiu o desenvolvimento de técnicas mais acuradas de análises. Inicialmente, a proteômica era primariamente realizada por eletroforese em gel bidimensional (2-DE), técnica que permite a separação de centenas de proteínas

a serem analisadas qualitativamente e quantitativamente, para obtenção do proteoma diferencial. No entanto, essa técnica apresenta algumas limitações incluindo dificuldade na separação de proteínas com pontos isoelétricos extremos e a necessidade de grande quantidade de proteínas. Esses foram os principais motivos que evidenciaram a necessidade de novas técnicas para superar as limitações das convencionais baseadas em gel (SIZOVA et al., 2007; ABDALLAH et al., 2012). Vale ressaltar que alguns trabalhos que aplicando técnicas mais acuradas, podem utilizar uma etapa em gel SDS-PAGE como uma forma de pré-tratamento da amostra, para remoção de impurezas como detergentes da solubilização da amostra, tampões entre outros compostos que podem comprometer a integridade do equipamento e/ou podem ser contaminantes detectados em nanoLC-MS/MS por exemplo (SHEVCHENKO et al., 2007; LUNDBY; OLSEN, 2011).

Os avanços na instrumentação da espectrometria de massa, assim como a melhoria de analisadores e cromatógrafos contribuíram significativamente para maior sensibilidade, necessidade de menores quantidades de material para análise, e produção de maior quantidade de dados quando comparados a análises 2-DE (SIZOVA et al., 2007; ABDALLAH et al., 2012; BARBOSA et al., 2012).

A análise proteômica vegetal avançou muito nos últimos anos com um vasto número de publicações, aplicando tal análise para estudo de interação planta-patógeno, com o objetivo de entender o que ocorre entre os organismos da interação (ROSSIGNOL et al., 2006; JORRÍN-NOVO; MALDONADO; CASTILLEJO, 2007). Dados do proteoma celular podem levar ao entendimento das mudanças moleculares que ocorre no patógeno durante a interação e quais estratégias desenvolvidas pela planta para sobreviver à ameaça do fitopatógeno, pois as plantas são capazes de gerar um ambiente de estresse no espaço extracelular entre parede celular e membrana plasmática, como uma primeira linha de defesa contra agentes patogênicos (GUPTA et al., 2014).

As mudanças no ambiente celular vegetal também são importantes para a análise da interação, e uma análise mais sensível foi possível com técnicas de cromatografia líquida em tandem-espectrometria de massas (LC-MS/MS do inglês *Liquid chromatography tandem-mass spectrometry*) (TULI; RESSOM, 2009). Alguns trabalhos de proteômica desenvolvidos na área de fitopatologia vão além da obtenção do proteoma total da planta (VILLETH et al., 2016; GUO et al., 2017) e/ou patógeno (VILLETH et al., 2009; SOARES et al., 2010; SANTOS et al., 2017). Esses

trabalhos visam, sobretudo, obter informações que contribuam para desvendar a complexidade de proteínas, composição e localização de proteínas que coordenam as atividades celulares (DI MAMBRO et al., 2017; IMKAMPE et al., 2017ab).

A aquisição de dados proteômicos, podem contribuir com a expansão de estudos comparativos e quantitativos da interação planta-patógeno (WU et al., 2013a), assim como análises mais específicas de proteínas (YUAN et al., 2013ab; TAKAHASHI et al., 2014) de compartimentos celulares (ALIFERIS; FABERT; JABAJI, 2004). A proteômica de diferentes componentes subcelulares em planta tem representado um grande auxílio na identificação de proteínas menos abundantes. O enriquecimento de amostras de cloroplasto, mitocôndria, núcleo, membrana plasmática e parede celular, pode contribuir para uma maior cobertura na identificação de proteínas (KIM; KANG, 2008; ROLLAND et al., 2012; BAYER et al., 2015), com a utilização de tecnologias avançadas de pesquisa incluindo a proteômica *shotgun*, composta por ferramentas que podem ser consideradas poderosas no estudo proteômico, pode fornecer resultados global na análise de produtos gênicos em diferentes tecidos, diferentes condições fisiológicas e no estudo da interação patógeno-planta. Com associação dos resultados disponibilizados por projetos de sequenciamento de genoma, o desenvolvimento de métodos analíticos para caracterização de proteínas, a proteômica mostrou ser uma ferramenta poderosa na área de genômica funcional (APPELLA et al., 1995; WASHBURN et al., 2001; WOLTERS et al., 2001; PARK, 2003).

2.4.1 Proteômica *shotgun* e LC-MS

A automação em análise proteômica tem sido um passo importante para análise em larga escala e para garantir a reprodutibilidade e confiança nos resultados. Para alcançar esse objetivo, sistemas automatizados têm sido desenvolvidos para permitir a separação de proteínas com métodos livres de gel, como por exemplo, a cromatografia líquida de fase reversa acoplada ao sistema de espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS). A cromatografia líquida de ultra desempenho (*UPLC- Ultra Performance Liquid Chromatography*) associada a MS tem ganhado cada vez mais espaço em análises proteômicas. Trabalhos utilizando essa metodologia têm sido realizados em diferentes organismos, inclusive em plantas (WASHBURN; WOLTERS; YATES III, 2001; NÄGELE et al., 2004).

A técnica *UPLC* tem o objetivo de melhorar a resolução dos espectros (velocidade, análise e sensibilidade), em relação aos dados obtidos por *HPLC* (*High Performance Liquid Chromatography*). Para análises cromatográficas por *UPLC*, as amostras utilizadas são micropartículas, o que promove economia de tempo e conseqüentemente redução no consumo de solvente (JERKOVICH; MELLORS; JORGENSON, 2003). O princípio da técnica está baseado na utilização de uma fase estacionária com partículas de menos de 2 μm , uma vantagem frente à técnica *HPLC*, onde as colunas são preenchidas com partículas de 3-5 μm . Além disso, a utilização de partículas menores promove a maior velocidade e capacidade de pico (número de picos por unidade de tempo) o que caracteriza o ultra desempenho (JERKOVICH; MELLORS; JORGENSON, 2003).

A cromatografia multidimensional pode promover maior automação, aproveitando as diferentes características das proteínas para separá-las em colunas de propriedades distintas ou em coluna bifásica. No processo cromatográfico multidimensional, a fração eluída na primeira coluna pode ser diretamente introduzida em uma segunda que pode ser diretamente acoplada ao espectrômetro de massa, conhecida como a MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*), técnica inserida na proteômica *Shotgun* (Figura 7). Na proteômica *shotgun* as proteínas são digeridas por enzimas específicas para serem reduzidas a peptídeos que por sua vez serão sequenciados por fragmentação em espectrômetro de massa em *tandem*. O padrão de fragmentação é validado por comparação de sequências de proteínas disponibilizadas em banco de dados (MAcCOSS; WU; YATES, 2002). Essa abordagem *shotgun* pode proporcionar melhor resolução dos proteomas favorecendo a identificação de proteínas menores e menos abundantes na amostra. Em técnicas dependentes de gel, proteínas menos abundantes podem ser perdidas (WASHBURN; WOLTERS; YATES III, 2001).

A maior cobertura na proteômica *shotgun* é possível, uma vez que a solução contendo peptídeos originados de uma digestão proteolítica prévia é diretamente injetada no cromatógrafo líquido associado ao espectrômetro de massa, com o objetivo de separar os peptídeos por fase reversa. Após a separação desses peptídeos, eles são submetidos à ionização e direcionados para sequenciamento MS/MS. O sequenciamento MS/MS tem sido facilitado devido a espectrômetros de massas capazes de gerar milhares de espectros provenientes de uma única análise LC-MS/MS (PENNINGTON; DUNN, 2001). Os avanços tecnológicos aplicados ao

estudo do proteoma utilizando o método *shotgun* permite a substituição gradativa dos métodos de separação em gel, principalmente pela rapidez das técnicas e elevada cobertura de proteínas da amostra (KIM *et al.*, 2015; KWON *et al.*, 2017; SZYMANSKI *et al.*, 2017).

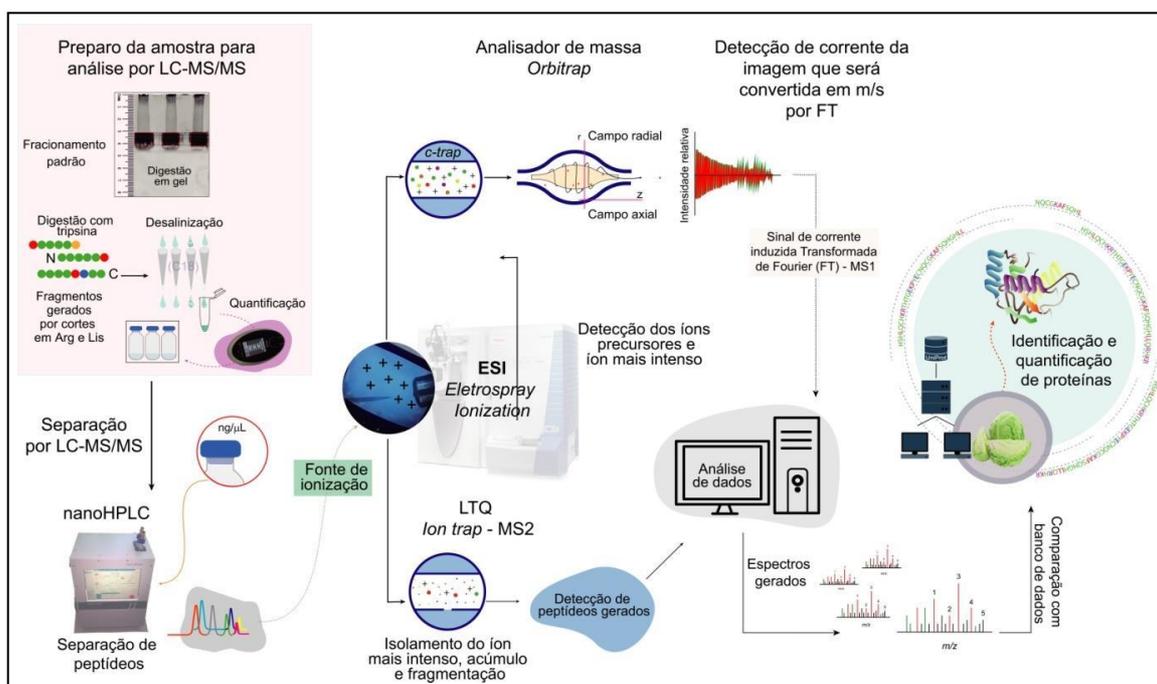


Figura 7. Ilustração do fluxo de trabalho da proteômica *shotgun*.

Devido ao grande número de dados gerados por análise foi necessário o desenvolvimento de ferramentas que possibilitassem a identificação dos peptídeos sequenciados e das proteínas (HAAS *et al.*, 2006). A identificação de peptídeos com maior confiança foi permitida graças ao desenvolvimento de instrumentos híbridos que vieram substituir equipamentos como FT-ICR (do inglês *Fourier transform ion cyclotron resonance*). Apesar da acurácia dos equipamentos FT-ICR, na medida de massas, não eram eficazes quando acoplados a técnicas de separação e aplicação em experimentos de larga escala, principalmente devido ao longo tempo de aquisição dos dados MS/MS, além disso, na separação cromatográfica resultante alta variabilidade de íons (OLSEN *et al.*, 2009).

Os instrumentos híbridos vieram para minimizar as limitações dos FT-ICR. Esses instrumentos são espectrômetros de massa em tandem, que podem ser projetados combinando analisadores de massa (*Time-of-flight – TOF; Quadrupole – Q; 3D Ion Trap – 3D-IT; Linear Ion Trap – LIT; Orbitrap; Fourier Transform-Ion*

Cyclotron Resonance). Os instrumentos híbridos, por exemplo os instrumentos de LTQFT (*LTQ FT Ultra instrument*), combinam alta acurácia e velocidade na aquisição de dados MS/MS, com a utilização do algoritmo “transformada de *Fourier*” (*FT-Fourier Transform*) com o sistema “*ion-trap* linear” acoplado ao *Orbitrap*, promovendo resultados de alta qualidade. O instrumento *Orbitrap* são considerados um dos mais sofisticados analisadores na área de espectrometria de massa (OLSEN *et al.*, 2009; SCIGELOVA *et al.*, 2011).

O instrumento *Orbitrap*, um híbrido formado a partir da junção de dois analisadores, que basicamente aprisiona o íon, já na fase gasosa, introduzido posteriormente a partir da fonte ESI (*ESI-Electrosparay Ionization*). A fonte de ESI acoplada ao cromatógrafo líquido recebem os íons em fase gasosa que são direcionados ao interior do espectrômetro de massa (Figura 6). Esses íons móveis são presos em torno de um eletrodo, onde giram ao redor do eletrodo, sob a atração eletrostática que é compensada pela força centrífuga inicial. Os íons são atraídos e giram em trajetória espiral ao longo do eletrodo central, que limitam os íons axialmente devido à barreira potenciais criadas pelos eletrodos (SCIGELOVA; MAKAROV, 2006).

O equipamento permite o controle da frequência de oscilações (sobretudo as axiais), moldando de forma adequada os eletrodos, levando a detecção de corrente da imagem, convertida em m/z por FT (*Fourier transform*), ou seja, o algoritmo FT converte dados de frequência gerados pelo *Orbitrap* em espectro de massa (m/z). Como citado anteriormente esses analisadores híbridos compartilham recursos, entre eles, um sistema de detecção de imagem atual e a utilização de operações matemáticas do FT que podem gerar os espectros. Esses equipamentos também são chamados de FT-MS, espectrômetros de massas baseados em transformada de Fourier (*Fourier transform-based mass spectrometers FT-MS*) (SCIGELOVA *et al.*, 2011). No presente estudo foi utilizado o espectrômetro de massa *Orbitrap* (*Thermo Fisher Scientific*) para identificação de proteínas em folhas de brássica.

A precisão de massa é um parâmetro crucial na obtenção de dados em experimentos proteômicos, (COX; MANN, 2009), entretanto, a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis está associada à forma de preparo da amostra, ou seja, eficiência da digestão de proteínas. A obtenção de maior cobertura proteômica e melhor estimativa das quantidades de proteínas pode aumentar a confiança na utilização dessa técnica, por isso protocolos para melhor geração e

recuperação de peptídeos, como também a identificação e quantificação de proteínas através da cromatografia líquida, estão sendo constantemente aprimorados (LÉON-REINA *et al.*, 2013). Atualmente duas abordagens para quantificação de proteínas por LC-MS/MS são utilizadas, a dependente de marcação (*label-dependent*) e a sem marcação (*label-free*). A proteômica comparativa *label-free* vêm ganhando espaço, pois além de serem mais simples podem oferecer menores custos ao processo.

2.4.1.1 Proteômica quantitativa *label-free*

A proteômica *shotgun* pode ser dividido em dependente de marcação (*stable isotope-labeling*) e isenta ou livre de marcação (*label-free*). Utilizando o princípio de que as propriedades físico-químicas de compostos marcados com isótopos podem ser idênticas às propriedades dos análogos naturais, exceto em massa, foram incorporados às análises proteômicas por LC-MS a utilização de moléculas marcadas com isótopos. A partir disso a metodologia *label-dependent* foi desenvolvida para análises proteômicas quantitativas *shotgun*.

Na metodologia *label-dependent* pode haver diversas maneiras de introduzir os isótopos incluindo a adição metabólica (^{15}N , ^{13}C ou SILAC) (MONTEOLIVA; ALBAR, 2004; GULCICEK *et al.*, 2005), enzimática ou proteica (marcação com $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, ICPL) (McMASTER, 2005), ou adição química (p.e iTRAQ, TMT) entre outros (VEENSTRA, 2007; BANTSCHIEFF *et al.*, 2007; ONG; MANN, 2005; ZHANG *et al.*, 2013). Apesar de ser considerada por décadas uma técnica valiosa na quantificação de proteínas em amostras complexas, a abordagem *label-dependent* pode apresentar limitações. As limitações incluem, fase experimental laboriosa e complexa para preparação de amostras, necessidade de alta concentração de amostras, ocorrência de marcação incompleta, necessidade de softwares específicos, e principalmente o alto custo. Essas limitações puderam contribuir significativamente para o desenvolvimento de metodologias *label-free* na rotina de laboratórios, método que promove quantificações mais rápidas, limpas e protocolos experimentais mais simples (YI; GOODLETT, 2003; OLD *et al.*, 2005; CHEN; YATES III, 2007; PATEL *et al.*, 2009).

No método *label-free* a amostra pode ser preparada separadamente e submetida a correções individuais pelas técnicas de análise (LC-MS/MS ou LC/LC-

MS/MS). Diferente do método *label-dependent* onde a análise pode ser feita a partir de diferentes combinações de proteínas, ou seja, baseada em padrões previamente conhecidos, sendo necessário um padrão na amostra por ser considerado um método de quantificação absoluta. Esses padrões adicionados têm a concentração previamente conhecidas para a detecção de uma substância (peptídeo/proteína) (GERBER *et al.*, 2003). Nessa tese foi utilizada abordagem *label-free*.

No método *label-free* duas categorias de medidas são utilizadas para a quantificação, uma baseada nas medidas de mudança de pico em cromatografia e outra pela contagem de espectros gerados para proteínas após a análise MS/MS (BANTSCHOFF *et al.*, 2012). Ambas as categorias são medidas para corridas individuais de LC-MS/MS ou LC/LC-MS/MS, e a abundância de proteínas são calculadas com a comparação direta entre as diferentes análises. Em suma, a abundância dos peptídeos obtidos em cada aquisição LC-MS/MS é oriunda de amostras individuais. Os espectros gerados poderão ser alinhados entre diferentes corridas, na tentativa de eliminar as discrepâncias cromatográficas do tempo de retenção, uma vez que o mesmo peptídeo não está presente em uma mesma varredura MS1 (ZHU; SMITH; HUANG, 2009). Em identificação em larga escala, utilizando aquisições dependente de dados, é realizada uma varredura inicial em dados MS1, onde os precursores dos peptídeos são identificados pela primeira vez para depois os picos mais elevados serem selecionados. Os picos mais elevados depois de selecionados são fragmentados para gerar os dados correspondentes ao espectro MS2 (RARDIN *et al.*, 2015).

Na metodologia *label-free*, quatro métodos, sendo que três mais comuns podem ser utilizados: 1- o método de contagem espectral, 2 - o método de contagem de peptídeos e o 3 - método de intensidade de íon peptídeo. O método de contagem espectral (1), utilizado para comparar a abundância diferencial dos espectros MS/MS oriundos de peptídeos de uma dada proteína nas amostras (caso: controle) por análise LC-MS/MS (OLD *et al.*, 2005). O princípio do método consiste basicamente na hipótese de que quanto mais abundante é uma determinada proteína pode haver mais espectros MS/MS de peptídeos correspondentes que poderão ser coletados (FLORENS *et al.*, 2002). O método de contagem de peptídeos (2) corresponde basicamente em utilizar o número total dos peptídeos identificados oriundos de uma proteína (GAO *et al.*, 2003). O método de intensidade de íon peptídeo (3), por sua vez mede a intensidade iônica de um determinado peptídeo, um método

“dependente de dados” (*MSscan*; *Zoom Scan* e *MS/MS Scan*) para a coleta de dados MS, que utiliza a área sob a curva e compara a abundância relativa de um determinado peptídeo. Esses três métodos citados acima, relacionam a abundância proteica relativa com as estatísticas de amostragem que são obtidas por *MS/MS tandem* (PRAKASH *et al.*, 2006; RADULOVIC *et al.*, 2004; TULI; RESSOM, 2009).

O quarto método da metodologia *label-free*, menos utilizado, é o método que consiste na comparação de intensidade de íon. Um método que utiliza os dados provenientes da *LC/MS* comparando íons diferentemente abundantes em pontos específicos no espectro (*m/z* e tempo de retenção, *RT – Retention Time*). Utiliza a intensidade de sinal de um íon precursor com alta resolução (o que pode facilitar a “extração” do sinal do peptídeo no nível *MS1*). Baseia-se no princípio de que a intensidade de um determinado peptídeo é proporcional à concentração dos íons detectados em *ESI-MS (Electrospray Ionisation Mass Spectrometry)* (TULI; RESSOM, 2009).

Com essas informações pode-se inferir, que a reprodutibilidade dos experimentos nos métodos *label-free*, e o alinhamento adequado dos espectros gerados nas corridas *LC-MS*, são de suma importância para obter dados confiáveis e representativos nas diferentes amostras estudadas, considerando, que dependendo do objetivo, essa metodologia permite a comparação de várias condições, não só em pares. Pode ser intimamente relacionada à análise computacional para realizar a análise, e à quantificação relativa, de biomoléculas múltiplas. A necessária análise computacional depende da utilização de plataformas analíticas, poder computacional e algoritmos de bioinformática. No entanto a eficiência dos métodos de informática é totalmente dependente de um padrão entre as corridas *LC-MS/MS* que reflete a reprodutibilidade do experimento. A reprodutibilidade da técnica pode ser garantida com o desenvolvimento de desenho experimental cuidadoso, utilização de protocolos padrão, o controle das condições experimentais. Vale ressaltar o uso de réplicas (biológicas e/ou técnicas) além da manutenção, com melhores métodos de calibração externa, são importantes para garantir a reprodutibilidade (BAGGERLY; MORRIS; COOMBES, 2004).

2.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

O grande interesse e investimento em análises genômicas têm levado ao aumento exponencial de dados anotados em banco de dados. Várias tecnologias têm permitido a análise da expressão de milhares de genes simultaneamente. A técnica de microarranjos, por exemplo, foi bastante utilizada para estudos da expressão de genes desde o final da década de 70 e contribuiu para a melhor compreensão do perfil de expressão de milhares de genes em plantas (MOCELLIN; ROSSI, 2007; GUINDALINI, TUFIK, 2007). Outras técnicas, incluindo ESTs (do inglês *Expression Sequence Tags*), SAGE (do inglês *Serial Analysis of Genes Expression*) e MPSS (do inglês *Massively Parallel Signature Sequencing*), também contribuíram para a identificação de muitos transcritos (revisado por YADAV et al., 2018). O sequenciamento de nova geração (NGS – do inglês *Next Generation Sequencing*) tem evoluído rapidamente tornando-se uma alternativa poderosa na geração de uma grande quantidade de dados (GUIGO; HOON 2018; BAHLO et al., 2018).

No entanto, apesar de muitas sequências de genoma e transcriptoma, terem sido disponibilizadas, e da possibilidade de obter os níveis de expressão de um determinado gene, determinar a função gênica é ainda o principal desafio da era pós-genômica (FIALHO; MORENO; ONG, 2008). Mesmo que essas tecnologias de larga escala sejam poderosas para a análise global da expressão gênica, abundância de proteínas, metabólitos e outras moléculas funcionais em diferentes tecidos (OHTSU et al., 2007), a complexidade dos sistemas biológicos sob qualquer estímulo pode ser desafiadora pois, apesar do produto de muitos genes codificarem proteínas, os níveis proteicos não refletem os níveis de transcritos de um gene (STRACHAN; READ, 2016). Além disso, a célula pode produzir proteínas e muitas podem ser modificadas pós-traducionalmente.

Um dos objetivos da genômica funcional tem sido validar e analisar a função de genes, e a superexpressão em sistemas-modelo é a técnica mais utilizada. A planta modelo *A. thaliana*, por exemplo, pode facilitar o estudo, pois além do ciclo de vida curto, genoma pequeno e facilidade em análises mutagênicas, a transformação por *floral dip* utilizando *Agrobacterium tumefaciens* apresenta eficiência, viabilizando a produção em larga escala de linhagens transgênicas (TRIVILIN, 2014). Outro objetivo da superexpressão é a produção em larga escala de proteínas, para

purificação e análise estrutural, realização de ensaios de atividade antimicrobiana, cristalografia e até mesmo para terapia medicamentosa. Para a realização desses ensaios, é necessária a obtenção de grande quantidade de proteínas, podendo-se utilizar diferentes sistemas de expressão que foram desenvolvidos incluindo bactérias (sistema atualmente mais utilizado), leveduras, células de insetos, mamíferos e plantas (YESLIRMAK; SYERS, 2009; VYACHESLAVOVA et al., 2012; GOMES et al., 2018; PELLIZA et al., 2018).

Os vetores comumente utilizados para a produção de plantas transgênicas são os sintetizados com promotores baseados em plasmídeo Ti (do inglês *tumor-inducing*) em *Agrobacterium*, em vírus incluindo o CaMV, (ODELL et al., 1985, revisado por LOW et al., 2018) e em plantas como o *Ubiquitin* (*RUBQ1*, *RUBQ2* e *RUBQ3*), SRC, SRK (SIVAMANI; QU, 2006; CHIERA et al., 2007; HERNANDEZ-GARCIA et al., 2009). Três grupos de promotores podem ser utilizados para estudos de genômica funcional: 1) os promotores constitutivos que podem estar ativos em vários estágios do desenvolvimento, podendo participar diretamente da manutenção da expressão do gene de forma moderada ou constante; 2) os promotores específicos de tecidos proporcionando a expressão do gene em tecidos ou estágios específicos de desenvolvimento e por fim 3) os promotores induzíveis, que podem receber grande influência da variação das condições ambientais, uma característica que pode permitir a regulação de genes através de fatores externos (HERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; LOW et al., 2017). O promotor constitutivo 35S (CaMV 35S) é o mais comumente utilizado para produção de plantas transgênicas.

O Vetor pode ser inserido na planta e o gene expressar de duas formas: 1) de forma estável ou 2) transiente. Na primeira forma, o transgene é inserido no genoma da célula tornando-se parte do genoma do hospedeiro, na segunda, o transgene não se torna parte do genoma e as cópias inseridas não são replicadas, e podem ser perdidas após alguns dias através da divisão celular (GELVIN, 2005).

A superexpressão de genes em planta modelo tem auxiliado na análise de expressão diferencial e na elucidação da participação de genes na resposta da planta em condições ambientais variadas, principalmente de genes relacionados com a defesa da planta aos diferentes patógenos (HOWE; HANDER, 2008; MITHÖFER; BOLAND, 2012; CHAURASIA, et al., 2017; revisado por LOW et al., 2018). O fato de muitos dos genes, anotados no banco de dados incluindo os de *B. oleracea* var. *capitata*, não possuírem provas experimentais da função, tem

demonstrado a grande necessidade de realização de estudos que contribuam para a validação funcional desses genes (BROWN; SJÖLANDER, 2006; HRMOVA et al., 2006; FARROKHI et al., 2009). Essas análises contribuem para a robustez dos dados disponíveis nos bancos de dados, pois não dependem diretamente de homologies que são utilizados para as anotações, que muitas vezes podem ser dificultadas pela falta de acurácia, erros e/ou sequencias curtas.

Em espécies de *Brassica*, alguns estudos já foram realizados visando validar a função de genes potencialmente responsivos ao estresse, entretanto, estudos voltados para a validação de genes em resposta a bactérias são limitados. Estudos recentes realizados em plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando genes de *B. napus* envolvidos na via de glicosinolatos (GSLs), revelaram que as plantas transgênicas mostraram sintomas menos graves que em plantas controles, não transformadas (ZHANG et al., 2015). Em outro trabalho recente, o gene *BrWRKY12* do repolho chinês foi isolado, e a superexpressão desse gene em *Arabidopsis* conferiu maior resistência à *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (Pcc), causadora da podridão bacteriana em várias culturas. A superexpressão do gene *BrWRKY12* contribuiu ainda para o aumento da expressão de outros genes relacionado à defesa (KIM et al., 2014).

As ferramentas de sequenciamento disponíveis podem ter revolucionado a área da biologia molecular e celular, permitindo a identificação e a disponibilização de sequências completas de genes em bancos de dados. No entanto, a determinação da função gênica constitui ainda um desafio da área pós-genômica (GONZÁLEZ-RECIO, 2011; GALLAGHER; CHEN-PLOTKIN, 2018). A genômica funcional contribui para a identificação de genes e avaliação da abundância dos respectivos transcritos e podem nortear a avaliação da função de um determinado gene por transgenia, possibilitando dados para maior precisão das sequências disponibilizadas nos bancos de dados. Além disso, pode fornecer informações importantes com grande potencial biotecnológico em melhoramento genético de plantas.

3 OBJETIVOS

Identificar e validar a função de genes potencialmente envolvidos na resistência de *B. oleracea* a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar amostras de proteínas de extrato total de folha e de cloroplastos de plantas da espécie *B. oleracea*, moderadamente suscetível e suscetível, infectadas por Xcc;
- ✓ Identificar as proteínas diferencialmente abundantes em plantas inoculadas quando comparadas com plantas não inoculadas;
- ✓ Validar a função de 1 a 3 genes envolvidos na resistência de *B. oleracea* a Xcc por superexpressão em planta modelo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

No presente trabalho, foram utilizados dois cultivares de *B. oleracea* var. *capitata*, cultivar resistente (Atrus Plus – Chile/Seminis®) e cultivar suscetível (Veloce – Brasil/Agristar®). A resistência e suscetibilidade entre Astrus Plus e Veloce foram previamente observadas em experimentos prévios realizados no laboratório (LGP – EMBRAPA) onde o presente estudo foi desenvolvido (Figura Suplementar, Figura S1). As plantas foram mantidas em casa de vegetação por aproximadamente 45 dias (desde o momento do semeio até a fase experimental).

4.2 CULTIVO DA BACTÉRIA Xcc e infiltração das folhas

O isolado de *X. campestris* pv. *campestris* – Xcc51 (CNPH), cedido da coleção de culturas de bactérias da EMBRAPA Hortaliças foi cultivado em meio NYG (Daniels et al., 1984). Um total de três inóculos de Xcc ($OD_{600} = 0,6$) foram preparados para infiltração das plantas, para compor três réplicas biológicas independentes. Plantas controle foram infiltradas com solução salina (NaCl 0,85%).

Folhas jovens de plantas da mesma idade, estágio III, fase juvenil (CARVALHO et al., 2008b) e com tamanhos aproximados foram utilizadas para o experimento. Cinco folhas de três plantas por réplica biológicas foram infiltradas com solução bacteriana em solução salina ($OD_{600} = 0,6$), com o auxílio de uma seringa sem agulha. As folhas foram coletadas 24 h pós-inoculação (hpi) e rapidamente imersas em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C. O material pulverizado foi imediatamente utilizado para isolamento de cloroplasto e mantido a -80 °C até o momento da extração de proteínas.

4.3 ISOLAMENTO DE CLOROPLASTO

O isolamento do cloroplasto foi realizado por gradiente *percoll*, segundo KLEY e colaboradores (2009), utilizando o gradiente *percoll* 40 :80% segundo o protocolo comercial (*Sigma Aldrich*). Para diluição do *percoll* foi utilizado o tampão de extração de cloroplasto 1X (0,3 M de sorbitol; HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$) 50 mM pH 7,5, ajuste do pH com hidróxido de potássio KOH; ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 5 mM; cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 1 mM; bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) 10 mM). O

gradiente *percoll* foi preparado antes do início do procedimento. Para o preparo do gradiente de *percoll*, 2,5 mL de *percoll* 80% foram transferidos para um tubo de 15 mL, em seguida, cuidadosamente, foram adicionados 5 mL de *percoll* 40% (nesta ordem) e o tubo foi armazenado a 4 °C. Em seguida, aproximadamente 2 g de folhas inoculadas com Xcc pulverizadas em nitrogênio líquido, foram adicionados a 12 mL de tampão 1 X com Ditioneitol (DTT) 0,5 M (adicionado no momento do uso) e homogeneizado com bastão de vidro. O material foi filtrado, rapidamente, com tecido de nylon em tubo de 50 mL para remoção do excesso de material foliar. As amostras foram centrifugadas (1000 x g/ 7 min/ 4 °C/ rotor *swing*). O sobrenadante foi removido, e foram adicionados ao precipitado 2 mL de tampão de extração de cloroplasto 1 X e homogeneizados com cuidado. A amostra foi transferida para o tubo de 15 mL contendo o gradiente *percoll*, previamente preparado e mantidos à 4 °C, com cuidado. A amostra em gradiente *percoll* foi centrifugada a 3200 x g (15 min/4 °C/ rotor *swing*). As fases formadas, composta por cloroplasto intacto e quebrado, foram imediatamente transferidas para novo tubo e frações de 0,5 mL foram distribuídas em tubos de microcentrífuga de 2 mL, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até o momento de extração de proteínas. O processo de isolamento foi realizado em ambiente com baixa claridade.

4.4 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA E PREPARO PARA ANÁLISE EM nanoLC-MS/MS

Proteínas foliares e de cloroplasto foram extraídas conforme Mot e Vanderleyden (1989), com modificação para a extração de cloroplasto. Para as amostras de cloroplasto, a proporção 1:2 de tampão de extração de proteínas e fenol (respectivamente) foi utilizada. Após a extração, a solubilização das proteínas foi realizada com tampão de solubilização constituído por 7 M de ureia; 2 M de tiureia, 4% de CHAPS e 5 mM de DTT adicionado no momento do uso. As proteínas solubilizadas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As etapas seguintes foram realizadas no departamento de Bioquímica e no Serviço Central de Apoio a Investigação – SCAI/Universidade de Córdoba – UCO, Espanha (material folha total) e na Universidade Federal do Rio de Janeiro (cloroplasto).

4.4.1 Fracionamento padrão por eletroforese em gel de acrilamida

O método de fracionamento padrão em gel de acrilamida a 12% foi utilizado para aquisição de bandas únicas para análise por *Orbitrap* (VALLEDOR; WECKWERTH, 2014). O tamanho do gel concentrador e separador foi de 3 e 4,5 cm, respectivamente. Foram aplicados no gel 100 µg de proteínas homogeneizada com tampão de amostra 2 X (Laemmli, 1970) e mantidas por 5 min a 95 °C. As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12% (gel de 8 cm x 8,5 cm x 0,75 mm) e a eletroforese foi realizada por 50 min a 80 V. Tempo aproximado para a amostra migrar para o gel separador. Após as amostras entrarem no gel separador, e a separação total das bandas marcaram 1 cm medido na régua (Figura S2) , a eletroforese foi interrompida e as bandas foram excisadas do gel, cortadas em pedaços pequenos com auxílio de um bisturi e transferidas para tubos de 1,5 mL e armazenadas a 4 °C até a etapa de digestão proteica (Figura 7) que foi realizada em gel, seguida por limpeza em uma coluna C18.

4.4.2 Digestão de proteínas

A digestão das proteínas foi realizada de acordo com VALLEDOR e WECKWERTH (2014). Resumidamente, as bandas armazenadas na etapa anterior foram descoradas em bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 200 mM em acetonitrila (ACN) 50% por 15 min, sob leve agitação, e em seguida por 5 min em ACN 100% (com quantidade suficiente para cobrir o gel). As proteínas foram reduzidas em bicarbonato de amônio 25 mM com DTT 20 mM (adicionado no momento do uso) e incubadas por 20 min a 55 °C. Foram adicionados 40 mM de iodoacetamida ($\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$) em bicarbonato de amônio 25 mM e os tubos foram mantidos durante 20 min no escuro. Posteriormente, as bandas de proteínas foram lavadas duas vezes em 25 mM de bicarbonato de amônio. A digestão proteolítica foi realizada por adição de tripsina (*Promega, Madison, WI*), 5 µg de enzima em bicarbonato de amônio 25 mM, e as amostras foram incubadas *overnight* a 37 °C. A digestão de proteínas foi interrompida com a adição de ácido trifluoroacético 1% (TFA – *trifluoroacetic acid*). As amostras foram concentradas por centrifugação a vácuo (*SpeedVac*). A extração dos peptídeos tripticos foi realizada adicionando 50 µL de solução de extração (ACN 95% - TFA 5%). A solução foi recuperada para um novo tubo e o processo foi repetido por mais 2 vezes. As amostras foram concentradas por centrifugação a

vácuo (*CHRIST RVC 02-25 CO plus/CHRIST CT 02-50 SR*), e em seguida solubilizada com 30 μL de ácido fórmico (CH_2O_2) 0,1%, quantificada usando Qubit™ fluorômetro (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, e em seguida preparada para a análise por nanoLC-MS/MS.

As amostras foram dessalinizadas em microcoluna C18 (POROS 20 R2), em seguida concentrada por centrifugação a vácuo (*CHRIST RVC 02-25 CO plus/CHRIST CT 02-50 SR*). As amostras foram solubilizadas com ácido fórmico 0,1%. Foi injetado 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, para cada réplica técnica, em um sistema nanoLC-MS, as amostras foram carregadas em uma coluna, com gradiente empregando 0,1% de ácido fórmico na fase móvel A e 0,1% de ácido fórmico e 90% de acetonitrila na fase móvel B durante 180 min com fluxo controlado de 400 nL/min de 5 a 35% de fase B. O efluente da coluna nLC foi diretamente eletropulverizado para um espectrômetro de massa *Orbitrap* (Figura 7).

4.5 AQUISIÇÃO DE DADOS

Os peptídeos catiônicos (com carga elétrica positiva) eluídos foram convertidos a íons em fase gasosa. A conversão ocorreu com ionização por eletropulverização e analisadas em um sistema *Orbitrap Fusion* (amostras de extrato total de folhas) e *Orbitrap Velos* (amostras de cloroplasto isolado). O espectrômetro de massa foi operado em modo positivo. As verificações da pesquisa de precursores peptídicos de 400 a 1500 m/z foram realizadas em resolução de 12 K (a 200 m/z) com uma contagem de íons alvo de 5×10^5 . *Tandem MS* foi realizada pelo isolamento em 1 *Th* (*Thompson = atomic mass unit/número de cargas elementares*), com o quadrupolo, fragmentação CID com uma energia de colisão normalizada de 35, e análise rápida de varredura MS na captura de íons. Na contagem de íons alvo, o controle automático de ganho (do inglês *Automatic Gain Control AGC*), foi definido para 102 e o tempo máximo de injeção foi de 75 milissegundos. Apenas os precursores com estado de carga 2-6 foram amostrados por MS2. A duração da exclusão dinâmica foi definida em 15 segundos com uma taxa de tolerância em torno de 10 ppm dos precursores selecionados e seus isótopos. A seleção de precursores monoisotópicos foi ativado. O instrumento foi executado no modo de velocidade máxima com ciclos de 3 s, ou seja, o instrumento realizou MS2 continuamente até que a lista de precursores não excluídos diminuísse a zero ou 3

s, o que for menor. Arquivos (formato *RAW data*) foram gerados contendo todas as informações obtidas durante a análise (ENG; SEARLE et al., 2011).

4.6 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os espectros adquiridos (contidos no *RAW data*) foram submetidos a ferramentas computacionais para análise e validação de dados obtidos por LC-MS/MS. Os dados foram processados pelos softwares *Progenesis Q1 non linear dynamics* (Waters, Durham, North Carolina, USA) e *PEAKS® 7* (Bioinformatics solutions Inc., Waterloo, Canada). Os espectros MS/MS foram comparados com o banco de dados *UniProt_Brassica oleracea* em fevereiro de 2017 (www.uniprot.org). Foi realizada a comparação entre os perfis de proteínas de plantas resistente inoculadas e a condição controle (RI:RC) assim como a comparação entre plantas suscetíveis inoculadas e o controle (SI:SC). Método *Label-free* foi utilizado para quantificação das proteínas. Inicialmente, os dados brutos foram processados para alinhamento dos espectros pelo tempo de retenção e *m/z* no *Progenesis Q1*, e os eventos detectados foram quantificados baseados em *XIC* (área do pico extraído). A quantificação dos eventos foi comparada e os eventos que apresentaram diferença significativa entre as condições ($p < 0,05$) foram selecionados para identificação. Somente peptídeos com melhor escore (*rank* 1-5) foram considerados para os passos subsequentes (ENG et al., 2013) e exportados para identificação utilizando o software *PEAKS® 7*. Os espectros de MS/MS foram pesquisados contra o banco de dados. Os parâmetros de pesquisa foram: inclusão de peptídeos gerados a partir de uma digestão tríptica com até duas perdas de clivagem, carbamidometilação de cisteína como modificação fixa e oxidação de metioninas como modificação variável. A tolerância de massa de íons precursores foi de 10 ppm e de fragmentação de íon foi de 0,5 Da. Os *PSMs* (do inglês *Peptide Spectral Matches*) foram validados usando o filtro de dados com base em *p-values* a um FDR máximo de 1% (ELIAS; GYGI, 2007). Após a validação dos espectros MS/MS os dados gerados no *PEAKS® 7* foram exportados novamente para o *Progenesis Q1* para quantificação e refinamento das proteínas identificadas aplicando filtros para análise comparativa. Os filtros utilizados incluíram: proteínas identificadas por pelo menos um peptídeo único, ou dois ou mais peptídeos presentes em uma sequência proteica do banco de dados, a análise estatística para abundância de proteínas foram: *Anova p value*

$\leq 0,05$ e *Max Fold Change* de $\geq 1,5$ e a presença das proteínas em todas as réplicas. A partir desses parâmetros, com a obtenção dos dados de identificação e quantificação para as duas comparações (controle: inoculada), foi avaliada a correlação entre os dados. Os dados foram submetidos ao repositório *MassIVE* (do inglês *Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment*) (<https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/massive.jsp>) para acesso público. Foram realizados três ensaios: identificação de proteínas, análise de expressão de 30 genes e validação da atividade gênica. No primeiro ensaio, três réplicas biológicas e três réplicas técnicas para amostras de folha e de cloroplasto de *B. oleracea* foram analisadas primeiro por LC-MS/MS e segundo por RTq-PCR. No terceiro a superexpressão de genes potencialmente envolvidos na defesa da planta por superexpressão em planta modelo. Um esquema do desenho experimental foi desenvolvido para exemplificar o processo (Figura 8).

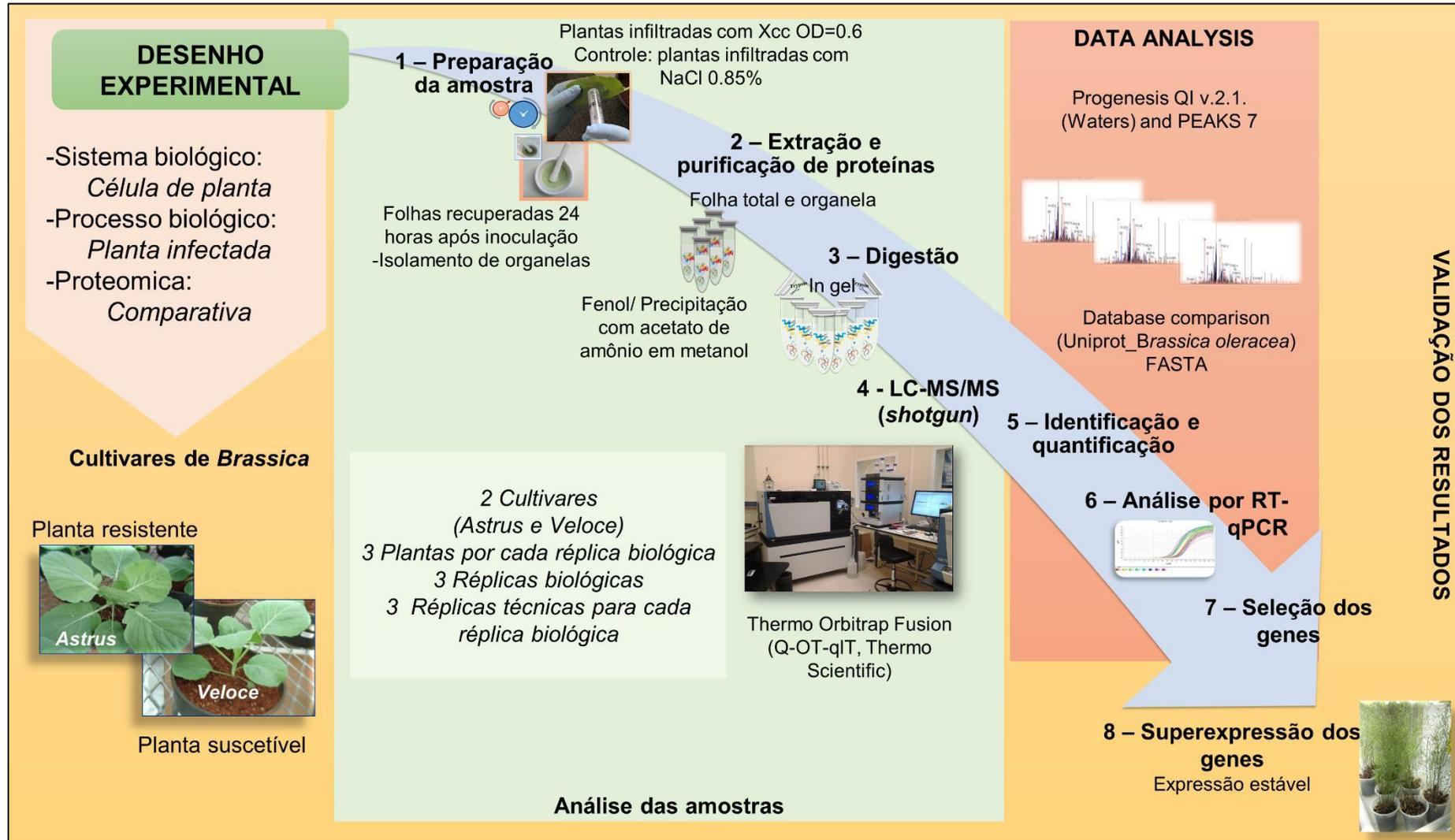


Figura 8. Desenho experimental com o delineamento do experimento aplicado para identificação das proteínas expressas por *B. oleracea* var. *capitata* na interação com a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e validação dos genes potencialmente envolvidos na defesa da planta.

4.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À DEFESA DA PLANTA

A partir da análise de abundância diferencial das proteínas, 30 genes foram selecionados para análise de expressão. A seleção baseou-se não apenas na abundância diferencial das proteínas (valores de *fold-change* $\geq 1,5$ e $\leq 1,5$), mas também na função biológica dos genes após análise de GO, e foram considerados ainda trabalhos prévios do laboratório (RIBEIRO et al., 2018; VILLET et al., 2016).

4.7.1 Desenho de primers

As sequências de nucleotídeos dos 30 genes foram submetidas ao software Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2007) para desenho dos primers para RTq-PCR (Tabela S1). Para escolha dos melhores primers o software *Oligo Analyzer 3.1* (www.idtdna.com/calc/alyzer) foi utilizado para analisar as características físicas dos primers desenhados. Foi utilizada a ferramenta *Primer-BLAST* do banco de dados NCBI para verificar a especificidade dos primers desenhados realizando uma PCR *in silico*. Para a seleção de 3 genes para superexpressão, além dos parâmetros citados anteriormente, considerou-se ainda a análise de expressão por RTq-PCR. As mesmas etapas para desenho dos primers de RTq-PCR foram utilizadas para desenho dos primers específicos (Tabela 1) para os genes putativos selecionados para superexpressão. Os genes *CHB4-like* (GAQY01039586), *ESP-like* e *RGP1-like*, que codificam as proteínas endoquitinase *CHB4 like* (A0A0D3BPL2), *epithiospecifier like* (A0A0D3CQU9) e *UDP-arabinopiranosose mutase like* (A0A0D3B9D8) foram selecionados para a superexpressão em planta modelo.

Tabela 1. Genes alvos utilizados para sequenciamento, de acordo com o número de acesso no banco de dados NCBI, informações dos primers específicos utilizados para os testes de confirmação de inserção dos genes de interesse e o tamanho do produto.

Gene	Proteína	Sequence (5'->3')	TM. (°C)	Tamanho (pb)
<i>CHB4 like</i>	Endoquitinase básica CHI4	ATGACCAGTTTGCTACTTTACTCA	60	818
		TTAACAAGTGAGGTTTTCTCCAGG	60	
<i>ESP like</i>	<i>Epithiospecifier</i>	ATGTCAGCCTAATTTCTCTC	55,8	680
		TTACGCGGAATTAAGTGCCTA	55,8	
<i>RGP1 like</i>	UDP-arabinopiranosose mutase 1	ATGGTTGAACCGGCGAATA	60	767
		CATCCAGCCCACATATCGT	60	

4.7.2 Seleção dos genes de referência

A seleção dos genes de referência, tanto para *Brassica* quanto *Arabidopsis*, foi baseada nos dados já descritos na literatura. Foram selecionados 3 genes para cada espécie potencialmente ideais para normalização da expressão gênica. Os genes estudados para *Brassica* foram os codificadores das proteínas: proteína da família SAND (*SAND*), proteína de ligação TATA-box 1 (*TBP1*), e ubiquitina (*UBQ1*). Os genes codificadores das proteínas: Actina 2 (*ACT2*), fator de alongação 1-alfa (*EF-1 α*) e proteínas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), foram selecionados para normalização da expressão em *Arabidopsis*. Os dados dos primers para RTq-PCR estão agrupados na tabela (S1), no apêndice 1. A estabilidade da expressão dos genes foi calculada utilizando o algoritmo *GeNorm* versão 3.5 (ETSCHMANN et al., 2006), que calcula a média de estabilidade da expressão resultando no valor (M) e a variação de estabilidade dos melhores genes fornecendo um valor (V), o que permite a exclusão gradual dos genes menos estáveis (valor de $M < 1,5$). O software REST (do inglês *Relative Expression Software*) (PFAFFL et al., 2002), foi utilizado para análise da expressão dos genes. A normalização dos genes alvo foi realizada com os melhores genes de referência, para cálculo da expressão e regulação dos genes.

4.7.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

Do material foliar pulverizado, de três réplicas biológicas, foi utilizado 0,1 g de cada réplica biológica para extração de RNA total, usando reagente TRIzol™ (*Invitrogen*™), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA obtido foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop™ 200 (*Thermo Scientific*) e a integridade foi observada por eletroforese em gel de agarose 1%. Para a digestão do DNA, 4 μ g de RNA total foi tratado com Turbo™ DNase (*Applied Biosystems/Ambion*) segundo as orientações do fabricante, e a eficiência da digestão foi observada em gel de agarose 1%. Um total de 2 μ g do RNA tratado foi utilizado para a síntese de cDNA usando *Go Script™ Reverse Transcription System* (*Promega*), conforme as orientações do kit. Para confirmação da eficiência da síntese de cDNA, foi realizada uma reação de RT-PCR utilizando primers do gene *TBP1*. A reação com 1 μ L de cDNA na diluição 1:20, água ultra pura q.s.p 25 μ L, *Taq buffer* 1 X, 1,2 μ M de $MgCl_2$, 0,2 mM de DNTPs, 5 μ M de cada iniciador

(*forward* e *reverse*), para RTq-PCR, 1 U da enzima *Taq DNA polymerase* (GE Healthcare Life Sciences). O produto da reação foi observado em gel de agarose 1%, com marcador de peso molecular *Ladder 1kb plus* (Invitrogen) para certificação do tamanho do fragmento.

4.7.4 Análise de RTq-PCR

Um total de 30 genes que codificam as proteínas diferencialmente abundantes identificadas foram selecionadas para validação dos primers desenhados e análise de expressão dos genes por RTq-PCR (Tabela S1). Os genes *SAND*, *TBP1*, e *UBQ1* foram usados como referência após a validação dos primers. A RTq-PCR foi realizada como descrito por Santos et al. (2017). cDNA na diluição 1:20 foi estabelecido para a análise, após testes com 4 diluições terem sido realizados (1:10, 1:20, 1:30 e 1:100), para determinar a eficiência de amplificação. Foram utilizadas 3 réplicas biológicas com 3 repetições de cada amplificação, e todos os experimentos incluíram controle negativo (água, sem DNA molde). As análises foram realizadas em um termociclador 7300 (*Applied Biosystems*). Um *pool* de RNA tratado com DNase, de cada condição, também foi avaliado por RTq-PCR, para avaliar resquícios DNA genômico. O algoritmo *geNorm* foi utilizado para análise de estabilidade, e a expressão dos genes foi analisada no software REST. Entre os 30 genes analisados, 3 genes foram selecionados, entre os que apresentaram maior nível de expressão, para superexpressar em planta modelo.

4.8 OBTENÇÃO DE PLANTAS TRANSGÊNICAS

4.8.1 Transformação e recuperação de células de *Agrobacterium tumefaciens*

Os genes *CHIB4-like*; *ESP-like* e *RGP1-like* foram selecionados para superexpressão em *A. thaliana*. Inicialmente os genes foram utilizados para síntese do cassete de expressão. Os vetores contendo o cassete de expressão foram sintetizados pela empresa *Epoch life Science Inc.* (Missouri City). Cada vetor foi construído com a sequência do gene de interesse com promotor e terminador *CaMV 35S* provenientes do vetor pBIN61 (Figura S2). Os vetores foram sintetizados com gene de resistência a rifampicina (Rf) para seleção das bactérias transformadas e com gene de resistência a Canamicina (*Kn*) para seleção das plantas transformadas, com sítios para enzimas de restrição incluindo *XbaI*. Essas

construções, chamadas a partir daqui de pBIN61:*BoCHIB4*, pBIN61:*BoESP* e pBIN61:*BoRGP1*, foram as transferidas para a linhagem desarmada de *A. tumefaciens* via eletroporação, citada anteriormente.

Para transformação bacteriana, 40 µL de células competentes da linhagem desarmada de *A. tumefaciens* (GV3101::pMP90 resistente a gentamicina) foram transformadas pelo método de eletroporação para inserção dos plasmídeos (100 ng) (pBIN61:*BoCHIB4*, pBIN61:*BoESP* e pBIN61:*BoRGP1*). O procedimento de transformação bacteriana foi realizado igualmente para cada vetor. Foi aplicado um pulso com voltagem de 2,2 kV utilizando o eletroporador *MicroPulser*TM (*Bio-Rad*). Em seguida as células foram recuperadas em 500 µL de meio LB, transferidas para tubos de microcentrífuga de 2 mL mantidos em um termoagitador por 3 h (28 °C/250 rpm).

Em seguida, as células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo 50 mg.L⁻¹ de cada antibiótico (Kn, Gt e Rf) e incubadas por 2 dias a 28 °C, para confirmação da transformação bacteriana. As unidades formadoras de colônias (UFC) presentes nas placas após 2 dias foram transferidas, individualmente, para placas de Petri contendo meio de seleção, conforme mencionado anteriormente. Das UFCs presentes nas novas placas 10 foram transferidas para 2 mL de meio LB líquido de seleção contendo os antibióticos citados anteriormente (mesma concentração) em tubos de 15 mL e armazenadas *overnight* (28 °C/250 rpm). Foi realizado a extração de DNA plasmidial, com metade das células cultivadas, para nova confirmação por amplificação de DNA por PCR e sequenciamento com primers específicos. A outra metade das células transformadas foi crioprotegida com glicerol 25% e armazenada a – 80 °C.

4.8.2 Amplificação de DNA e sequenciamento para comprovação de inserção

4.8.2.1 Minipreparação do DNA plasmidial

Entre as colônias resistentes ao meio seletivo, 10 UFCs foram cultivadas, separadamente, para extração plasmidial. O tubo contendo 1,5 mL de cultura bacteriana foi centrifugado (1 min/12000 x g/ 20 °C), o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as células bacterianas foi utilizado para extração (BRASILEIRO; CARNEIRO, 2015). O DNA plasmidial extraído foi utilizado para realização de PCR em termociclador *Veriti*[®] (*Applied Biosystems*). Foram

adicionados 100 ng de DNA plasmidial em uma reação de PCR com 20 µL no total (ddH₂O q.s.p 20 µL; tampão para *Taq* 1 X; MgCl₂ 1,5 mM; dNTP 0,2 mM; 0,1 µM de cada primers (*forward* e *reverse*); *Taq* Polimerase 1 U). As condições de PCR foram às mesmas propostas por Brasileiro e Carneiro (2015), com a temperatura de anelamento ideal para cada primer específico, previamente testado (Tabela 1). Como controle negativo da reação, o DNA plasmidial de bactérias carregando o vetor pBIN61 vazio foi utilizado. Um gel de agarose 1 % foi preparado para observação do produto de PCR por eletroforese. O DNA plasmidial, PCR positivo, de cada bactéria transformada, após purificação, foi sequenciado. O sequenciamento foi realizado pelo Laboratório de Sequenciamento de DNA da Universidade Católica de Brasília com protocolo padrão em um sequenciador ABI 3130 xl (*Genetic Analyzer, Applied Biosystems*).

4.8.3 Obtenção das plantas transformadas

Os 3 vetores com os genes de interesses, sob controle do promotor 35S (CaMV), foram usados para transformação de *A. thaliana* (Col-0) mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (GV3130). O método *floral dip* (CLOUGH; BENT, 1998) foi utilizado para a transformação dos botões florais. Inicialmente foi realizado um pré-inóculo transferindo a bactéria transformada para 2 mL de meio de seleção, em seguida armazenado em termoagitador *overnight* (28 °C /250 rpm). No dia seguinte um inóculo foi preparado transferindo 250 µL para 250 mL de meio de cultura de seleção em *erlenmeyer* de 1 L. O inóculo foi armazenado em termoagitador a 28 °C com agitação de 250 RPM até alcançar a densidade ótica adequada (OD₆₀₀ = 0,8-1,0). Após alcançar a absorvância necessária, a cultura bacteriana foi distribuída em tubos de 50 mL que foram centrifugados por 5 min a 1118 g. O meio de cultura foi retirado e o precipitado bacteriano foi solubilizado com solução contendo 5% de glicose e 0,005% de *silwet* L-77. A suspensão contendo *A. tumefaciens* (OD₆₀₀ = 0,8) foi preparada para imersão dos botões florais. Os botões florais foram imersos em um recipiente contendo a suspensão bacteriana em quantidade suficiente para cobrir todos os botões. Os botões ficaram imersos na suspensão por 30 seg com movimentos circulares. As plantas foram cobertas com um plástico transparente, para reter umidade, por 24 h. Após a transformação, as plantas foram mantidas em ambiente controlado (com fotoperíodo, 12 h luz/12 h escuro a 22 °C) até completar

o ciclo de vida. Ao apresentarem a coloração marrom, as siliquis foram cobertas com sacos de papel pardo para coleta das sementes e 0,1 g (cerca de 5000 sementes) foi esterilizado (com solução etanol 100% e *triton-X* 0,05%). Cinco placas no total foram semeadas (um total de 25000 sementes). As placas contendo meio de cultura seletivo MS (50 mg. L⁻¹ Km), foram mantidas em ambiente controlado. As plantas resistentes a Canamicina, com aproximadamente 5 folhas, foram transferidas para substrato e mantidas em ambiente controlado. Para confirmar a transformação, folhas das plantas (T0) foram coletadas para extração de DNA. O DNA extraído foi utilizado para amplificação por PCR e sequenciamento usando primers específicos. O modo de seleção e cultivo foram repetidos até a obtenção das gerações T1, T2 e T3, com extração de DNA em todas as etapas para PCR e sequenciamento. Na geração T2 foi realizado o teste de homozigose. As gerações em homozigose T2 e T3 foram utilizadas para caracterização molecular e bioensaio.

4.8.4 Análise por *Southern blot*, RTq-PCR e bioensaio

Após o desenvolvimento das plantas, folhas da geração T2 em homozigose foram coletadas para extração de DNA total e análise por *Southern blot*. O DNA extraído das plantas transgênicas (BRASILEIRO; CARNEIRO, 2015), foi purificado e submetido à amplificação por PCR. O produto de PCR foi conferido por eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA purificado foi sequenciado para confirmar a presença do gene de interesse. Depois da confirmação por sequenciamento, o DNA purificado foi digerido com a enzima de restrição *Xba*I seguindo as orientações do fabricante (Promega). Por eletroforese, a amostra digerida foi transferida para o gel de agarose 1%. Para a eletroforese, foram utilizados os seguintes parâmetros: tampão TBE 1X, voltagem de 8 V, com tempo de eletroforese de ~4 h (ou até a marca do tampão de amostra alcançar 2 cm antes da base final do gel). Após a eletroforese, a amostra foi transferida para membrana de nitrocelulose, *Amersham Hybond-N+* (*GE Healthcare Life Sciences*), para análise por *Southern blot* que foi realizada seguindo o procedimento padrão (ROMANO; VIANA, 2015). O RNA total extraído das folhas das plantas da geração T3 foi preparado para RTq-PCR conforme citado anteriormente. Para normalização dos dados, os primers *ACT2*, *EF-1 α* e *GAPDH* (Tabela S1) foram utilizados para avaliar a expressão dos genes heterólogos em *A. thaliana*. Para avaliar o efeito da

superexpressão dos genes em *A. thaliana*, plantas transgênicas foram inoculadas *in vitro*. Plantas com 25 dias de idade (contando desde início da germinação) foram inoculadas por aspersão (KRAUTHAUSEN; LAUN; WOHANKA, 2011) com uma solução de Xcc51 OD = 0,1 (NaCl 0.85%; 0,005% silwet I-77) usando um vaporizador de 30 mL com válvula spray de 2,3 cm. O spray foi disparado 3 vezes em cada planta. O desenvolvimento da doença foi acompanhado baseado na avaliação fenotípica visual por 15 dias e documentada por fotos. Um total de 5 transformantes foi avaliado com 15 plantas cada (réplicas técnicas). A análise foi realizada 5 dias pós inoculação (dpi) e avaliação do índice de doença foi pontuada de acordo com a escala utilizada por SHARMA e colaboradores (2017) após pesar as folhas, antes e depois da remoção da área necrosada. O índice de McKinney (1923) foi utilizado para calcular a severidade da doença (SVD) de acordo com a escala de nota atribuída na avaliação do índice da doença. Utilizando a média aritmética das notas fornecidas na escala, foi possível a mensurar a reação média de cada planta onde: 0,0-1,0 = altamente resistente (AR); 1,1-2,0 = medianamente resistente (MR); 2,1-3,0 = medianamente suscetível (MS); 3,1-4,0 = suscetível (S); 4,1-5,0= altamente suscetível (AS) (MEYER et al., 2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudos prévios no laboratório os teste de resistência e suscetibilidade realizados nas duas cultivares utilizadas no presente trabalho, revelou que a cultivar Astrus Plus era moderadamente resistente, e para melhor apresentação dos dados será mencionada a partir daqui como cultivar resistente, e a cultivar VELOCE mostrou suscetibilidade à bactéria Xcc51 (TÁVORA et al., 2019). Para melhor compreensão da interação repolho-Xcc a prospecção de proteínas foi realizada nas primeiras 24 horas de infecção. As amostras de extrato de folhas inoculadas (EFI) e não inoculadas, controles (EFC) foram analisadas por *Orbitrap* assim como amostras de cloroplastos isolados das folhas inoculadas (ClpFI) e não inoculadas (ClpFC).

5.1 PERFIL PROTEÔMICO DE FOLHAS DE BRASSICA INFECTADAS POR XCC

O dinamismo celular é uma resposta a diferentes situações fisiológicas. Diferença na abundância de proteínas pode indicar modificações celulares importantes e específicas. A proteômica possibilita obter informações cruciais sobre o conjunto de proteínas na célula ou organela nas diferentes situações e/ou modificações celulares (WILKINS et al., 1996). Para a análise do proteoma de folhas e cloroplasto de plantas de *B. oleracea* var. *capitata* infectadas, foi utilizado no presente trabalho, o método de *shotgun*.

A análise comparativa entre proteínas das plantas resistentes e suscetíveis de *B. oleracea* var. *capitata* 24 h após a inoculação com Xcc foi realizada com o objetivo de entender melhor a interação Brassica-Xcc, observando a abundância diferencial de proteínas que podem estar envolvidas no processo de defesa da planta hospedeira, nos estágios iniciais da infecção. Outro objetivo foi validar a função de genes potencialmente envolvidos na defesa da planta. A análise do proteoma, da folha e cloroplasto, por *nanoLC-MS/MS* foi realizada, no Serviço Central de Apoio a Investigação (SCAI) SCAI durante o período de Doutorado Sanduíche na Universidade de Córdoba, Espanha e na Unidade de Proteômica, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) durante uma visita técnica, respectivamente.

De acordo protocolo padrão utilizado no Centro de análise foi realizado o fracionamento padrão (Figura S1) em SDS-PAGE 12% para digestão em gel, por

tripsina. O protocolo padrão adotado, leva em consideração que o fracionamento em gel pode inicialmente limpar a amostra, remover contaminantes com baixo peso molecular incluindo detergentes e tampão, que são utilizados nos primeiros estágios de tratamento das amostras, mas que podem ser detectados por *nanoLC-MS/MS* (SHEVCHENKO et al., 2007). Essa limpeza inicial auxilia, sobretudo em manter a integridade da coluna de separação por fase reversa e ainda pode contribuir para a ionização dos peptídeos (LUNDBY; OLSEN, 2011).

Para a identificação de proteínas, foi realizada a comparação RI:RC, cultivar resistente inoculada com Xcc (RI) comparada com a cultivar resistente infiltrada com solução salina (NaCl 0,85%), o controle (RC); bem como a comparação SI:SC, cultivar suscetível inoculada (SI) comparada a cultivar suscetível infiltrada com NaCl 0,85%. A análise realizada por LC-MS/MS identificou mais de 30.000 sequências de peptídeos, e o alinhamento desses peptídeos, com dados anotados no banco de dados *UniProt*, revelou mais de 2.000 proteínas (Tabela Suplementar S1, no apêndice 2). O alinhamento foi realizado utilizando sequências anotadas de *B. oleracea* para identificação das proteínas, os dados de proteoma foram disponibilizados publicamente através do repositório *MassIVE* (DOI: 10.25345/C5KG6W).

Foi relatado uma variabilidade genética entre as espécies de repolho, Yang et al (2018) após realizarem o sequenciamento completo de DNA mitocondrial de cultivares de repolho, observaram diversidade entre elas confirmando que pode haver diversidade entre as subespécies de *B. oleracea* como proposto inicialmente em outros trabalhos (GREWE et al., 2014; TANAKA et al., 2014). Quando comparados os controles de ambas as cultivares foi observada uma grande variação entre as proteínas, lista completa e de proteínas diferenciais (dados não mostrados), e a variação poderia não estar relacionada com a infecção por Xcc, mas devido a variabilidade natural observada, por isso não foi realizada a comparação direta entre os dados provenientes de Astrus Plus e os de Veloce. Os dados de enriquecimento de cloroplasto foram obtidos a partir de um equipamento *orbitrap VELOS* (*Thermo Scientific LTQ*) enquanto os de extrato de folha em um *orbitrap FUSION* (*Thermo Scientific LTQ*) por isso, os dados provenientes do enriquecimento de cloroplasto não foram comparados diretamente com os dados de extrato total.

A maioria das proteínas identificadas não estava caracterizada, por isso uma segunda análise foi necessária. A análise de ontologia gênica (GO) foi realizada com o software *Blast2Go* para predição do processo biológico na célula de cada espécie de proteína, e também permitiu o alinhamento das sequências das proteínas com o banco de dados NCBI, através da ferramenta BLASTp, para auxiliar na predição de nomes das proteínas não caracterizadas no primeiro momento, e a maioria das proteínas não caracterizadas teve o nome predito, considerando similaridade >60 % de homologia entre as sequências alinhadas.

De um modo geral o proteoma de extrato de folhas das cultivares resistentes Astrus Plus inoculadas com Xcc (EFRI) e solução salina (EFRC), identificou 1424 proteínas, por outro lado o proteoma de extrato de folhas das cultivares suscetíveis Veloce, inoculadas com Xcc (EFSI) e o respectivo controle (EFSC) revelou um total de 1395 proteínas (Figura 9).

Sabe-se que em proteomas complexos, como amostras de planta, a identificação de proteínas menos abundantes pode ser impedida por outras proteínas mais abundantes (KIM; KANG, 2008). A proteômica de diferentes componentes subcelulares em planta tem representado um grande auxílio na identificação de proteínas menos abundantes. O enriquecimento de amostras de cloroplasto, mitocôndria, núcleo, membrana plasmática e parede celular, pode contribuir para uma maior cobertura na identificação de proteínas (KIM; KANG, 2008; ROLLAND et al., 2012; BAYER et al., 2015). Dessa forma, o isolamento de organela pode contribuir para identificação de muitas proteínas que não foram identificadas na análise de folha em ambas as cultivares. As amostras de enriquecimento de cloroplasto realizado no presente trabalho puderam contribuir com 662 proteínas adicionais nas amostras de plantas resistentes (ChIRI e ChIRC) e 926 nas suscetíveis (ChISI e ChISC) (Figura 9). No total o presente trabalho, considerando extrato total e cloroplasto, contribuiu com 2680 proteínas anotadas no banco de dados com a comparação resistente (RI:RC), assim com 2686 proteínas da comparação suscetível (SI:SC) que também foram depositadas.

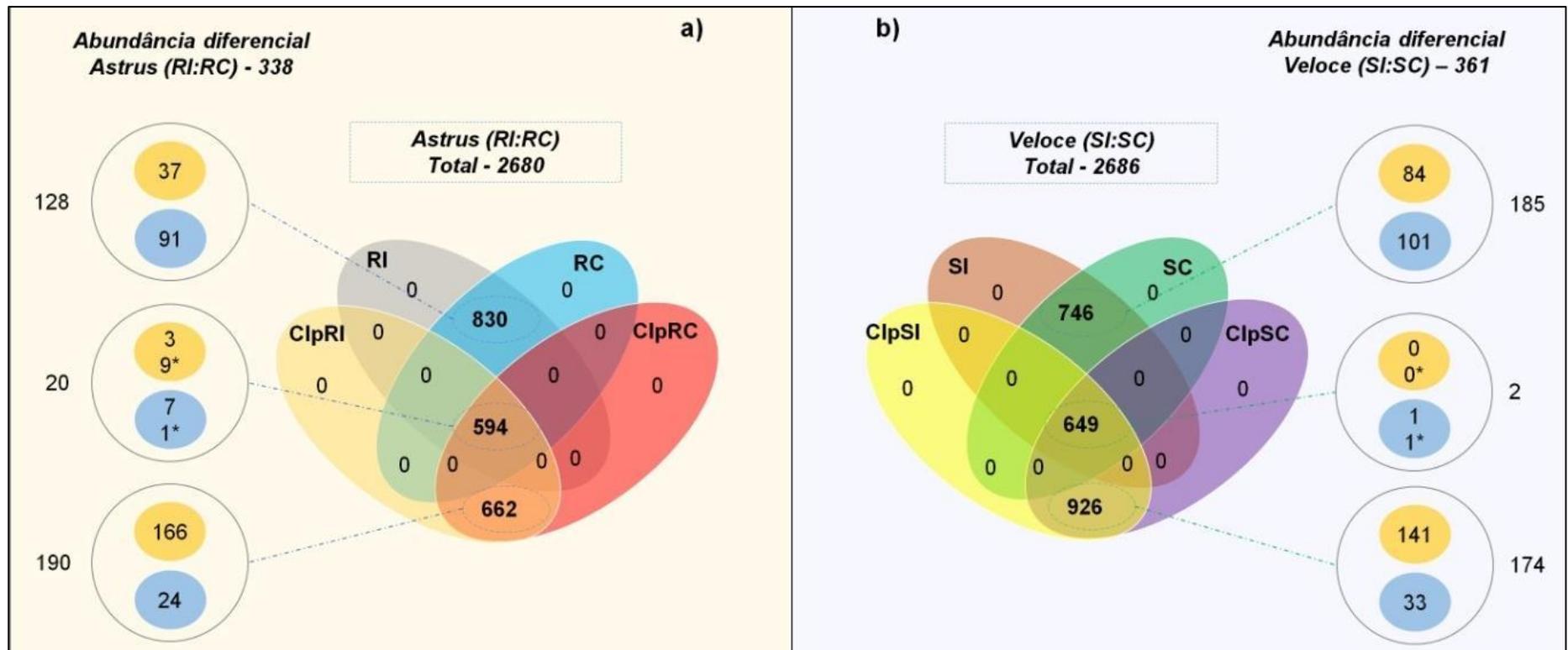


Figura 9. Diagrama de Venn mostrando as diferentes comparações realizadas. a) distribuição quantitativa das de proteínas na condição resistente inoculada com *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (RI) comparadas com a condição controle (RC) e no enriquecimento de cloroplasto da condição resistente inoculada com Xcc (ClpRI) comparada com a condição controle (ClpRC); b) distribuição quantitativa das proteínas na condição suscetível inoculada com Xcc (SI) comparada com a condição controle (SC) e no enriquecimento de cloroplasto da condição suscetível inoculada (ClpSI) comparada com o cloroplasto da condição controle (ClpSC). Nos círculos, nas laterais dos diagramas de Venn, estão proteínas com alteração na abundância (primeiros círculos mostram as proteínas diferenciais apenas nas amostras de extrato de folhas; os círculos do meio mostram as proteínas compartilhadas entre as amostras de extrato total e de enriquecimento de cloroplasto; nos círculos inferiores estão as proteínas diferenciais apenas das amostras de enriquecimento de cloroplasto); as proteínas foram distribuídas no conjunto de dados no interior de cada círculo maior, onde os círculos amarelos mostram o número de proteínas com abundância aumentada e os círculos azuis mostram o número de proteínas com abundância diminuída. (*) número de proteínas diferencialmente abundantes nas amostras de cloroplasto. RI (Resistente inoculada), RC (Resistente Controle), SI (suscetível inoculada), SC (Suscetível Controle) – Clp (Cloroplasto).

Essas proteínas não foram detectadas nas amostras de folhas. Esses resultados demonstram que a análise de subproteomas pode contribuir significativamente para a identificação de proteínas adicionais (ROLLAND et al., 2012; BAYER et al., 2015). Neste estudo, todas as proteínas identificadas, provenientes de folhas e enriquecimento de cloroplasto, foram combinadas para análise. Algumas proteínas com o mesmo nome, com homologia de sequências > 30%, mas com número de identificação diferentes, foram alinhadas. A sequência de aminoácido alinhada que apresentou dissimilaridade de > 5%, foram consideradas proteínas diferentes, ou seja, contada mais de uma vez na relação final. Na comparação entre as plantas resistentes inoculadas e controles (RI:RC), foram identificadas 338 proteínas diferencialmente abundantes, já na comparação entre plantas suscetíveis inoculadas e controles (SI:SC), 361 apresentaram abundância diferencial (Tabela S2, Figura 9). Um total de 30 proteínas foi selecionado para análise dos respectivos genes por RTq-PCR, considerando: a abundância diferencial das proteínas identificadas (valor de *fold-change* >1,5 ou <1,5), e/ou processo biológico envolvido (resposta/defesa) e/ou resultados de trabalhos prévios realizados no laboratório (VILLETH et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018), com base nas informações, acima a expressão dos 30 genes potencialmente envolvidos na defesa da planta foi avaliada (Tabela 2).

Apenas dois genes amplificados pelos *primeres* sintetizados com base na literatura foram utilizados para normalização na análise por RTq-PCR. Segundo os dados de estabilidade apresentados pelo GeNorm, foram considerados apropriados para a análise de expressão gênica, o *TBP1* e *UBQ* (e o par menos variável, na análise par-a-par entre os 30 genes). O *GeNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002), assim como outros algoritmos incluindo *NormFinder* (ANDERSEN et al., 2004) e *BestKeeper* (PFAFFL et al., 2004) foram desenvolvidos para selecionar os genes mais estáveis a partir de um conjunto de genes candidatos ou genes submetidos a uma determinada condição experimental (CHEN et al., 2011). O gene *SAND*, apesar de ser sugerido na literatura para utilização do mesmo como normalizador, não foi considerado estável pelo algoritmo *GeNorm* (valor de $M < 1,5$). Zhu e colaboradores (2012) observaram que alguns genes, do metabolismo básico e manutenção celular, tendem a ser usados como genes de referência. Mesmo sendo indicados na literatura como normalizadores alguns desses genes em condições experimentais podem não ser expressos de forma estável (GUTIERREZ et al., 2008). Essa

informação demonstra que para análise de expressão gênica por RTq-PCR, os genes de referência utilizados na literatura, sempre precisam ser avaliados, quanto à estabilidade, para cada condição experimental (SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000).

Tabela 2. Proteínas diferenciais e genes codificadores analisados por análise RTq-PCR (interações RI: RC e SI: SC) e os genes discutidos no modelo de interação proposto.

Gene ²	Proteína (nome completo)	Proteína (NA) ¹	Acesso UniProt	Fold change ³				Ontologia Gênica (processos biológicos) ⁴
				Proteína		Gene		
<i>Genes diferenciais analisados por RTq-PCR e incluídos no modelo proposto</i>				R	S	R	S	
BoAKR2A	Proteína com domínio de repetição de anquirina contendo domínio 2-like	AKR2	A0A0D3BK51	ni	-2	-0.37	-0.003	Direcionamento de proteínas ao cloroplasto
BoAMC4	Metacaspase-4	MC4	A0A0D3D1T5*	2	2	2.88	1.172	Regulação positiva da morte celular programada; autoprocessamento de proteínas
BoANN2	Anexina	ANN2	I3Y171	2	ni	3.80	2.357	Transporte transmembrana de eu de cálcio; resposta ao estresse oxidativo
BoAPY5	Apirase 5	APY5	A0A0D3CA22	nd	-10	0.73	0.179	Nenhum predito
At5g02240	Proteína não caracterizada At5g02240	At5g02240	A0A0D3EID2*	nd	3	-0.31	0.897	Resposta ao ácido abscísico
BoATPC1	ATP sintase cadeia gama 1. Cloroplástica	ATPG1	A0A0D3E873	nd	-11	-0.23	-0.188	Síntese de ATP acoplada ao transporte de prótons
BoBAG7	Regulador de chaperonas moleculares da família BAG 7-like	BAG7	A0A0D3A4W0	ni	-81	1.21	0.452	Resposta celular à proteína desdobrada; dobramento de proteínas; resposta celular ao calor
BoCHB4	Endoquitinase basica CHB4-like	CHB4	A0A0D3BPL2	6	ni	9.17	4.495	Processo catabólico de macromoléculas da parede celular; processo catabólico de quitina; resposta ao vírus; resistência adquirida sistêmica
BoCLPP	Subunidade proteolítica da protease Clp dependente de ATP	CLPP	A0A0D3A7F3	ni	-2	1.18	-0.385	Controle de qualidade de proteínas para proteínas mal dobradas ou incompletamente sintetizadas
BoDEGP8	Protease Do-like 8, cloroplástica	DEGP8	A0A0D3BZW4*	3	ni	0.35	6.457	Reparo do Photosystem II
BoDTX	Proteína de detoxificação	DTX	A0A0D3BJ77	ni	2	0.54	0.268	Transporte de ácido abscísico; transporte transmembrana de drogas; regulação da resposta à privação de água;
BoENH1	Rubredoxina like, 1	ENNH1	A0A0D3AJG1	nd	-2	-1.58	-0.639	Nenhum predito

Gene ¹	Proteína (nome completo)	Proteína (NA) ²	Acesso UniProt	Fold change ³				Ontologia Gênica (processos biológicos) ⁴
				Proteína		Gene		
<i>Genes diferenciais analisados por RTq-PCR e incluídos no modelo proposto</i>				R	S	R	S	
<i>BoERF1-3</i>	Peptídeos do fator de liberação de cadeia eucariótico subunidade 1-3	eRF1-3	A0A0D3E0E3*	3	nd	1.05	0.317	Terminação citoplasmática de translação; regulação do crescimento; término de tradução
<i>BoESP</i>	<i>Epithiospecifier</i> -like	ESP	A0A0D3CQU9	nd	-2	4.56	1.607	Resposta de defesa a bactéria; processo catabólico; processo biossintético de nitrilo; resposta ao ácido jasmônico
<i>BoFSD1</i>	Superoxido dismutase	SOD	F8U7Z7	3	nd	0.71	-0.017	Resposta celular ao estresse oxidativo; resposta de defesa a bactéria; resposta celular ao estresse salino; resposta celular a UV-B;
<i>BoGASAI</i>	Giberilina-proteína de regulação 1	GAST1	A0A0D3D0Y9*	2	nd	0.01	-1.905	Resposta ao ácido abscísico; resposta ao brassinosteróide; resposta a giberelina
<i>BoIF-2</i>	Fator de iniciação da translação IF-2	IF2	A0A0D3CAZ7	-2	nd	-1.30	0.110	Iniciação translacional; tradução; ligação de nucleotídeos
<i>BoLLP</i>	Proteína lectin-like At3g16530	LLP	A0A0D3CJY3	3	ni	-6.51	3.470	Resposta à quitina; resposta a oomicetos
<i>BoMLP31</i>	Proteína MLP-like 31	MLP31	A0A0D3APR4	-4	ni	-0.83	-0.860	Resposta de defesa
<i>BoPER32</i>	Peroxidase 32	PEROX32	A0A0D3E2V6	-2	nd	1.92	0.239	Resposta ao estresse oxidativo; processo catabólico de peróxido de hidrogênio; resposta à citocinina;
<i>BoPIP1-1</i>	Aquaporina PIP1b1	PIP1b1	Q9FUL1*	ni	2	-0.46	-0.003	Transporte de água; resposta à privação de água
<i>BoPPD4</i>	Domínio psbP –contendo a proteína 4, cloroplastica	PSBP4	A0A0D3D1B1*	nd	9	-0.64	-0.349	Fotossíntese
<i>BoPRX5</i>	Peroxiredoxina IIF, mitocondrial	PRXIIF	A0A0D3CMF0*	-2	2	-0.33	0.920	Homeostase redox celular; resposta ao íon cádmio; resposta ao estresse oxidativo
<i>BoPSBE</i>	Citocromo b559 subunidade alfa	PSBE	A0A0H3Y313*	nd	-2	-0.44	-0.383	Cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos

Gene ¹	Proteína (nome completo)	Proteína (NA) ²	Acesso UniProt	Fold change ³				Ontologia Gênica (processos biológicos) ⁴
				Proteína		Gene		
<i>Genes diferenciais analisados por RTq-PCR e incluídos no modelo proposto</i>				R	S	R	S	
BoPSBD	Proteína do fotosistema II D2	PSII D2	A0A191SEU8	nd	2	-0.13	-0.223	Transporte de elétrons fotossintéticos no fotosistema II; ligação proteína-cromóforo
BoRFK1	Receptor LRR <i>-like</i> serina/treonina-proteína quinase At1g29720	LRR-RLK	A0A0D3CSX5	2	nd	-0.71	1.010	Autofosforilação de proteínas; regulação da resposta imune inata; ácido jasmônico e resistência sistêmica dependente de etileno
BoRGPI	UDP-arabinopiranosose mutase 1- <i>like</i>	UAM	A0A0D3B9D8	9	ni	2.20	1.968	Organização de parede celular tipo planta ou biogênese
BoTL17	Proteína tilacoide lumenal 17.4 k Da. cloroplastica	P17.4	A0A0D3EAP2*	3	6	-0.69	1.944	Ligação de proteína
BoYCF54	Proteína não caracterizada Ycf54	YCF54	A0A0D3ECB6*	3	3	-0.38	-0.436	Nenhum predito
BoUSPA	Proteína de estresse universal YxiE- <i>like</i>	YXIE	A0A0D3CTQ3	2	2	0.73	0.642	Nenhum predito
Gene ¹	Proteína (nome completo)	Proteína (NA) ²	Acesso UniProt	Fold change ³				Ontologia Gênica (processos biológicos) ⁴
				Proteína				
<i>Proteínas adicionais incluídas no modelo proposto</i>				R	S			
BoTRXM	Tioredoxina M, cloroplastica	TRXM	A0A0D3DZ53*	2	2	Homeostase redox celular; processo metabólico de éter glicerol; regulação do processo metabólico de carboidratos;		
BoPRXQ	Peroxiredoxina Q, cloroplastica isoforma X2	PRXQ	A0A0D2ZRQ6*	2	nd	Homeostase redox celular		
BoPRX	Peroxiredoxina- Cloroplastica	PRX	A0A0D3BYD5* A0A0D3DSN3*	2	nd	Homeostase redox celular		
106329510	Pectinesterase	PEM17	A0A0D3B6U2*	4	2	Modificação da parede celular; processo catabólico da pectina		
BoGSTU5	Glutationa S-transferase U5	GSTU5	A0A0D3B771	2	nd	Resposta ao estresse oxidativo; resposta à substância tóxica; processo catabólico da toxina		

Continue

Gene ¹	Proteína (nome completo)	Proteína (NA) ²	Acesso UniProt	Fold change ³		Ontologia Gênica (processos biológicos) ⁴
				Proteína R	S	
<i>Proteínas adicionais incluídas no modelo proposto</i>						
BoGSTU19	Glutathione S-transferase U19	GSTU19	A0A0D3CVZ5	2	-2	Processo metabólico da glutathione; resposta ao estresse oxidativo; resposta celular à privação de água;
BoBoAIG2	Proteína Aig2	AIG2	A0A0D3BZV5*	2	2	Resposta à bactéria
106337169	Ferredoxina	FDX	A0A0D3BV84*	2		Transporte; transporte de elétrons
BoLFNR	Ferredoxina--Nadp foliar, Isozima 1, cloroplastica	FNR	A0A0D3E2R*	1.5	nd	Resposta de defesa para; resposta de defesa ao fungo, interação incompatível; fotossíntese; resposta à citocinina
BoLFNR2	Ferredoxina--Nadp foliar Isozime 2, cloroplastica	FNR2	A0A0D3DQI2*	2	nd	Resposta de defesa para; resposta de defesa ao fungo, interação incompatível; fotossíntese; resposta à citocinina
BoGF14	14-3-3 GF14 kapa isoform X1	GF14 kappa	A0A0D3BET0	2	nd	Regulação metabólica; resposta ao frio
BoAKR4C8	Aldo-queto redutase família 4 membro C8	AKR4C8	A0A0D3BR44	2	-2	Processo de oxidação-redução; resposta ao íon cádmio; resposta à substância tóxica; resposta ao frio; resposta ao estresse salino;
BoPBH2	Prohibitina 2, mitocondrial-like	mtPBH2	A0A0D3C7E7*	2	2	Organização mitocondrial; divisão celular; resposta de defesa a bactéria; regulação negativa da divisão celular; resposta a auxina;
BoVDAC4	Porina mitocôndria membrana exterior 4	mtVDAC4	A0A0D3B2Z9*	2	ni	Regulação do crescimento; resposta à bactéria
BoMDH	Malato desidrogenase mitocondrial	mtMDH	A0A0D3CQE1*	3	2	Processo metabólico de carboidratos; processo metabólico do malato; ciclo de ácido tricarbóxico
			A0A0D3CQN2*	2	2	
			A0A0D3BMU9	4	-2	
BoMDH	Malato desidrogenase, cloroplastica	chlMDH	A0A0D3CGY3	2	1.5	Processo metabólico de carboidratos; processo metabólico do malato; ciclo de ácido tricarbóxico
106341843	Glucan endo-1,3-beta- glucosidase-like	BG	A0A0D3BXB6	7	3	Processo metabólico de carboidratos

Gene ¹	Proteína (nome completo)	Proteína (NA) ²	Acesso UniProt	Fold change ³		Ontologia Gênica (processos biológicos) ⁴
				Proteína R	S	
<i>Proteínas adicionais incluídas no modelo proposto</i>						
106300472	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like (glucanase beta 1,3)	BG_ppap	A0A0D3CTF1*	2	ni	Processo metabólico de carboidratos; comunicação celular
BoGAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, cloroplastica	chlGAPDH	A0A0D3DXN8	2	nd	Processo metabólico de glicose
BoPAP 1	Proteína plastidio-Lipidio-Associada 1, cloroplástica	chlPAP 1	A0A0D3E8B6*	2	2	Fotoinibição; resposta ao ácido abscísico; resposta ao frio
			A0A0D3E8B7*	2	2	
			A0A0D3B8J8	2	3	
BoPAP 2	Proteína plastidio-Lipidio-Associada 2	PAP 2	A0A0D3A546	2	nd	Nenhum predito
BoPAP 3	Proteína plastidio-Lipidio-Associada 3	PAP 3	A0A0D3BRT9*	2	2	Nenhum predito
BoUSPA	Proteína estresse universal A	USP-A	A0A0D3CN30*	2	ni	Nenhum predito
BoPEPR1	Receptor quinase com repetições ricas em leucina- Pepr1	PEP1	A0A0D3D099*	3	2	Resposta imune; resposta imune inata; resposta ao ácido jasmônico; resposta a injúria
NA	Receptor leucina com receptor rico em repetições serina treonina-quinase like At3g14840	LRR-RLK	A0A0D3BBD1*	2	ni	Autofosforilação de proteínas; regulação da resposta imune inata; ácido jasmônico e resistência sistêmica dependente de etileno
BoPTII2	Proteína tirosina-quinase 2PTII-like	PTII-2	A0A0D3B4A1	1.5	nd	Resposta de defesa; fosforilação de proteínas
BoGAPC	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	GAPDH	A0A0D2ZPE9	-2	nd	Processo metabólico da glicose
			A0A0D3C9I2*	-2	nd	
106335373	Malato desidrogenase [NADP] cloroplástica-like	chlMDH	A0A0D3B2U9	-2	nd	Processo metabólico de carboidratos; processo metabólico do malato
BoGPX1	Glutathiona peroxidase mitocondrial	mtGPX	A0A0D3AT05	-2	nd	Resposta ao estresse oxidativo

Gene ¹	Proteína (nome completo)	Proteína (NA) ²	Acesso UniProt	Fold change ³		Ontologia Gênica (processos biológicos) ⁴
				Proteína R	S	
<i>Proteínas adicionais incluídas no modelo proposto</i>						
BoDHAR1	Glutathione S-transferase DHAR1, mitochondrial-like	mtDHAR	A0A0D3DQE3	-2	nd	Resposta celular a peróxido de hidrogênio; resposta de defesa; regulação positiva da via de sinalização mediada por ácido salicílico; resposta a ácido jasmônico;
BoPER3	Peroxidase 3-like	PEROX3	A0A0D3C7R9*	-2	nd	Processo catabólico de peróxido de hidrogênio; resposta a estresse oxidativo;
BoPER32	Peroxidase 32	PER32	A0A0D3E2V6	-2	nd	Processo catabólico de peróxido de hidrogênio; resposta a citoquinina; resposta a estresse oxidativo;
BoLHCB5	Proteína de ligação à clorofila α - β CP26, cloroplastica	CP26	A0A0D3B7Z5	-4	ni	Supressão não-fotoquímicas; fotossíntese, captura de luz; montagem do fotossistema II; ligação proteína-cromóforo
BoLHCB4.2	Proteína de ligação à clorofila α - β CP29.2, cloroplastica	CP29.2	A0A0D3CLT0	-2	2	Fotossíntese, captura de luz; ligação proteína-cromóforo; resposta à luz azul; resposta à citocinina;
NA	Proteína de ligação à clorofila α - β CP43, cloroplastica	CP43	A0A0D3CFB6	-2	ni	Transporte de elétrons fotossintéticos no fotossistema II; ligação proteína-cromóforo
BoRPN	Proteassoma 26S subunidade reguladora não-ATPase 5	RPN5	A0A0D3CJZ8	-2	nd	Montagem proteassoma; tradução
BoRPT3	Proteassoma 26S subunidade reguladora homólogo 6B	26Sp6B	A0A0D3AL95	2	ni	Processo catabólico de proteína
BoUBC36	Enzima Conjugadora de Ubiquitina E2 36	UBC7	A0A0D3ARJ5	-2	nd	Reparo de pós-replicação; ubiquitinação ligada à proteína K63
BoUBC7	Enzima Conjugadora de Ubiquitina E2 7	UBC7	A0A0D3ECQ3	-2	nd	Ubiquitinação proteica

(¹) *Brassica oleracea* (*Bo*) nome do gene baseado no homólogo em *Arabidopsis thaliana*. “N/A” Não anotado. (²) Abreviação do nome da proteína. (*nd*) proteína não diferencial (*fold change* \geq/\leq 1.5); (*ni*) proteína não identificada em uma das cultivares. Os números positivos indicam o *fold change* dos genes regulados positivamente ou abundância aumentada e os números negativos os genes regulados negativamente ou proteína com abundância diminuída. (Log2) apresentação dos resultados dos valores de *fold change* para a expressão relativa dos genes avaliados por RTq-PCR. (R) resistente e (S) suscetível; (³) Ontologia gênica, resumindo os principais termos dos processos biológicos mostrados no banco de dados; (mt) mitocondrial e (chl) cloroplástico, prefixo usado aqui para diferenciar a localização do produto gênico; (*) proteínas identificadas nas amostras de enriquecimento de cloroplasto.

Na análise da expressão dos 30 genes de repolho, como esperado, o nível de muitos mRNAs não estavam correlacionados com a abundância de proteínas (Figura 10). Na cultivar resistente, de 16 proteínas que mostraram abundância aumentada, 6 genes correspondentes foram regulados positivamente. De maneira semelhante, os resultados obtidos na cultivar suscetível revelaram que 10 proteínas não mostraram abundância diferencial, mas 5 dos respectivos genes tiveram a regulação aumentada, e 1 diminuída. Entre as proteínas com abundância diminuída nas plantas suscetíveis, 2 genes correspondentes estavam com regulação aumentada e 2 diminuída, e outros genes não mostraram alteração na expressão (Figura 10). Para facilitar o entendimento e disposição dos dados, os nomes dos genes, não caracterizados em *B. oleracea* var. *capitata*, foram substituídos por códigos de genes homólogos em *Arabidopsis*, precedidos por “Bo”.

As diferenças observadas na abundância de proteínas quando correlacionadas com o nível de expressão dos respectivos genes pode não ser proporcional, provavelmente porque alguns processos regulatórios podem ocorrer depois da transcrição do mRNA, incluindo modificações pós-transcricionais, translacional, pós-translacional e degradação de proteínas por mecanismos regulatórios, assim como a meia-vida de RNA e da proteína correspondente (DE SOUSA ABREU et al., 2009; VOGEL; MARCOTTE, 2012).

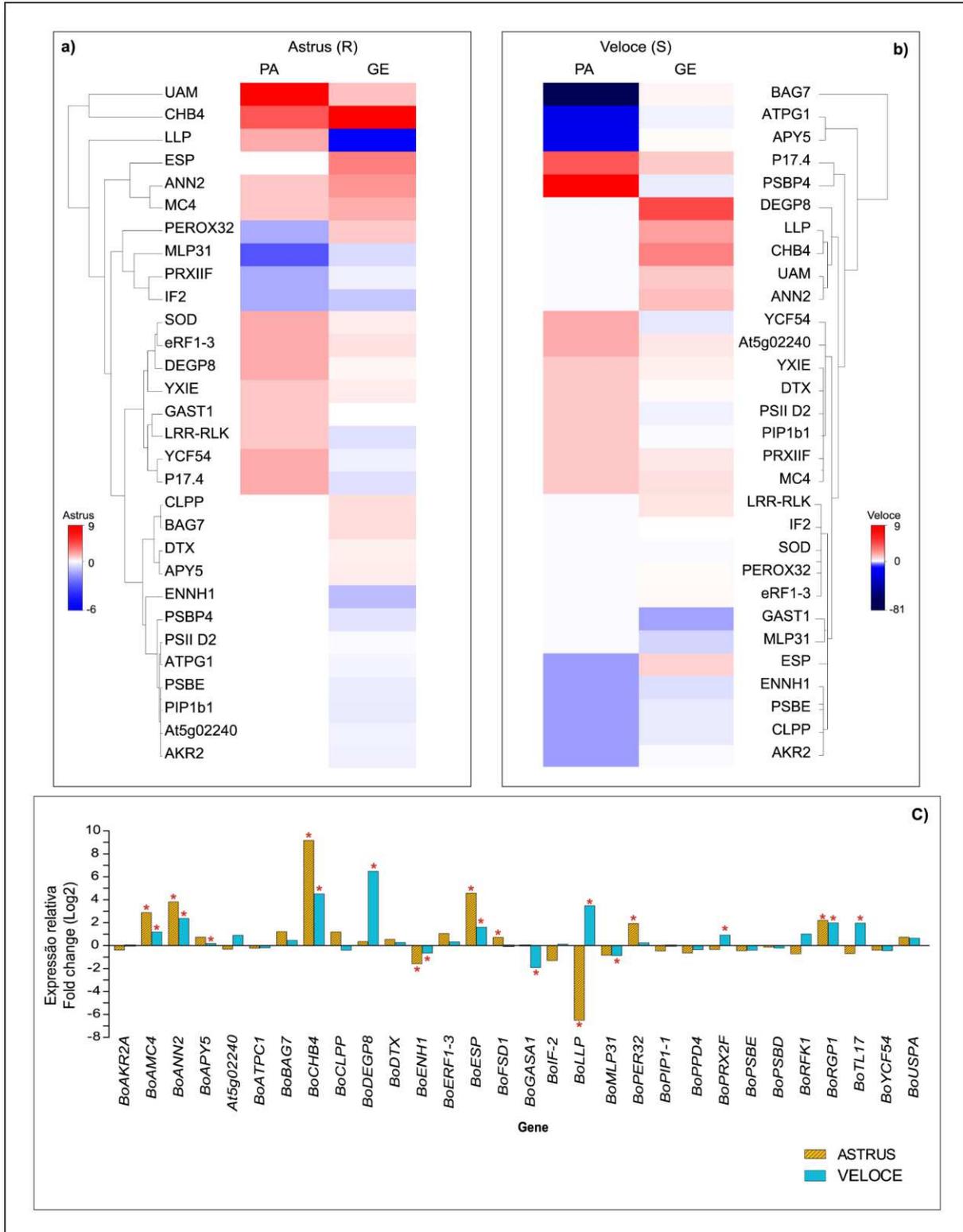


Figura 10. Heatmap mostrando a correlação entre a abundância proteica (PA - *protein abundance*) e os níveis de expressão gênica (GE - *gene expression*) na interação resistente (A) e na interação suscetível (B). (C) Expressão gênica de 30 genes em folhas de *B. oleracea* 24 h após inoculação com *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) em comparação com a condição controle. O símbolo * indica expressão diferencial estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). A informação completa dos genes e produtos gênicos é apresentada na Tabela 2. Bo, nome do gene *Brassica oleracea* homóloga a *A. thaliana*.

5.2 CATEGORIAS DE GO DAS PROTEÍNAS RESPONSIVAS A Xcc NA INTERAÇÃO RESISTENTE E SUSCETÍVEL

A análise da planta resistente (RI:RC) revelou 338 proteínas diferencialmente abundantes, entre essas 215 apresentaram abundância aumentada e 123 diminuídas. Na comparação da cultivar suscetível (SI:SC) foi revelado um total de 361 proteínas com abundância diferencial, incluindo 225 proteínas com abundância aumentada e 136 diminuída (Figura 9).

Na análise de ontologia gênica (GO) foram reveladas algumas categorias predominantes na análise em ambas as cultivares (Tabela S2 e Figura 11), incluindo metabolismo celular, proteínas de biossíntese, processamento e degradação, fotossíntese, resposta a doença/defesa e proteínas não caracterizadas (proteínas sem informação de GO) apesar da segunda análise. Vale ressaltar que apesar do enriquecimento de cloroplasto, muitas proteínas envolvidas em outras atividades como transporte e regulação foram identificadas nessas amostras, e não apenas proteínas envolvidas com a fotossíntese.

Não houve grande diferença na abundância das proteínas do metabolismo energético entre as cultivares, e entre a diferença de abundância, ou seja, a quantidade de proteínas com abundância aumentada era quase a mesma que as diminuídas. Pode ser observada uma intensa atividade da via glicolítica durante a interação planta-patógeno, e alterações no metabolismo de açúcar na planta hospedeira, pode ser crucial para o controle do patógeno, uma vez que ambos os organismos da interação competem por nutrientes (revidado por KANWAR; JHA, 2018), em plantas resistentes essa intensa atividade pode ser observada mas tende a predominar o número de proteínas com abundância diminuída, principalmente das principais proteínas da via glicolítica, para não servir de substrato para a bactéria se desenvolver. Vale ressaltar que muitas das proteínas do metabolismo energético, com abundância diferencial, foram identificadas nas amostras de enriquecimento de cloroplasto, o que reitera a importância da análise de organelas isoladas para se ter uma visão mais ampla da interação planta-patógeno.

Sabe-se que o processo fotossintético é severamente afetado diante de estresse biótico e abiótico, uma vez que para resistir a ambos os estresses pode haver um custo energético alto. Apesar de ainda não ser clara a participação molecular do cloroplasto na imunidade da planta, já foi demonstrado que o

cloroplasto pode ter um papel crucial no sistema imune basal da planta, com envolvimento na sinalização de PAMPs, vias de sinalização de cálcio (Ca^{2+}), bem como na produção de ácido salicílico e jasmônico (GRANT; HONES, 2009; PADMANABHAN; DINESH-KUMAR, 2010; NOMURA et al., 2012), atuando como mediador da defesa da planta (KRETSCHMER et al., 2017).

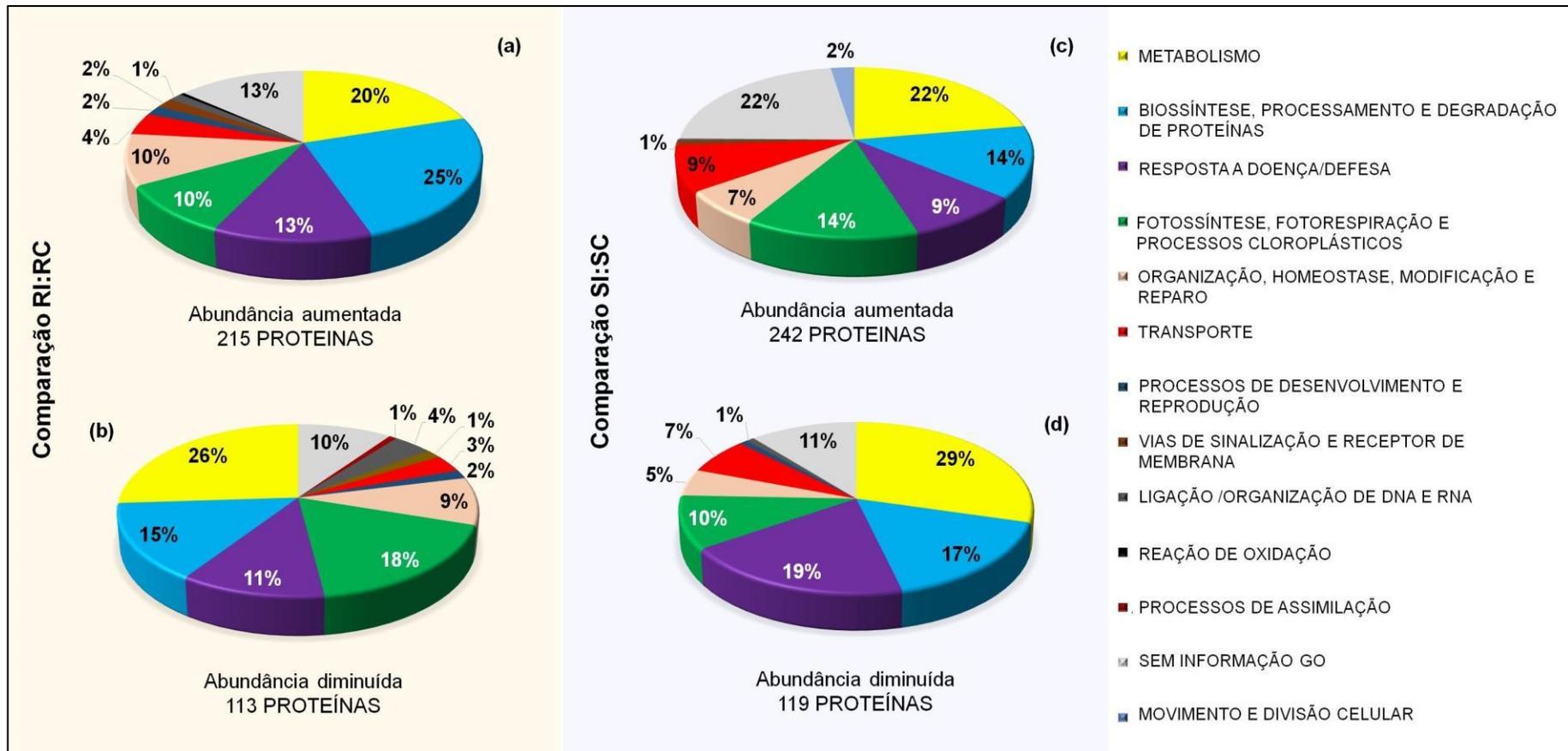


Figura 11. Classificação de ontologia gênica (GO) na categoria de função biológica. Cultivar resistente inoculada quando comparada com o controle (RI:RC), (a) espécies de proteína com abundância aumentada e (b) abundância diminuída. Cultivar suscetível inoculada em comparação com o controle (SI:SC), (c) proteínas com a abundância aumentada e (d) com abundância diminuída.

5.2.1 Proteínas do metabolismo energético

Entre as proteínas do metabolismo energético, três malato desidrogenase (MDH) mitocondrial (A0A0D3CQE1, GN:106296346; A0A0D3CQN2, GN:106301033) mostraram abundância aumentada em ambas as cultivares, entretanto uma delas (A0A0D3BMU9, GN: N/A) mostrou abundância aumentada na cultivar resistente (4 vezes) e diminuída na cultivar suscetível (14 vezes). O malato está envolvido em muitas vias metabólicas de planta, incluindo ciclos do TCA (*tricarboxylic acid cycle*) e o ciclo Calvin, além da regulação do pH e transporte de íons nas raízes das plantas. A MDH é uma importante enzima no metabolismo do malato e pode estar associada com a defesa da planta, sugerindo que o aumento da abundância dessa enzima pode prover recursos para biossíntese de compostos de defesa (RHODES et al., 1968; WALTER et al., 1988; CASATI et al., 1999). Em estudos prévios, a MDH mostrou abundância aumentada na interação resistente Xcc-brássica e mostrou associação com a ativação do metabolismo fotossintético (VILLETH et al., 2016).

Outras proteínas como a frutose-1,6 bifosfato, citosólica EC 3.1.3.11 (A0A0D3BSL1, GN=N/A), endoquitinase básica CHB4-like, EC 3.2.1.14 (A0A0D3B6J8, GN= 106334711; A0A0D3BPL2*, GN=N/A) e UDP-arabinopiranosose mutase 1-like (A0A0D3B9D8*, Gn=RGP1), (*análise por RTq-PCR), estavam aumentadas em RI (9, 12, 9 e 6-vezes, respectivamente) as duas primeiras, frutose-1,6, bifosfato e CHB4 (A0A0D3BSL1 e A0A0D3B6J8 respectivamente) estavam diminuídas em nas plantas suscetíveis inoculadas (28 e 12-vezes, respectivamente), enquanto que o nível de abundância da proteína UDP-arabinopiranosose mutase 1 não alterou nas mesmas plantas (SI).

Na análise de nível de expressão genica por RTq-PCR (Figura 10), *CHB4-like* and *RGP1-like* foram regulados positivamente, com aumento de expressão em RI:RC (578 e 5-vezes, respectivamente) quando comparado com SI:SC (23 e 4-vezes, respectivamente, sugerindo que estas proteínas, apesar de estarem envolvidas no metabolismo energético, podem ter um importante papel na defesa da planta. A abundância das proteínas e o resultado da RTq-PCR, foi a razão para o gene da endoquitinase *CHB4-like*, UDP-arabinopiranosose mutase *like* foram selecionadas para superexpressão em planta modelo *A. thaliana* para validação funcional. Já a da *epithiospecife like* além dos resultados para escolha das

anteriores foi selecionada também baseada em resultados prévios do laboratório, onde essa proteína foi exclusiva em plantas resistentes (cultivar UNIÃO) quando comparadas com as plantas controles, cultivar suscetível (KENZAN)

O papel das vias metabólicas na resposta de defesa ainda não foi bem caracterizado, no entanto, os resultados obtidos no presente estudo são consistentes com outros, que indicam que a regulação positiva do metabolismo pode iniciar uma cascata de sinalização na via de transdução de sinal, levando a resposta de defesa (BOLTON, 2009; KANGASJARVI et al., 2012; ROJAS et al., 2014). Por outro lado, o patógeno pode utilizar metabólitos da célula hospedeira, e a planta, por sua vez, pode responder, para evitar a perda de metabólitos, aumentando a captação de monossacarídeos, limitando o açúcar extracelular disponível para as bactérias. Portanto, esta, poderia ser uma resposta antimicrobiana estratégica, uma vez que essa reação competitiva pode levar à restrição da entrega de fatores de virulência (VOEGELE; MENDGEN, 2011; YAMADA et al., 2016; COUTO; ZIPFEL, 2016).

5.2.2 Proteínas envolvidas no processo de fotossíntese, biossíntese e processamento de proteínas

Como esperado, muitas proteínas envolvidas na fotossíntese foram identificadas em ambas as comparações (Figura 11). Muitas das proteínas identificadas na comparação RI:RC estavam com abundância diminuída. Resultados semelhantes foram obtidos na análise por 2-DE de plantas resistentes, no mesmo tempo de amostragem (RIBEIRO et al., 2018). Por outro lado, no presente trabalho, a maioria das proteínas relacionadas à fotossíntese, estava com a abundância aumentada na comparação SI:SC, diferentemente do observado no por Ribeiro et al (2018), que além da limitação da técnica de 2-DE, esta diferença pode estar associada à proteômica de cloroplastos, já que muitas proteínas nessa categoria de GO foram identificadas nesta organela (Tabela S2). Esses resultados novamente reforçam a importância da análise de subproteomas para o melhor entendimento do perfil global de proteínas na interação planta-patógeno.

Nesse trabalho, foi observado claramente o desbalanço nos processos metabólicos e fotossintéticos em ambas as cultivares, entretanto, é possível que as plantas resistentes possam ter uma maior capacidade de recuperação do que as

plantas suscetíveis, uma vez que as proteínas de homeostase e reparo foram mais abundantes na interação resistente do que na suscetível. Sabe-se que a capacidade metabólica prejudicada pode influenciar diretamente no funcionamento do aparato fotossintético (RAVEN et al., 2007), correlacionando alterações metabólicas com a resposta a patógenos.

Outra categoria de GO que se mostrou predominante na análise está relacionada com a biossíntese e processamento de proteínas (dobramento, montagem, endereçamento e degradação). Proteínas envolvidas principalmente nos processos de transcrição, tradução, pós-tradução e transdução foram observadas em ambas as interações, entre elas várias proteínas ribossomais tiveram a abundância aumentada (30S, 40S e 50S em RI: RC; 50S e 60S em SI: SC). Nesta categoria de GO, podemos destacar as proteínas reguladoras como as chaperonas moleculares da família BAG7-like (A0A0D3A4W0, N / A), que é de grande interesse. Esta proteína mostrou uma diminuição pronunciada na abundância (81 vezes) na SI quando comparado ao controle, mas curiosamente, não foi observada variação na abundância dessas proteínas em plantas resistentes. Os resultados da RTq-PCR mostraram uma tendência de regulação positiva em RI e regulação negativa em SI (Figura 10). Estes resultados sugerem eventos de regulação pós-transcricional ou pós-traducional, uma vez que os níveis de mRNA e proteína são altamente distintos, ou devido ao tempo de acontecimento de cada um dos eventos ser diferente, ou ainda pelo fato de proteínas já formadas podem ser degradadas e retiradas da célula ou acumuladas no interior da mesma.

As proteínas BAG7 pertencem à classe III da família de proteínas BAG, composta por 8 proteínas, codificadas por genes altamente conservados, com genes homólogos amplamente distribuídos em organismos vivos (WEISSBACH et al., 1994; TAKAYAMA et al., 1995). Em plantas, proteínas BAGs foram consideradas multifuncionais e são conhecidas por regular o processo citoprotetor durante estresses bióticos e abióticos (DOUKHANINA et al., 2006). Li e colaboradores (2016) identificaram proteínas desta família que conferiam resistência à planta *Arabidopsis contra Botrytis cinera*, um fungo patogênico, e demonstraram evidências da participação de proteínas BAGs na imunidade inata de plantas. Os dados do presente estudo podem sustentar outros trabalhos, que poderão aprofundar na caracterização das proteínas BAG7 envolvidas da defesa da planta contra bactéria.

5.2.3 Proteínas envolvidas na resposta de doença/defesa

Entre as proteínas identificadas nesse trabalho na categoria GO resposta a doença/defesa, muitas estavam com abundância aumentada em ambas as cultivares, incluindo as envolvidas na resposta ao estresse oxidativo (Figura 11). Entretanto, um alto número de proteínas associadas à resposta/defesa contra patógeno estava com abundância aumentada na cultivar resistente (16%), enquanto que poucas foram observadas na interação suscetível (5%). As proteínas identificadas em ambas as cultivares, com abundância aumentada foram anexinas (I3Y171, N/A), AIG2 (A0A0D3BZV5, 106342351), ferredoxina (A0A0D3BV84, 106337169), ferredoxina-NADP cloroplástica isoformas 1, nas amostras de folhas, e 2 nas de cloroplasto (A0A0D3E2R1, 106318130; A0A0D3DQI2, 106307428) e proteína de membrana externa 4 (A0A0D3B2Z9, 106331408). Muitas proteínas com abundância aumentada na interação suscetível estavam relacionadas com a resposta à presença de ácido abscísico (ABA), enquanto que, nas plantas resistentes as proteínas associadas à presença de ABA estavam com abundância diminuída. ABA é um fitormônio, conhecido na sinalização de moléculas, responsável por regular a resposta ao estresse abiótico, e que pode promover o aumento ou diminuição da expressão de genes responsivos ao estresse (TAIZ et al., 2017). Estudos têm demonstrado que ABA pode suprimir a resposta imune da planta, (KIM et al., 2011; DESCLOS-THEVENIAU et al., 2012).

Em muitos fotossistemas, este fitormônio pode agir de forma antagônica à via do ácido salicílico (AS), uma importante substância que pode conferir resistência à planta contra patógenos (AUDENAERT et al., 2001; JIANG et al., 2010). Além disso, ABA pode suprimir a via da MAPK causando imunossupressão em plantas de *A. thaliana* e possivelmente em outras crucíferas (MINE et al., 2017). A duração do efeito de ABA na interação planta-patógeno é considerada complexa, entretanto, é possível que o aumento da abundância das proteínas envolvidas com a resposta a ABA possa ser um mecanismo que resulte na suscetibilidade da planta (KIM et al., 2011; DESCLOS-THEVENIAU et al., 2012).

O aumento de ABA pode também levar ao acúmulo de outras proteínas como as aquaporinas. No presente trabalho, a aquaporina PIP1-2 (Q9FUL1; N/A) e a PIP3 (Q9FUC0; PIP3) estavam diferencialmente abundantes, e a primeira foi avaliada por RTq-PCR demonstrando que o nível de expressão do gene

correspondente estava com tendência diminuída em ambas as cultivares. Essas aquaporinas foram encontradas em amostras de cloroplasto com abundância aumentada apenas nas plantas suscetíveis. As aquaporinas PIPs são importantes canais intermembranares para transporte de água e CO₂ nos tecidos das plantas (LUU; MAUREL, 2005; VERKMAN, 2013).

Os resultados obtidos aqui sugerem que o acúmulo dessas proteínas pode estar relacionado com ABA, como observado em folhas de *Phaseolus vulgaris* após tratamento com ABA (AROCA et al., 2006). As aquaporinas são multifuncionais e algumas isoformas são capazes de detectar padrões moleculares de patógeno (PAMPs) como *harpins* (ZHU et al., 2000; FLEXAS et al., 2007). Foi demonstrado que a perda de função do locus gênico *AtPIP1;4* em *Arabidopsis* pode bloquear a importação de H₂O₂ apoplástico, geralmente induzida na presença de patógenos, e consequentemente, bloquear a resposta imune da planta (TIAN et al., 2016).

Outra espécie de proteína, patógeno-relacionada, a *epithiospecifer-like* (*ESP like*; A0A0D3CQU9, 106296341), não teve abundância alterada em plantas resistentes, mas foi diminuída em plantas suscetíveis, além do que foi relatado anteriormente, esse foi um dos motivos para que esse gene tenha sido utilizado para superexpressão em planta modelo e será discutido posteriormente. Assim como os demais genes selecionados para superexpressão, esse gene será descrito com mais detalhes posteriormente.

5.3 MODELO DA INTERAÇÃO RESISTENTE *B. oleracea*-Xcc

De um modo geral, o presente estudo, mostrou que os perfis proteicos das plantas resistentes e suscetíveis foram semelhantes, principalmente em relação às categorias GO predominantes. Proteínas com abundância aumentada, na subcategoria estresse oxidativo (Figura 12), em ambas as comparações foram predominantes (24% em RI:RC e 23% em SI:SC).

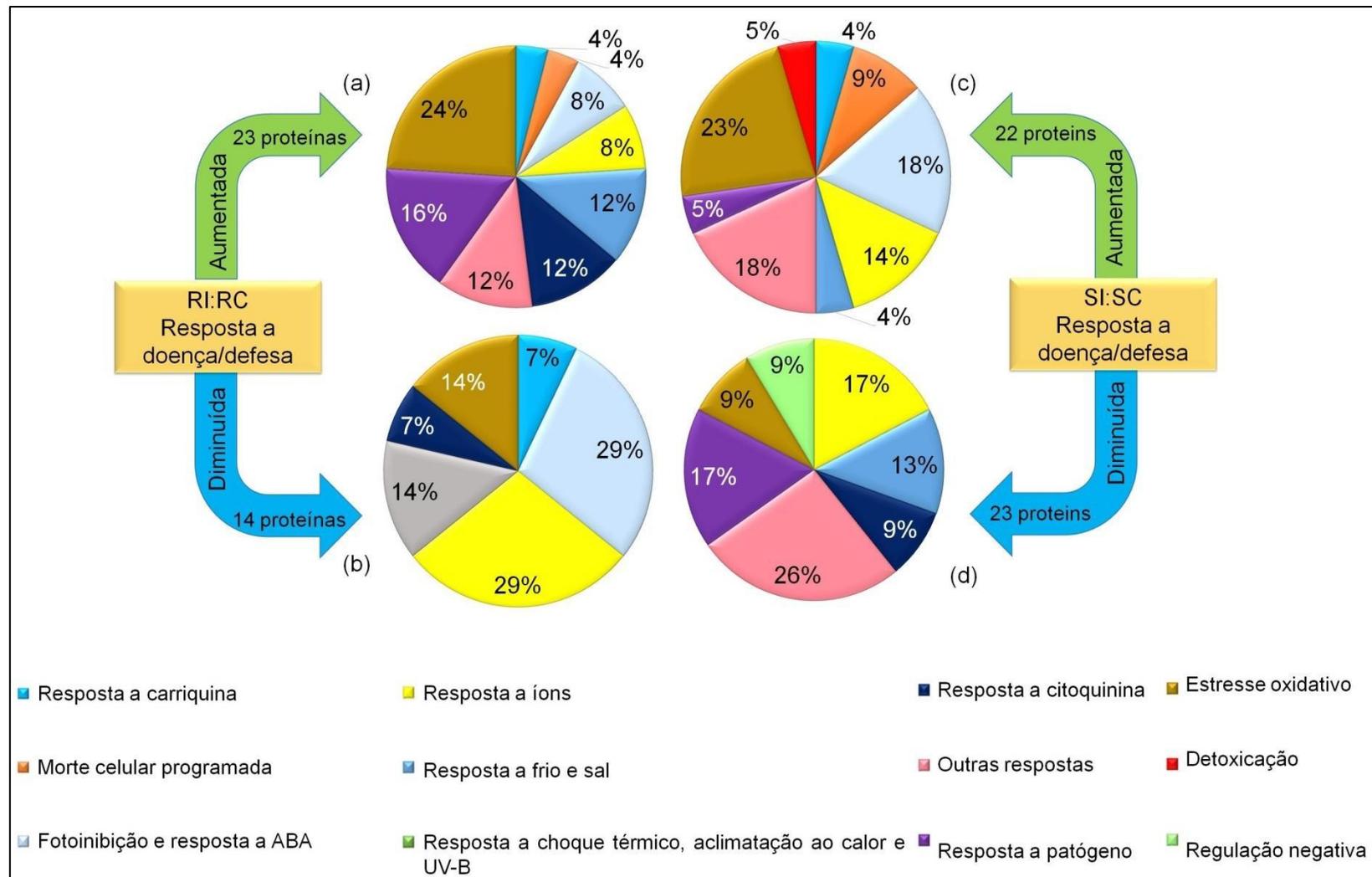


Figura 12. Subclassificação das proteínas envolvidas na resposta a doença/defesa. Gráfico mostrando a diferença na abundância destas proteínas entre as cultivares, quando comparadas com os respectivos controles. A e C) abundância aumentada nas comparações resistente (RI:RC) e suscetível (SI:SC), respectivamente. B e D) abundância diminuída na comparação resistente (RI:RC) e suscetível (SI:SC), respectivamente.

inicial (etapa 1 no modelo), como as proteínas lectina *like* (A0A0D3CJY3, GN=106343897), receptores quinase ricos em leucina *LRR-RLK* (A0A0D3D099), receptores serina rico em leucina tipo serina treonina quinase (A0A0D3CSX5). Essas proteínas sinalizadoras juntamente com outras proteínas (NB-LRR), podem ser essenciais no reconhecimento do patógeno para promover a imunidade sistêmica (O'NEILL; BOWINE, 2007; COUTO; ZIPFEL, 2016). Outras proteínas de sinalização foram identificadas com abundância aumentada incluindo a proteína universal de estresse A (A0A0D3CN30, 1062925588) e a de estresse universal PHOS34-*like* (A0A0D3CTQ3, 106296807). Embora o papel exato da proteína PHOS34 na defesa de plantas não seja bem elucidado, estudos relataram que esta proteína pode ser fosforilada por MPK3 e MPK6, após tratamento com o peptídeo flagelina flg22 (MERKOUROPOULOS et al., 2008), sugerindo que esta proteína participa do processo de sinalização na presença de bactéria.

Um grande número de proteínas antioxidantes/de detoxificação também tiveram abundância aumentada, incluindo superóxido dismutase Fe (*FSD1*, F8U7Z7/RTq-PCR), peroxidase (106292770, A0A0D3C7R8), peroxiredoxina (106311656, A0A0D3DSN3; 106320257, A0A0D2ZRQ6; 106340130, A0A0D3BYD5) e glutathiona S-transferase U5 e U19 (106336013, A0A0D3B771; 106301073, A0A0D3CVZ5). O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (*ROS – reactive oxygen species*) pode ser tóxica para o patógeno por inibir e/ou reduzir o número de sobreviventes (JONES; DANGL, 2006; ZHANG; ZHOU, 2010). Entretanto, o acúmulo de *ROS*, no interior da célula vegetal, pode ser prejudicial e causar efeitos como oxidação de lipídios, material genético e outros componentes celulares importantes (SHARMA et al., 2016).

A diminuição de outras proteínas antioxidantes, extra e intracelular, incluindo peroxidase glutathiona mitocondrial; (A0A0D3AT05, 106321579; A0A0D3DQE3, 106309564) peroxidase *3-like* (A0A0D3C7R9, 10629260); peroxiredoxina mitocondrial (*A0A0D3CMF0, N/A) e peroxidase 32 (*A0A0D3E2V6, 106312869) na interação resistente é intrigante e pode indicar que um balanço na abundância de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo pode estar ocorrendo, e aumentar ou diminuir a abundância de algumas proteínas importantes para combater *ROS* pode ser uma estratégia importante no controle do patógeno sem provocar danos extensivos ao tecido da planta.

Em um segundo momento, quando o patógeno consegue burlar a primeira linha de defesa da planta e liberar efetores para suprimir a defesa da planta, outros eventos podem ocorrer em resposta a esses efetores liberados extracelularmente ou entregues no interior da célula hospedeira através do sistema de secreção tipo III (SST3) da bactéria. Nesse momento, proteínas do hospedeiro podem identificar esses efetores. Essas proteínas, incluindo NB-LRR, podem interagir com os efetores do patógeno e promover uma cascata de sinalização para ativação de genes de defesa (SPALLEKA; ROBATZEK; GÖHRE, 2009; MARINO et al., 2012). No presente trabalho, foram identificadas proteínas de sinalização incluindo receptores quinases rico em leucina do tipo PEPR1 (A0A0D3D099), que tem sido relatado como o receptor AtPep1, um elicitor peptídico de *Arabidopsis* que sinaliza a ativação da resposta imune inata contra patógenos (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2006), bem como uma provável proteína quinase serina/treonina LRR At1g29720 *RFK1-like* (A0A0D3CSX5). Ambas as proteínas são componentes integrais da membrana (modelo-passo 1) e podem estar envolvidas no desencadeamento de uma resposta de defesa em repolho.

A via de ubiquitinação também parece desempenhar um papel importante na interação resistente analisada neste estudo. A proteína 14-3-3-GF14 *kappa* (A0A0D3BET0, 106336315), conhecida como regulador do metabolismo associado ao estresse abiótico, foi identificada e pode modular outras proteínas, facilitando sua degradação pelas ubiquitinas (FULLER et al., 2006; CHANG et al., 2009; LIU et al., 2017). A via da ubiquitina é necessária para marcar as proteínas que devem ser degradadas, no entanto, efetores bacterianos também podem interagir com o sistema de proteossoma ubiquitina (*USP ubiquitin proteasome system*) como uma proteína falsa do sistema (ver modelo), nesse caso, os efetores podem ser ubiquitinados e degradados por proteossomos no lugar de proteínas que precisam ser degradadas. Os efetores bacterianos também podem interferir no sistema, agir como uma ubiquitina ligase ou inibir as etapas específicas da USP (COLLINS; BROWN, 2010).

Proteínas relacionadas à ubiquitinação mostraram abundância reduzida no presente trabalho (A0A0D3CJZ8; A0A0D3ARJ5, A0A0D3ECQ3, A0A0D3BLH4). Em uma planta altamente resistente, as proteínas de ubiquitinação também apresentaram redução na abundância em 24 h (RIBEIRO et al., 2018), o que pode

indicar que pode estar ocorrendo uma regulação negativa dessa via, levando à morte celular e conseqüente limitação do crescimento bacteriano (SPALLEKA; ROBATZEK; GÖHRE; MARINO et al., 2012). A infecção por patógenos também pode causar danos importantes às organelas, como as mitocôndrias, e foi observado que as plantas Astrus Plus aumentaram a abundância de proteínas do mecanismo de reparo mitocondrial (A0A0D3C7E7, 106343611).

As proteínas envolvidas na defesa contra o patógeno também foram aumentadas, incluindo a Ferredoxina-NADP de folha isoenzima 1 e 2, cloroplástica (A0A0D3E2R1, 106318130; A0A0D3DQI2, 106307428) e anexina (I3Y171, N/A). As anexinas são membros de uma família conhecida de proteínas envolvidas na tolerância contra estresses ambientais e foram estudadas em plantas de tabaco, algodão, *Brassica* e *Arabidopsis* (JAMI et al., 2008; KONOPKA-POSTUPOLSKA et al., 2009; CLARK et al., 2012; SZALONEK et al., 2015). A proteína AIG2 (A0A0D3BZV5, 106342351) foi identificada e pode estar relacionada com a defesa da planta, apesar de não ter sido caracterizada funcionalmente, inicialmente os genes AIG1 e 2 foram relatados como genes induzidos por genes de avirulência (*avrRpt2*-induced) em 1996 quando, nos estágios iniciais da infecção, identificados em *Arabidopsis* infectada por *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (REUBER; AUSUBEL, 1996). Pouco se sabe sobre a função desses genes, mas o gene AIG2 também tem sido relatado, com expressão aumentada, em plantas submetidas a insetos (SHARMA, 2016), sob estresse abiótico (SUBRAMANIAN, 2016; Qiu et al., 2017) e germinação de sementes (HAUSER et al., 2018).

A defesa da planta também pode estar relacionada com o aumento dos níveis de alguns fitormônios incluindo ácido jasmônico (AJ). Etileno (ET), ácido abscísico (ABA) e citoquininas. Além de lectinas, outras proteínas associadas à produção de AJ foram identificadas, como proteínas associadas a lipídeos plastidiais (2 e 3) de cloroplasto (A0A0D3A546, 106292489; A0A0D3BRT9; 106342579), com abundância aumentada. O AJ é importante na defesa da planta contra vários estresses. Como observado no modelo esquemático, a ativação indireta da via de AJ pela via dos octadecanoides e acumulação de H₂O₂ pode resultar na ativação da resposta ao estresse biótico. A via de AJ pode ativar outras vias como a via de transdução de sinal, o que induz a formação de barreiras químicas e físicas contra patógeno e ataque por herbivoria (KAZAN; MANNERS, 2008).

Citoquinina, outro fitormônio, além de influenciar em diversos aspectos no desenvolvimento da planta incluindo germinação de sementes, diferenciação celular, desenvolvimento de flores e frutos, senescência de folhas (HWANG; SHEEN; MÜLER, 2012), pode estar envolvido na sinalização de vias de defesa da planta. Alguns trabalhos reportaram que os níveis elevados desse hormônio aumentaram a imunidade da planta contra patógenos fúngicos e bacterianos (SWARTZBERG et al., 2008; CHOI et al., 2010; ARGUESO et al., 2012). As citoquininas tem um papel importante na modulação da sinalização de defesa, além do ácido salicílico (AS) e JA, citados anteriormente. No presente estudo, algumas proteínas em resposta a citoquininas tiveram abundância aumentada em plantas resistentes, incluindo a proteína ribossomal cloroplástica 50S (A0A0D3C0C3, 106337149); proteína de ligação ACD11 1, isoforma X2 (A0A0D3AJE9, N/A); succinato desidrogenase subunidade 5 mitocondrial-*like*, isoforma X2 (A0A0D3DK02, 106309508). Baseado nesses resultados, observa-se que a regulação de proteínas responsivas a esses fitormônios podem desempenhar um papel importante na resistência contra Xcc, uma vez que em plantas suscetíveis esse perfil não foi observado.

Metabólitos secundários também podem ter um importante papel na defesa da planta, como relatado anteriormente, proteínas associadas a lipídeos plastidiais (1, 2 e 3), cloroplástico foram identificadas com abundância aumentada. Essas proteínas são associadas ao armazenamento de carotenoides em plantas e sequestro de compostos hidrofóbicos (TING et al., 1998; LAIZET et al., 2004; LEITNER-DAGAN et al., 2006).

Por fim, se os mecanismos iniciais para defesa da planta contra a invasão do patógeno não forem suficientes para contenção e/ou eliminação, mecanismos de morte celular podem ser ativados. No presente trabalho, proteínas envolvidas no processo de morte celular foram encontradas, como a metacaspase 4 (A0A0D3D1T5, 106300010), considerada uma proteína importante desse mecanismo (KWON; HWANG, 2013). Essa proteína mostrou abundância aumentada em ambas as interações, e a expressão do gene correspondente foi avaliada por RTq-PCR. A análise de expressão do gene mostrou que em plantas resistentes a expressão desses genes foi maior (7 vezes) que em plantas suscetíveis (2 vezes). Em conjunto, o modelo aqui apresentado pode representar um passo-a-passo do mecanismo de defesa em plantas resistentes, começando com o reconhecimento do

patógeno, envolvendo importantes proteínas de sinalização, ativação de respostas moleculares e resposta ao estresse oxidativo (etapas 1-3) (Figura 13), seguidas por modulação de *UPS* e proteínas de reparo (etapa 4) e alterações em vias metabólicas e fotossintéticas (etapa 3 e 4). O modelo esquemático, também pode contribuir para o melhor entendimento da resposta molecular durante a interação planta-patógeno, refletida na abundância diferencial de proteínas nas plantas sob infecção por *Xcc*.

5.4 VALIDAÇÃO FUNCIONAL POR SUPEREXPRESSÃO EM *A. thaliana*

Baseado na prospecção de proteínas das folhas de *B. oleracea* var. *capitata*, após 24 h de infecção por *Xcc*, 3 proteínas (A0A0D3BPL2; A0A0D3CQU9; A0A0D3B9D8) não caracterizadas foram selecionadas. No entanto, com recursos oferecido pelo UniProt, foi possível predizer o nome das proteínas. O UniProt é um consórcio que integra vários membros, incluindo NCBI, EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute*), PIR (*Protein Information Resource*), SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*), fornecendo links que possibilitam mais informações sobre a proteína e o genoma. A primeira proteína selecionada apresentou homologia com uma endoquitinase básica CHB4 presente em *B. oleracea* var. *oleracea*, codificada pelo gene *CHIB4*, com identidade de 100%, e com outra em *B. napus*, *B. rapa* (90%), e com outras proteínas em *Arabidopsis* com 50% de similaridade incluindo endoquitinase At2g43580 em *A. thaliana*.

A segunda proteína selecionada mostrou similaridade de 100% com uma *epithiospecifer* (ESP) em *B. oleracea* var. *italica* e outra não caracterizada em *B. napus* (*BnaC06g06830D*), *B. rapa* (90% e 98%), e outra com menor similaridade (75%) em *Arabidopsis*, codificadas pelo gene homólogos *ESP*. A terceira proteína mostrou homologia com uma a UDP-arabinopiranosose mutase 1 (UAM), codificada pelo gene *RGP1*, em *B. oleracea* var. *oleracea*, uma não caracterizada em *B. cretica*, *B. campestris* e *B. oleracea*, e mostrou similaridade com outra UAM em *A. thaliana* com 90% de similaridade.

As sequências de nucleotídeos dos genes que codificam as proteínas de interesse, e que mostraram similaridade de 100% com *B. oleracea* var. *oleracea*, foram obtidas em um *link* no UniProt, vinculado ao banco de dados *EnsemblPlants* (endoquitinase, *Bo4g020920.1*; *epithiospecifer*, *Bo6g032960.1*; UAM,

Bo3g055540.1). As sequências foram submetidas à ferramenta BLASTn no banco de dados NCBI, na busca de genes homólogos em *B. oleracea* var. *capitata* (taxid:3716).

Os genes que codificam as proteínas de interesse foram alinhados com sequências presentes em plantas de repolho com similaridade >98%. A árvore filogenética (Figura S4), obtida pelo método *Neighbor-joining* (*bootstrap* 1000) mostrou que os genes de interesse estão mais próximos entre as outras espécies de brassicas (>95%) do que das espécies de *Arabidopsis*. No entanto, mesmo com a diferença entre os ramos, existe relação filogenética entre as espécies de interesse de *Brassica* e *Arabidopsis* com similaridade filogenética <80%, que não foi ignorada durante o desenho dos primers específicos, para não haver amplificação do DNA de *Arabidopsis*, e eliminar os falsos positivos na confirmação de transformação por PCR e sequenciamento.

5.4.1 Proteínas escolhidas para validação dos respectivos genes

5.4.1.1 Endoquitinase

O gene putativo *CHB4-like* que codifica a proteína endoquitinase básica CHB4 (A0A0D3BPL2) foi superexpresso em *Arabidopsis*. Inicialmente, a análise proteômica de repolho mostrou que essa endoquitinase foi aumentada, na presença de Xcc na planta resistente. Uma proteína endoquitinase básica CHB4 homóloga (A0A0D3B6J8) foi encontrada 12 vezes menos abundantes nas plantas de repolho suscetíveis, quando comparado com os controles. Um alinhamento mostrou várias diferenças nas sequências de aminoácidos entre elas, sugerindo que a CHB4 encontradas com abundância diminuída pode ter sofrido modificação pós traducionais, pois a similaridade entre as sequências foi superior a 85%. Após a tradução da proteína pode ocorrer modificações que incluem adição covalentes que podem regular a função da proteína e conseqüentemente o estado de atividade, além de determinar a localização celular a dinâmica de interação com diferentes proteínas, o que pode mudar totalmente a propriedade das proteínas. De um modo geral, as modificações pós-traducionais podem ser vistas como um mecanismo estratégico celular para não utilizar o controle transcricional para não correr o risco de gerar proteínas que podem não ser utilizadas num dado momento. Essas modificações também podem levar ao processamento proteolítico e mudança

conformacional ativando uma proteína, ou levar à degradação, e, portanto, eliminação de tal proteína, modificando de certa forma a abundância de tal proteína. Sabe-se que as modificações não podem ser preditas através da sequência mas pode ser possível detectar os locais de sua ocorrência, devido a modificações na sequências, com adição de grupos funcionais (sulfato, acetato, metil, fosfato), ou modificações nas cadeias de carboidratos e/ou lipídios, ocasionando assim alterações na hidrofobicidade e/ou localização da proteína, além de modificações, como a fosforilação, controlar diretamente o comportamento da enzima ativando-a ou inativando-a (LODISH; BERK; ZIPURSKY, 2000; THEILLET et al., 2012; FRISO; VAN WIJK, 2015)

A proteína CHB4 consiste em uma quitinase, que pode ser encontrada na parede celular e apoplasto e na região extracelular. Esta proteína é capaz de ligar-se reversivamente à quitina, presente em parede celular de fungos e exoesqueleto de insetos. As proteínas CHB4 pertencem à família das quitinases da classe I, possuem um motivo estrutural, comum às quitinases, de aproximadamente 30-43 resíduos, um domínio de ligação à quitina tipo 1, com a presença de cisteína conservada envolvida nas ligações dissulfetos (WRIGHT; SANDRASEGARAM; WRIGHT, 1991). As quitinases, além de participarem de processos catabólicos celulares (STINTZI et al., 1993), podem também ser classificadas como proteínas relacionadas a patógeno, conhecidas como PRs (*Pathogen Related*). Em geral, as quitinases são comumente citadas como proteínas de defesa na interação planta-fungo. As proteínas CHB4 pertencem ao grupo 3 das PRs (revisado por JALIL et al., 2015).

Em um estudo com quitinase de *B. juncea* (BjCH1) foi demonstrado que essa proteína pode ser efetiva no controle de fungo e bactérias (GUAN; CHYE, 2008). Quitinases podem inibir o patógeno *Alternaria brassicae*, em testes *in vitro*, com a proteína extraída de folhas de *B. juncea* transgênica (MONDAL et al., 2002). Na análise da expressão de genes que codificam quitinases da classe IV em *Brassica* foi demonstrado que os genes *BrCLP1*, *BrCLP2* e *BrCLP3* regularam positivamente na presença de *Proteobacterium carotovorum* sub. *carotovorum*, sugerindo que esses três genes podem estar envolvidos na resistência das plantas contra estresse biótico (AHMED et al., 2012).

Apesar de não terem sido encontrados trabalhos de caracterização funcional de genes de endoquitinases em repolho infectado com Xcc, baseado em trabalhos

que testaram quitinases da mesma família em plantas de *Brassica*, o resultado do presente trabalho, que será detalhado a seguir, demonstrou que a superexpressão desse gene em planta modelo pode ter efeito na resistência à Xcc.

5.4.1.2 Proteínas *Epithiospecifer-like*

O resultado do proteoma das plantas de repolho analisadas, mostrou que a abundância da proteína *epithiospecifer like* (A0A0D3CQU9) não foi alterada em plantas resistentes, mas em plantas suscetíveis essa proteína teve abundância diminuída (*2-fold change*). No entanto, a análise por RTq-PCR demonstrou maior expressão do gene correspondente em plantas resistentes (23 vezes), do que em plantas suscetíveis (3 vezes). Um estudo prévio por 2-DE (RIBEIRO et al., 2018), mostrou que a proteína ESP estava presente apenas nas plantas resistentes, demonstrando que a regulação dessa proteína pode ser importante no processo de defesa contra Xcc. Portanto, essa proteína foi escolhida para que o gene correspondente fosse superexpresso em *Arabidopsis*.

As proteínas ESP estão relacionadas com a via dos glucosinolatos em plantas, demonstrando envolvimento na proteção contra herbivoria. Glicosinolatos podem ser encontrados comumente em plantas da família *Brassicaceae* incluindo espécies como *A. thaliana* e *Brassica*. Os glicosinolatos, fitoquímicos diversos, compostos biologicamente ativos (BENNETT; WALLSGROVE, 1994; HALKIER; GERSHENZON, 2006; AHUJA et al., 2015), são metabólitos secundários ricos em enxofre, e compreendem um duplo sistema, utilizado como mecanismo de defesa da família *Brassicaceae*, conhecido como sistema 'glucosinolato-mirosinase', uma característica distintiva da família (BONES; ROSSITER, 1996; KLIEBENSTEIN; KRYOYMAN; MITCHELL-OLDS, 2005; HOPKINS, VAN DAM; LOON, 2009),

Glucosinolatos e mirosinases estão em compartimentos distintos da célula e podem interagir quando há danos no tecido foliar (BONES; ROSSITER, 1996; KELLEY; BONES; ROSSITER, 1998), por isso foi proposto que pode haver associação entre a barreira física e o sistema "glucosinolato-mirosinase", sustentada por observação de mudanças em mutantes de *Arabidopsis*, onde, foi observado que há uma associação da defesa química, representada pelo sistema 'glucosinolato-mirosinas' e a barreira física, defesa cuticular (AHUJA et al., 2016). Os resultados do presente trabalho, que serão detalhados a seguir, também podem reforçar essa

associação, uma vez que comparado aos controles, as plantas transgênicas *BoESP* não apresentaram sintomas da podridão-negra.

A hidrólise do glicosinolato por mirosinases pode produzir diversos compostos incluindo isotiocianatos, nitrilos, epithionitrilos e oxazolidina-tione (RASK et al., 2000; ROHLOFF; BONES, 2005; BONES; ROSSITER, 2006; WITTSTOCK; BUROW, 2010). As proteínas ESPs estão associadas à hidrólise do glicosinolato, assim como outros cofatores de proteínas incluindo nitrila (NSPs) e proteínas formadoras de tiocianato (TFPs) (MacLEOD; ROSSITER, 1985; KISSEN; BONES, 2009; KONG; KISSEN; BONES, 2012).

A ação das ESPs ainda não está bem elucidada, mas sabe-se que essas proteínas podem interferir no processo de hidrólise do glucosinolato e desviar a hidrólise da produção de compostos isotiocianato para os nitrilos/epithionitrilos e tiocianato. Em *B. napus*, essas proteínas parecem regular a natureza dos produtos de degradação derivados da hidrólise de glucosinolatos de alcalino, sugerindo que, conseqüentemente, podem regular o perfil de bioativo de plantas de interesse alimentício (FOO et al., 2000). A produção aumentada de nitrilos, causada pela ação da ESP, pode diminuir a atividade de herbivoria em *Arabidopsis* (LAMBRIX et al., 2006), e alguns produtos de hidrólise do glicosinolato podem atuar como composto de defesa da planta contra patógeno (Revisado por KISSEN, ROSSITER; BONES, 2009).

5.4.1.3 UDP-arabinopiranosose mutase 1

A UDP-arabinopiranosose mutase 1 (UAM1) codificada pelo gene *RGP1 like*, é membro da família RGPs (*Reversibly Glycosylated Proteins*). Essa família é composta por proteínas citosólicas específicas de plantas, que podem associar-se ao Golgi, e que participam da síntese de polissacarídeos (LANGEVELD et al., 2002; KONISHI et al., 2006; KONISHI et al., 2010). Em *Arabidopsis*, essa família é composta por 5 membros incluindo a proteína UDP-arabinopiranosose mutase, que catalisa a formação de UDP-L-arabinofuranose (UDP-Araf) a partir de UDP-L-arabinopiranosose (UDP-Ara). Trata-se de uma conversão indispensável para o estabelecimento de paredes celulares e desenvolvimento de plantas (RAUTENGARTEN, et al., 2011).

A parede celular é uma estrutura importante na célula da planta, não apenas para manter pressões hidrostáticas internas, ou proporcionar flexibilidade para suportar a divisão celular ou pelo seu papel bioquímico que permite a diferenciação. A parede celular pode representar um papel importante estrutural como uma barreira ambiental e patológica, que pode proteger a planta contra diferentes estresses (SCHELLER; ULVSKOV, 2010 ; HAMANN, 2012 ; TUCKER; KOLTUNOW, 2014). Proteínas glicosil-transferases (GTs) podem ser reguladas através do estresse abiótico e biótico, sendo que alguns membros, incluindo a proteína GT61 e GT75, essa última anotada posteriormente como UAM, estão amplamente implicados na resposta de defesa (LIWANAG et al., 2012; HOUSTON et al., 2016).

Sabe-se que proteínas RGP1 podem estar associadas com a biossíntese de polissacarídeos, processos de desenvolvimento e podem ser um importante componente para a parede celular (KUTTIYATVEETIL; SANDERS, 2017). Alguns trabalhos relatam que RGP1 pode ter envolvimento na defesa de tomate contra fitopatógenos (SELTH et al., 2006). A ocorrência natural de RGPs em *Arabidopsis* não foi um problema para superexpressão, uma vez que utilizamos plantas suscetíveis, e os primers de *Brassica* para RTq-PCR foram específicos para região do gene inserido. Na análise das plantas transgênicas, os transgenes *BrRGP1* por RTq-PCR estavam positivamente regulados, como será detalhado a seguir.

5.4.2 Transformação genética de *A. thaliana*

Plantas de *A. thaliana* (WT), no estágio de floração, foram utilizadas para transformação via *floral dip* mediada por *Agrobacterium*. Botões florais de 5 plantas foram utilizados para transformação de cada construção, com tempo de imersão dos botões de 30 segundos. A repetição da técnica ocorreu 24 h depois, para otimizar a transformação e obter mais linhagens transgênicas. Aproximadamente 100 plantas foram resistentes ao antibiótico Canamicina, devido à presença do gene no vetor binário. Entre as plantas transformadas com o gene *BoESP*, apenas 20 foram recuperadas (T0) do meio seletivo. O semeio de 0,1 g (aproximadamente 1000 sementes), mostrou eficiência de transformação de aproximadamente 10% para as plantas transgênicas *BoCHB4* e *BoRGP1*, e 2% para *BoESP*.

Para a confirmação da presença dos genes nas linhagens, foram realizadas análises de PCR e sequenciamento (em T0, T1, T2 e T3), com DNA total extraído de

plantas de *Arabidopsis*, com os respectivos primers para os genes de interesse. Foram obtidos produtos da amplificação com tamanho esperado para cada um (Tabela 1, Figura S5).

Inicialmente dez plantas T0 transformadas, confirmadas por PCR e sequenciamento, foram transferidas para substrato e após autofecundação geraram sementes T1 (linhagens transgênicas). Após a germinação, sementes de 10 linhagens T1 foram cultivadas para obtenção das sementes T2. Em plantas da geração T2, foi realizado o teste de homozigose. Para o teste de homozigose, foram cultivados subgrupos de 48 plantas, de 10 linhagens na geração T2, com cada gene. O teste χ^2 (p < 0,05) confirmou que, das 10 linhagens *BoCHB4*, 8 estavam em homozigose, entre as *BoESP*, 5 estavam em homozigose, e entre as plantas das linhagens *BoRGP1*, 7 estavam em homozigose. Foram cultivadas cinco linhagens T2 em homozigose, e além do sequenciamento para confirmação da presença do transgene, foi realizada análise de *Southern blot*.

5.4.3 Caracterização molecular e Bioensaio

A presença dos transgenes em linhagens T2 por análise de *Southern blot* foi verificada em cinco amostras de DNA digeridas. O número de cópias foi estimado utilizando a enzima *XbaI* (Figura 14). Foi confirmada a presença de uma cópia do gene em cada uma das cinco linhagens *BoCHB4* e *BoRGP1*, e entre as linhagens *BoESP* foi observada a cópia do gene apenas em um evento por *Southern blot*, apesar de ser confirmado por PCR e sequenciamento, sendo necessária à repetição da técnica de *Southern blot*, pois um dos eventos que não apresentaram resultado no *Southern blot* foi analisada por RTq-PCR e apresentou nível de expressão elevada do gene (Figura 14).

Como citado anteriormente, a análise revelou a presença de 1 cópia do transgene nas linhagens como observado em outros trabalhos de transformação mediados por *Agrobacterium* (ZHAO et al., 1998; SHOU et al., 2004b). Diferente de outros métodos de transformação, como biobalística, por exemplo, capaz de introduzir múltiplas cópias do transgene no genoma transformado (HANSEN; CHILTON, 1996; SHOU et al., 2004a), a inserção de uma cópia pode ser uma vantagem, pois o número de cópias inserido no genoma da planta modelo pode ser um fator determinante para a qualidade das linhagens transgênicas.

Múltiplas cópias do transgene inseridas podem levar a problemas no desenvolvimento, metabolismo da planta e possíveis desarranjos do cromossomo (KIM et al., 2004). Para análise por RTq-PCR, um evento na linhagem T3 foi selecionado para avaliar o nível de expressão dos genes de interesse (Figura 14) e o bioensaio de inoculação por *Xcc in vitro* foi realizado para avaliar o efeito da superexpressão dos genes *na resistência à Xcc* em todos os 5 eventos.

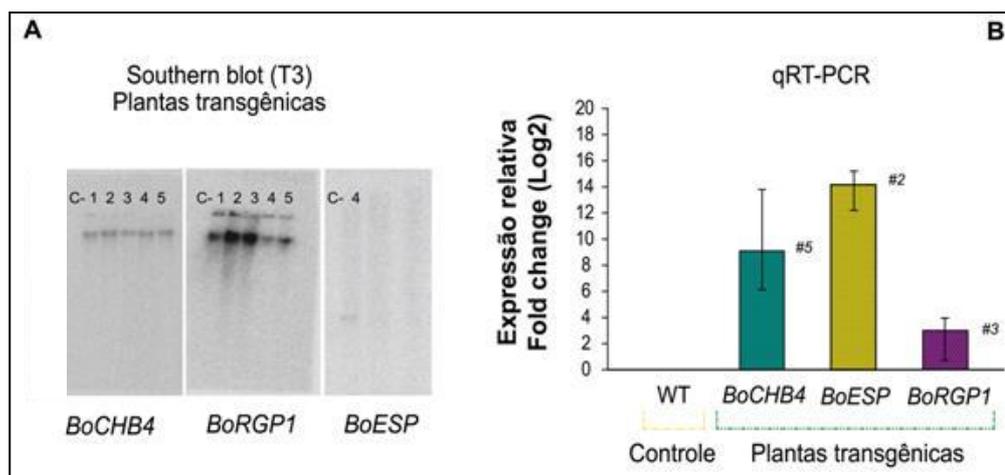


Figura 14. Southern blot das linhagens T2 transformadas via *Agrobacterium*, por floral dip (a). 3 µg do DNA genômico foram digeridos com *Xba*I e marcado com a sonda (preparada com o produto de PCR dos genes *BoCHIB4* da endoquitinase (#1), *BoESP* da *epitithiospecifer* (#4) e *BrRGP1* da arbabinopiranese mutase 1 (#2)), para identificar o número de cópias do gene. (C-) controle negativo plasmídeo com vetor pBIN61 vazio. (C+) Produto de PCR do respectivo gene. Análise da expressão dos transgene por RTq-PCR (B) evento #5 da linhagem *BoCHB4*, evento #2 da linhagem *BoESP* e evento #3 da linhagem *BoRGP1*. (WT *wild type*) controle negativo, plantas não transgênicas. Os dados foram normalizados com os genes de referência para *Arabidopsis*, *ACT2*, *EF-1* e *GAPDH*. (#) o evento, entre os cinco, escolhido para a respectiva análise.

A análise da expressão dos genes de repolho em plantas transgênicas foi realizada utilizando o cDNA de 3 réplicas biológicas de cada linhagem e 3 técnicas. Para normalizar a expressão dos genes, foram comparadas plantas transgênicas com não transgênicas (WT). Dados de expressão dos genes de referência em *Arabidopsis* (*ACT2*, *EF1α* e *GAPDH*) foram utilizados para normalização, após confirmação de estabilidade no *GeNorm*. O resultado do *GeNorm* mostrou que os genes tiveram valor $M < 1,5$, limiar do algoritmo para considerar a estabilidade do gene, no entanto com o valor V , na comparação múltipla em pares, o par de genes considerado mais estável e menos variável foi *ACT2* e *GAPDH*. A análise revelou que os genes de repolho tiveram a expressão regulada positivamente em

Arabidopsis transformadas (Figura 14). As plantas transgênicas mostraram expressão do gene *BoCHIB4* de 588-vezes, *BoESP* (22.000-vezes) e *BoRGP1* de 7-vezes quando comparadas com as plantas WT (com valor 1, após normalização), confirmando que os níveis de expressão dos genes de repolho inseridos em *A. thaliana* estavam aumentados. Como os valores estão expressos em Log2, o valor do controle não aparece no gráfico.

Curiosamente, as linhagens *BoESP* apresentaram tamanho reduzido quando mantidas no meio de seleção MS, em relação às outras plantas transgênicas com a mesma idade (Figura 15). O resultado da PCR e sequenciamento demonstrou que não se tratava de falso positivo, e as plantas retomaram o crescimento, quando transferidas para meio de cultura não seletivo e/ou substrato.

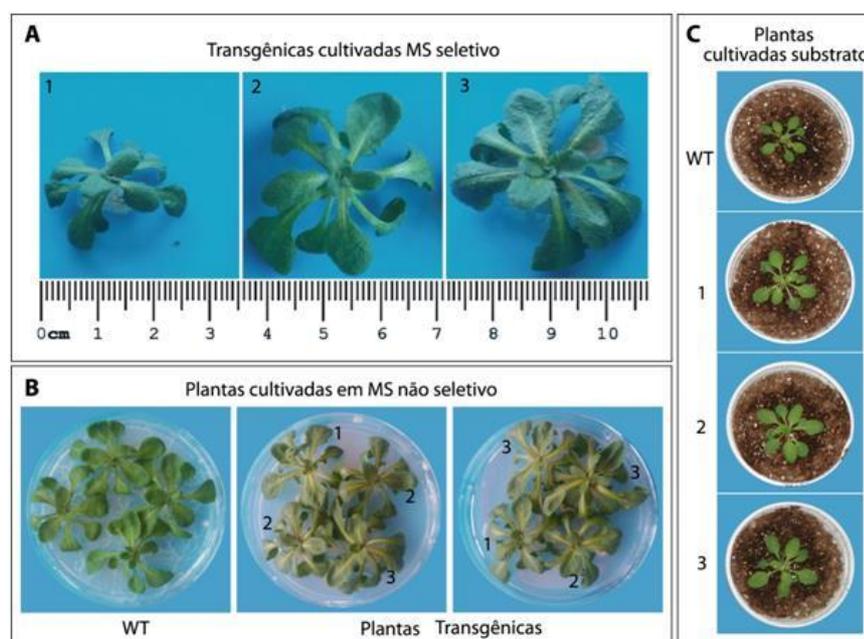


Figura 15. Diferença das plantas transgênicas *BoESP*. (A) mostrando menor crescimento, das plantas *BoESP* (1) em comparação com as outras transgênicas, *BoCHB4* (2) e *BoRGP1* (3), da mesma idade (rosetas juvenis com ~30 dias) cultivadas em meio seletivo MS+antibiótico. (B) mostrando a retomada do crescimento das plantas *BoESP* (1) quando transferidas para o meio MS sem antibiótico, juntamente com o controle (WT), *BoCHB4* (2) e *BoRGP1* (3); (C) mostrando as plantas *BoESP* (1) selecionadas no MS+antibiótico juntamente com as demais transgênicas *BoCHB4* (2) e *BoRGP1* (3), e controle transferido do MS para o substrato (WT).

De alguma maneira, as linhagens *BoESP* podem ter sido afetadas na presença do antibiótico, apesar das plantas selecionadas não apresentarem clorose, que geralmente pode ser causada por deficiência na síntese de clorofila, essas

plantas mostraram inibição no crescimento indicando uma possível alteração mitocondrial (Revisado por ARAGÃO; BRASILEIRO 2002). Sabe-se que alguns antibióticos da família dos aminoglicosídeos incluindo a Canamicina, podem inibir a síntese de proteína em células bacterianas. Esses antibióticos se ligam à subunidade 30S do ribossomo e são capazes de interferir na fidelidade do processo de tradução. Em células vegetais, antibióticos desse tipo podem agir de forma semelhante. Considerando que mitocôndria e cloroplasto (mtDNA e cpDNA) podem ter origem endossimbióticas, essas organelas possivelmente retiveram algumas cópias, em seu próprio DNA circular, vestígios do DNA bacteriano, o que pode contribuir para a vulnerabilidade a alguns antibióticos (MARTIN et al., 2002; TIMMIS et al., 2004; REYES-PRIETO; WEBER; BHATTACHARYA, 2007; WANG et al., 2015). Assim, como algumas plantas no momento do transplante após o *floral dip*, não foram consideradas para gerar sementes T1, mesmo com tamanho normal de plântula de 7-10 dias (Figura S5), pode ter sido falso-negativo, o que pode ter contribuído também para a baixa eficiência de transformação relatada, uma vez que a primeira seleção é realizada baseada apenas do fenótipo da planta parental. Apesar de especulativo, a Canamicina afetou de alguma maneira as plantas superexpressando o gene da *epithiospecifer*, mas assim como já observado esse efeito foi reversível (DUAN et al., 2009). Esses resultados podem ser um piloto para outros trabalhos relacionados ao efeito de Canamicina em algumas plantas transformadas com marcador de seleção para esse antibiótico.

A deficiência de clorofila nas plântulas, da linhagem *BoESP*, ignorada para transplante, pode não ter sido causada pela não inserção do gene e sim pelo mau funcionamento do cloroplasto, uma vez que as plantas não transformadas, totalmente clorótica (Figura S6), não alcançaram a fase de plântula de 5 dias, e as plântulas transformadas desenvolveram para o estágio de plântulas de 7-10 dias (com folhas verdadeiras), no momento da transferência.

Com os resultados de *Southern blot* foi confirmada a inserção do gene nas plantas transgênicas e a avaliação do nível da expressão do gene foi confirmado por RTq-PCR (Figura 14). Mesmo as linhagens *BoESP* homozigose, confirmadas por PCR e sequenciamento, terem apresentado dificuldade em desenvolver na presença de antibiótico, o ensaio *in vitro* (Figura 16) não foi comprometido, pois após a seleção em meio seletivo, as plântulas com idade de 7-10 dias foram transferidas

para meio de cultura não seletivo para o ensaio ser realizado nas mesmas condições que as plântulas WT. Assim como os testes nas demais linhagens, no ensaio plantas transgênicas e WT, foram mantidas na condição de cultivo e idade, para aspersão com a bactéria Xcc. Plantas WT foram aspergidas com solução salina e silwet apenas para controle da solução e meio de cultura, e não sofreram alteração fenotípica mesmo depois de 15 dpi.

Por terem sido confirmadas por PCR, sequenciamento, mesmo com o resultado de *Southern blot* mostrando a presença do gene em um evento, os demais eventos em homozigose foram mantidos para a avaliação fenotípica no bioensaio de aspersão por Xcc, pois um dos eventos que não mostrou presença da cópia no resultado de *Southern blot* foi avaliado anteriormente por RT-qPCR e apresentou nível de expressão elevado (22.000-vezes) quando comparado com WT, indicando a necessidade de repetir a análise de *Southern blot* nas linhagens *BoESP*.

Curiosamente, foi observado que houve diferença na biomassa das raízes entre as plantas controle e transgênicas *BrRGP1* e a roseta maior (Figura 16). O crescimento *in vitro* mostrou diferentes formas de difusão radicular no meio de cultura. A expansão de raízes em plantas transgênicas ocorreu horizontalmente, enquanto nos controles elas apresentaram uma penetração transversal. Embora o tamanho das raízes dos controles, visualmente, tenha sido maior do que as plantas transformadas, o peso foi basicamente o mesmo. A área de superfície radicular das plantas pode cobrir maior área do substrato e, conseqüentemente, absorver mais água e nutrientes, o que pode representar uma vantagem agroeconômica. Estas funções estão diretamente relacionadas com a produção de biomassa (TACHIBANA e OHTA 1983, FANG, YAN et al. 2009).

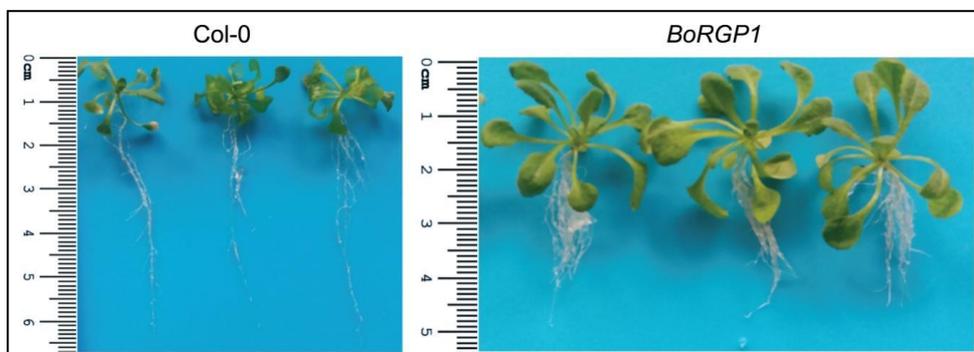


Figura 16. Plantas com aproximadamente 15 dias de idade, cultivada em meio não seletivo em tubo de ensaio.

Em *Brassicac*s o aumento da arquitetura do sistema radicular (RSA - *root system architecture*) pode levar à resistência à privação de fósforo (P). *B. oleracea* e *B. napus* submetidas à privação de P mostraram um aumento de raízes laterais, em número e comprimento (HAMMOND, BROADLEY et al., 2009; SHI, et al., 2012, WANG et al., 2017). O aumento da área da raiz poderia também contribuir para a redução do uso de fertilizantes e levar ao desenvolvimento de cultivares com capacidade de absorver compostos nutricionais de forma mais eficiente. Esses resultados são promissores para a transformação da planta alvo, não apenas visando a resistência à Xcc, mas também a outros estresses bióticos e abióticos além de possibilitar a redução de uso de fertilizantes químicos. Esses resultados podem nortear outros ensaios para comprovação futura, como ensaios de tolerância a seca, estresse salino e e captação de nutrientes pelas raízes de plantas transformadas.

Para validação da função dos genes (*BoCHIB4*, *BoESP*; *BoRPG1*), 5 linhagens de cada transformante, foram inoculadas com Xcc. Foram testadas 15 plantas para cada linhagem transgênica (réplicas técnicas). As proteínas codificadas por cada gene serão discutidas separadamente a seguir, com mais detalhes. Nas plantas WT inoculadas com Xcc, foi observado início dos sintomas já nas primeiras 48 h pós a inoculação (hpi). As plantas foram acompanhadas diariamente, por mais 3 dias após a inoculação (dai). A avaliação de sintomas foi realizada no 5º dai, (Figura 16). Por isso, na Tabela 3 estão relatados os valores das plantas WT 5 dai e não foi aplicado o teste de Tukey para avaliar estatisticamente a reação à doença (utilizando as médias de classificação da doença), pois as plantas transgênicas não apresentaram sintomas, mesmo por mais 15 dias de observação, pois sob temperaturas de 20-15 °C os sintomas podem ser observados 10-14 dpi. Os valores da tabela são relativos a avaliação visual das plantas não transgênicas (Col-0 WT).

A avaliação visual, baseada na intensidade/severidade dos sintomas, foi realizada pela estimativa direta da porcentagem da área foliar com sintomas, utilizando chave descritiva, mensurando os níveis de severidade de doença variando de 0-100%, após pesar as folhas para avaliar a porcentagem de área necrosada (MCKINNEY, 1923; BARDSLEY; NGUGI, 2012) em 15 plantas de cada grupo avaliado (12-13 folhas por planta). Não existe uma escala validada disponível para avaliar a severidade da podridão negra em culturas de crucíferas e planta modelo

como *Arabidopsis*, e assim, na falta de um padrão ouro universal para avaliação dos sintomas, foi realizado a de estimativa direta, que pode ter maior precisão e confiabilidade (BARDSLEY; NGUGI, 2012).

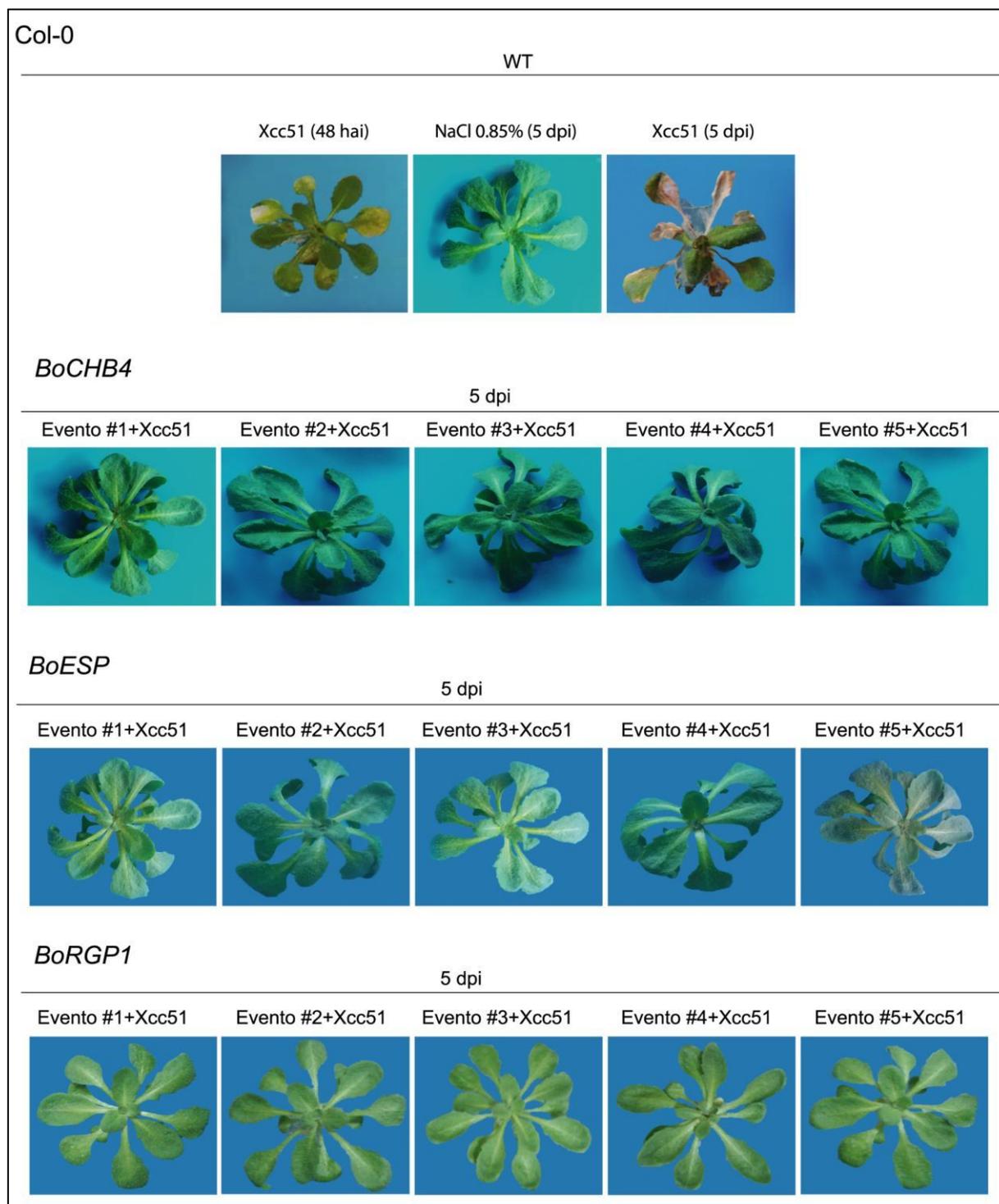


Figura 17. Resultado do bioensaio com inoculação de *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) para avaliação fenotípica das linhagens transgênicas (*BoCHB4*, *BoESP* e *BoRGP1*) e não transformadas (controle – *WT wild type*). As plantas WT avaliadas em 48 h, mostram o início dos sintomas, e 5 dias pós-inoculação (dpi) já estavam totalmente necrosadas. Todas as plantas foram avaliadas no 5 dpi,

mas as plantas transgênicas não apresentaram, nem mesmo 15 dpi quando o experimento foi interrompido. (#1-5) número de réplicas biológicas testadas por aspersão com Xcc para cada transgênica, cada linhagem teve 15 réplicas técnicas.

Considerando as 15 plantas WT 5 dpi, os resultados apresentaram uma média de severidade (SEV) da doença de 70%. De acordo com a média das pontuações mensuradas na avaliação, 4 plantas foram consideradas suscetíveis e 11 altamente suscetíveis (Tabela 3). No presente estudo, avaliando a reação das 15 plantas observadas (12-13 folhas por planta), com a média dos valores obtidos para a classificação da doença as plantas WT, de *A. thaliana* ecotipo Col-0 usada no presente trabalho, puderam ser consideradas altamente suscetíveis a Xcc51.

Tabela 3. Reação de *A. thaliana* (Col-0) a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 5 dias após a infecção

Número de plantas	Classe da doença		Severidade-SEV ³ (%)
	Média ¹	Reação ²	
Planta 1	4,7	AS	77,8
Planta 2	4,0	S	66,7
Planta 3	4,5	AS	81,8
Planta 4	3,7	S	62,8
Planta 5	4,4	AS	73,6
Planta 6	4,4	AS	76,9
Planta 7	3,6	S	64,1
Planta 8	4,5	AS	75,6
Planta 9	4,3	AS	71,8
Planta 10	4,5	AS	74,4
Planta 11	3,8	S	60,3
Planta 12	4,2	AS	69,2
Planta 13	4,2	AS	69,3
Planta 14	4,8	AS	80,6
Planta15	5,0	AS	78,2

¹Classe de reação da doença conforme a escala de notas com escalas de intervalo de 0-6 (Sharma et al., 2017); ²Reação da doença: 3,1-4,0 = suscetível (S); 4,1-5,0 = altamente suscetível (AS); ³Severidade da doença (SEV), calculada pelo índice de McKinney (1923), utilizando os níveis de severidade atribuídas pela escala de intervalo, avaliando em média 12-13 folhas por planta.

Por outro lado, as plantas transgênicas, que continuaram a ser observadas por até 15 dai, não apresentaram modificação fenotípica durante esse período e algumas plantas iniciaram o processo de floração. Esses resultados mostram que as

plantas de *Arabidopsis* superexpressando os genes de repolho mostraram ser resistentes a Xcc nos ensaios *in vivo*.

CONCLUSÃO

A prospecção de proteínas foi importante para observar a variação da abundância de proteínas nas plantas infectadas, contribuindo para a identificação de genes responsivos ao estresse. A proteômica de cloroplasto mostrou ser extremamente importante, pois permitiu identificar inúmeras proteínas que não foram identificadas nas amostras de folha. Com a montagem de um modelo esquemático, foi possível visualizar mais claramente, locais na célula e vias metabólicas alteradas em *B. oleracea* var. *capitata* durante a interação com *Xcc*. A superexpressão de genes de repolho (*BoCHB4*, *BoESP* e *BoRGP1*) em *A. thaliana*, mostraram que tais genes conferiram tolerância contra *X. campestris*, reiterando a participação desses genes na defesa de repolho contra a infecção bacteriana, demonstrando que esses genes são potencialmente candidatos para programas de melhoramento de plantas visando o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o controle da podridão negra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, C. et al. Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2012, p. 494572. 2012.

AHMED, N. U. et al. Identification and expression analysis of chitinase genes related to biotic stress resistance in *Brassica*. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 3649-3657, 2012.

AKIMOTO-TOMIYAMA C., et al. Loss of chloroplast-localized protein phosphatase 2Cs in *Arabidopsis thaliana* leads to enhancement of plant immunity and resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* infection. **Molecular Plant Pathology**. 2017.

ALIFERIS, K. A.; FAUBERT, D.; JABAJI, S. A metabolic profiling strategy for the dissection of plant defense against fungal pathogens. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e111930, 2014.

ANDERSEN, Claus Lindbjerg; JENSEN, Jens Ledet; ØRNTOFT, Torben Falck. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.

ANDRADE, A. E. et al. *In vivo* proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the host plant *Brassica oleracea*. **FEMS microbiology letters**, v. 281, n. 2, p. 167-174, 2008.

ANDRADE, S. R. M. **Transformação de plantas**. Embrapa Cerrados, Planaltina, 2003.

APPELLA, E.; PADLAN, E. A.; Hunt, D. F. Analysis of the structure of naturally processed peptides bound by class I and class II major histocompatibility complex molecules. **EXS** 73, 105-119. 1995

ARGUESO, C. T., et al. Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. **PLoS genetics**. 8, e1002448, 2012.

AROCA, R., et al. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* plants. **Annals of Botany**. 98, 1301-10. 2006.

ARAGÃO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M. Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 14 (1), 2002.

AUDENAERT, K.; DE MEYER, G. B.; HÖFTE M. M. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. **Plant Physiology**. 128, 491-501, 2002.

BADEL, J. L., et al. Resistência genética de plantas a bactéria. In: **Resistência genética de plantas a patógenos (eBook)**. [recurso eletrônico]/org. Leandro José Dallagnol. Pelotas : Ed. UFPel, 2018. Acesso em: 31/05/2019 <http://guaiaca.ufpel.edu.br:8080/bitstream/prefix/4207/1/RESIST%C3%80NCIA%20GEN%C3%89TICA%20DE%20PLANTAS%20A%20PAT%C3%93GENOS_EBOOK.pdf>

BAGGERLY, K. A.; MORRIS, J. S.; COOMBES, K. R. Reproducibility of SELDI-TOF protein patterns in serum: comparing datasets from different experiments. **Bioinformatics**, v. 20, n. 5, p. 777-785, 2004.

BAHLO, M., et al. Recent advances in the detection of repeat expansions with short-read next-generation sequencing. **F1000 Research**, 7, 736, 2018.

BANTSCHEFF, Marcus et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 404, n. 4, p. 939-965, 2012.

BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrobiociências**, v. 7 (2), p. 79-83. 2001.

BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.

BARDSLEY, S. J.; NGUGI, H. K. Reliability and accuracy of visual methods to quantify severity of foliar bacterial spot symptoms on peach and nectarine. **Plant Pathology**, v. 62 (2), 2012.

BAYER, R. G.; STAEL, S.; TEIGE, M. Chloroplast isolation and affinity chromatography for enrichment of low-abundant proteins in complex proteomes. **Proteomic Profiling: Methods and Protocols**, p. 211-223, 2015.

BEGGS, J. D. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. **Nature**, v. 275; 104-108, 1978.

BENDAHMANE, A., et al. Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site–leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. **The Plant Journal** 32, 195-204, 2002.

BENNETT, R.N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New phytologist** 127, 617-33 , 1994.

BERG, T. et al., PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. **Plant Pathology**, v. 54, p. 416-427, 2005.

BOLOT, S. et al. Genome Sequence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Strain Xca5. **Genome Announcements**, v. 1, 2013.

BOLTON, M. D. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 5, p. 487-497, 2009.

- BONES, A. M.; ROSSITER, J. T. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. **Physiologia Plantarum**, v. 97 (1), 1996.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry** 72, 248-54, 1976.
- BROWN, D.; SJÖLANDER, K. Functional classification using phylogenomic inference. **PLoS Computational Biology**. 2, 479 – 483, 2006.
- BROWN, J. K. M. Durable resistance of crops to disease: a Darwinian perspective. **Annual review of phytopathology** 53, 513-39, 2015.
- BRADBURY, J.F. *Xanthomonas* Dowson. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., eds. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994, v. 1, 964p.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAITHWAITE, M. et al. First report of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on *Citrus sinensis* in Bolivia. **Plant Pathology**, v. 51, n. 3, p. 383-383, 2002.
- BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T de C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília, **Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen**, 2015.
- CAMARGO, L. E. A.; WILLIAMS, P.H.; OSBORN, T. C. Mapping of quantitative trait loci controlling resistance of *Brassica oleracea* to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the field and greenhouse. **Phytopathology** 85, 1296-300, 1995.
- CARLSON, M.; BOTSTEIN, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. **Cell**, v. 28, n. 1, p. 145-154, 1982.
- CARVALHO, P. C. et al. PatternLab for proteomics: a tool for differential shotgun proteomics. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p. 316, 2008a
- CARVALHO, Camilo Amaro de et al. Estudo espectrométrico de diferentes estágios fenológicos da *Brassica oleracea* var. *capitata*. **Revista brasileira de farmacognosia [online]**. 2008, vol.18, n.2, pp. 249-257. I, 2008b.
- CARVALHO, C. DE et al. **Anuário brasileiro das hortaliças**. Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz, 2016.64, 2016 [online]
- CASATI, P., et al. Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. **Photosynthesis Research** 61, 99-105, 1999.
- CASSOL, S. P.; LENHARDT, E. R.; GABRIEL, V. J. Caracterização dos estádios fenológicos e a exigência de adubação do repolho. **Revista de Ciências Agroveterinárias e Alimentos**, n. 2, 2017.

- CHANG, C. J. et al. A new semiselective medium for the isolation of *Xanthomonas campestris* sp. *campestris* from crucifer seeds. **Phytopathology**, v. 81 (4), p. 449-453, 1991.
- CHANG, I. F. et al, 2009. Proteomic profiling of tandem affinity purified 14. 3.3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana*. **Proteomics** 9, 2967-85.
- CHAURASIA, N., et al. Overexpression of phytochelatin synthase (pcs) enhances abiotic stress tolerance by altering the proteome of transformed *Anabaena* sp. PCC 7120. **Protoplasma**, v. 254, n. 4, p. 1715-1724, 2017.
- CHEN, E. I.; YATES III, J. R. Cancer proteomics by quantitative shotgun proteomics. **Molecular oncology**, v. 1, n. 2, p. 144-159, 2007.
- CHEN, L. et al. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. **Planta**, v. 234, n. 2, p. 377, 2011.
- CHEN L-Q, H. B-H., et al. Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. **Science** 335, 207, 2012.
- CHIERA, J. M., et al. Isolation of two highly active soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) promoters and their characterization using a new automated image collection and analysis system. **Plant Cell Reports**. 26 (9): 1501-1509, 2007.
- CHOI, J., et al. Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? **Trends in plant science**. 16, 388-94, 2011.
- CLARK, G. B., et al.. Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles. **New Phytologist** 196, 695-712, 2012
- CLOUGH S.J; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 16, p. 735-743, 1998.
- COLLINS, C. A.; BROWN, E. J. Cytosol as battleground: ubiquitin as a weapon for both host and pathogen. **Trends in cell biology** 20, 205-13, 2010.
- CONRATH, U. et al. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. 19: 1062-1071. 2006.
- COUTO, D.; ZIPFEL, C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. **Nature Reviews Immunology** 16, 537, 2016.
- COX, J.; MANN, M. Computational principles of determining and improving mass precision and accuracy for proteome measurements in an Orbitrap. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 8, p. 1477-1485, 2009.
- DA SILVA, A. C. et al. Comparison of the genome of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**. 417: 459-463. 2002.

- DELANEY, T. P., et al. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. **Science**, Madison, v. 266, 124701250. 1994.
- DE SOUSA-ABREU, R., et al. Global signatures of protein and mRNA expression levels. **Molecular BioSystems**. 5, 1512-26, 2009.
- DE VOS, P.; DE LEY, J. Intra-and intergeneric similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal ribonucleic acid cistrons. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 487-509, 1983.
- DESCLOS-THEVENIAU, M., et al. The Arabidopsis lectin receptor kinase LecRK-V. 5 represses stomatal immunity induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **PLoS pathogens** 8, e1002513, 2012.
- DHALIWAL, Major Singh. Handbook of vegetable crops. Kalyani Publishers, 2017.
- DI MAMBRO, R. et al. Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the *Arabidopsis* root. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201705833, 2017.
- DOIDGE, E. M. **A tomato canker**. Ann. Appl. Biol. 7,407–430 (1921).
- DOUKHANINA, E. V., et al. Identification and functional characterization of the BAG protein family in Arabidopsis thaliana. **Journal of Biological Chemistry** 281, 18793-801, 2006.
- DRÖGE-LASER, Wolfgang et al. Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 4, p. 726-738, 1997.
- DUAN, Hongying et al. Effects of kanamycin on growth and development of *Arabidopsis thaliana* seedling, cotyledon and leaf. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 4, p. 1611-8, 2009.
- ELIAS, J. E.; GYGI, S. P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. **Nature methods**, v. 4, n. 3, p. 207, 2007.
- ENG, J. K. et al. A face in the crowd: recognizing peptides through database search. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 11, p. R111. 009522, 2011.
- ENG, J. K.; JAHAN, T. A.; HOOPMANN, M. R. Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool. **Proteomics**, v. 13, n. 1, p. 22-24, 2013.
- ETSCHMANN, B., et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in canine mammary tumors using the GeNorm algorithm. **Veterinary pathology** 43, 934-42, 2006.
- FANG, S.; YAN, X.; LIAO, H. 3D reconstruction and dynamic modeling of root architecture in situ and its application to crop phosphorus research. **The Plant Journal**. 60, 1096-108, 2009.

FARROKHI, N.; HRMOVA, M.; BURTON, R. A.; FINCHER, G. B. Heterologous and Cell-Free Protein Expression Systems. **Methods in Molecular Biology**TM, 175–198, 2009.

FIALHO, E. et al. Nutrição no pós-genoma: fundamentos e aplicações de ferramentas ômicas. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 6, p. 757-766, 2008.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças** – Viçosa, UFV, 2000

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo Manual de Olericultura**. Viçosa: UFV 2012. 418p.

FLEXAS, J., et al. Mesophyll conductance to CO₂ in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist** .175, 501-11, 2007.

FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Reviews Phtopathology**. 9: 275-296. 1971.

FLORENS, L. et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. **Nature**, v. 419, n. 6906, p. 520, 2002.

FOO, H. L. et al. Purification and characterisation of epithiospecifier protein from *Brassica napus*: enzymic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis. **FEBS Letters**, v. 468 (2-3), 2000.

FREEMAN, B. C.; BEATTIE, G. A. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. **The Plant Health Instructor**, 2008.

FRISO, G.; VAN WIJK, K. J. Posttranslational protein modifications in plant metabolism. **Plant physiology**, v. 169, n. 3, p. 1469-1487, 2015.

FULLER, B., et al. Proteomic analysis of the 14-3-3 family in Arabidopsis. **Proteomics**. 6, 3050-9, 2006.

GACHOMO, E. W.; SHONUKAN, O. O.; KOTCHONI, S. O. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. **African Journal of Biotechnology**. 2: 26-32. 2003.

GALLAGHER, M. D.; CHEN-PLOTKIN, A. S. The Post-GWAS Era: From Association to Function. **American Journal of Human Genetics**. 102(5): 717–730, 2018.

GAO, J. I., et al. Changes in the protein expression of yeast as a function of carbon source. **Journal of proteome research**, v. 2, n. 6, p. 643-649, 2003.

GARDNER, M. W., KENDRICK, J. B.: Bacterial spot of tomato. **Jornal of Agriculture Resarch**. 21, 123–156 (1921).

GELVIN, S. B. Agricultural biotechnology: Gene exchange by design. **Nature**. 433 (7026): 583-584, 2005.

GERBER, S. A. et al. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 12, p. 6940-6945, 2003.

GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. Impactos das mudanças climáticas sobre doenças de importantes culturas no Brasil. **Embrapa Meio Ambiente-Livro científico (ALICE)**, 2011.

GITAITIS, R. et al. Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. **Plant Disease**, v. 76, n. 7, p. 651-656, 1992.

GOELLNER, K.; CONRATH, U. Priming: it's all the world to induced disease eresistence. **Eropean Journal of Plant Pathology**. 212: 233-242. 2008.

GOMES, R. C. et al. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. **Journal of applied microbiology**, v. 90, n. 4, p. 653-661, 2001.

GOMES, A. M. V., et al. Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. **Microorganisms**. 6(2): 38. 2018.

GONZÁLEZ-RECIO, O. Epigenetics: A New Challenge in the Post-Genomic Era of Livestock. **Frontiers in Genetic**. 2: 106, 2011.

GRANT, M. R.; JONES, J. D. G. Hormone (dis) harmony moulds plant health and disease. **Science**. 324, 750-2, 2009.

GREWE, F., et al. Comparative analysis of 11 Brassicales mitochondrial genomes and the mitochondrial transcriptome of *Brassica oleracea*. **Mitochondrion**, v. 19, p. 135-143, 2014.

GUO, H.; DICKSON, M. H.; HUNTER, J. E. *Brassica napus* sources of resistance to black rot in crucifers and inheritance of resistance. **HortScience**. 26, 1545-7, 1991.

GUAN, Y.; CHYE, ML. A *Brassica juncea* chitinase with two-chitinase binding domins show anti-microbial properties against phytopahtogen and gram-negative bacteria. **Journal Plant Signaling & Behavior**, v. 3 (12), 2008.

GUIGO, R.; DE HOON, M. Recent advances in functional genome analysis. **F1000 Research** vol. 7, 2018.

GUINDALINI, C.; TUFIK, S. Use of microarrays in the search of gene expression patterns - application to the study of complex phenotypes. **Revista Brasileira de Psicologia**. V. 29(4):370-4, 2007.

GULCICEK, E. E. *et al.* Proteomics and the analysis of proteomic data: an overview of current protein-profiling technologies. **Current Protocols in Bioinformatics**, p. 13.1. 1-13.1. 31, 2005.

GUPTA, O. P. et al. Current status on role of miRNAs during plant–fungus interaction. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 85, p. 1-7, 2014.

GURURANI, M. A. et al. Plant disease resistance genes: current status and future directions. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 78, p. 51-65, 2012.

GUTIERREZ, L. et al. The lack of a systematic validation of reference genes a serious pitfall undervalued in reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, vol. 6, p. 609-618, 2008.

HAAS, W., et al. Optimization and use of peptide mass measurement accuracy in shotgun proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 7, p. 1326-1337, 2006.

HALKIER, B. A.; GERSHENZON, J.. Biology and biochemistry of glucosinolates. **Annual Review Plant Biology**. 57, 303-33, 2006.

HAMANN, T. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. **Frontiers in plant science**, v. 23, (3:77), 2012.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. **Induced resistance to disease in plants-developments in plant pathology**. Dordrecht: Kluwer: 1995.

HAMMOND, J. P., et al. Shoot yield drives phosphorus use efficiency in *Brassica oleracea* and correlates with root architecture traits. **Journal of Experimental Botany**. 60, 1953-68, 2009.

HANSEN, G.; CHILTON, M. D. "'Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in planta." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, 25 14978-83, 1996.

HAUSER, F., et al. A seed resource for screening functionally redundant genes and isolation of new mutants impaired in CO₂ and ABA responses. **Journal of experimental botany**, v. 70, n. 2, p. 641-651, 2018.

HERNANDEZ-GARCIA, C. M., et al. A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean. **Plant Cell Reports**. 28 (5): 837-849, 2009.

HINNEN, Albert; HICKS, James B.; FINK, Gerald R. Transformation of yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n. 4, p. 1929-1933, 1978.

HOPKINS, R. J.; VAN DAM, N. M.; LOON, J. J. A. Role of glucosinolates in insect-plant relationship and multitrophic interaction. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 57-83, 2009.

HOUSTON et al. The plant cell wall: A complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. **Frontiers in plant science**, v. 7, 2016.

HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual Review of Plant Biology**.;59(1):41-66. 2008.

HRMOVA, M.; BURTON, R.A.; BIELY, P.; LAHNSTEIN, J.; FINCHER, G.B. Hydrolysis of (1,4)- β -D-mannans in barley (*Hordeum vulgare* L.) is mediated by the concerted action of (1,4)- β -D-mannan endohydrolase and β -D-mannosidase. **Biochemical Journal**. 399, 77 – 90, 2006

HWANG, I.; SHEEN, J.; MÜLLER, B. Cytokinin signaling networks. **Annual review of plant biology**. 63, 353-80, 2012.

IMKAMPE, J. et al. The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase BIR3 has dual functions in the negative regulation of BAK1 receptor complex formation and in stabilization of BAK1. **The Plant Cell**, 2017a.

IMKAMPE, J. et al. The *Arabidopsis* Leucine-rich Repeat Receptor Kinase BIR3 Negatively Regulates BAK1 Receptor Complex Formation and Stabilizes BAK1. **The Plant Cell Online**, p. tpc. 00376.2017, 2017b.

JALIL, S. U.; MISHRA, M.; ANSARI, M. I. Current view on chitinase for plant defense. **Trends in Biosciences**. 8, 6733-43, 2015.

JERKOVICH, Anton D.; MELLORS, J. Scott; JORGENSON, James W. The use of micrometer-sized particles in ultrahigh pressure liquid chromatography. **LC GC North America**, v. 21, n. 7, p. 600-611, 2003.

JIANG, C-J., et al. Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice–Magnaporthe grisea interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 23, 791-8, 2010.

JONES, J. D.G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444 (16), p. 323-329, 2006.

JORRÍN-NOVO, J. V.; MALDONADO, A. M.; CASTILLEJO, M. A. Plant proteome analysis: a 2006 update. **Proteomics**, v. 7, n. 16, p. 2947-2962, 2007.

JULES, J. Plant Breeding Reviews. 31. **Wiley**. p. 56. ISBN 978-0-470-38762-7, 2009

JUN, S. R. et al. Whole-proteome phylogeny of prokaryotes by feature frequency profiles: An alignment-free method with optimal feature resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 1, p. 133-138, 2010.

LEITE JUNIOR, R.P. L. Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná. **IAPAR**, 1990.

KAMAL, A. H. M., et al. Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. **Australian Journal of Crop Science** 4, 196, 2010.

KANWAR, P.; JHA, G. Alterations in plant sugar metabolism: signatory of pathogen attack. **Planta**, 249: 305, 2018.

KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Jasmonate signaling: toward an integrated view. **Plant Physiology** 146, 1459, 2008.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299-2301, 1988.

KEEGSTRA, K.; CLINE, K. Protein import and routing systems of chloroplasts. **Plant Cell**, v. 11, 557-570, 1999.

KEEN, N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Reviews Genetics**, v. 24, p. 447-463, 1990.

KELLY, P. J.; BONES, A.; ROSSITER, J. T. Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. **Planta**, v. 206 (3), p. 370-7, 1998.

KEND, H. Ethylene biosynthesis. **Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 283-307, 1993.

KIM, S., et al. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its over expression affects multiple stress tolerance. **The Plant Journal**, v.40, p.75-87, 2004.

KIM, S. T.; KANG, K. Y. Proteomics in Plant Defense Response. **Plant Proteomics: Technologies, Strategies, and Applications**, p. 585-604, 2008.

KIM T-H., et al. Chemical genetics reveals negative regulation of abscisic acid signaling by a plant immune response pathway. **Current Biology**. 21, 990-7, 2011.

KIM, H. S. et al. Overexpression of the *Brassica rapa* transcription factor WRKY12 results in reduced soft rot symptoms caused by *Pectobacterium carotovorum* in *A. rabidopsis* and chinese cabbage. **Plant Biology**, v. 16, n. 5, p. 973-981, 2014.

KIM, M., et al. Quantitative shotgun proteomics analysis of rice anther proteins after exposure to high temperature. **International journal of genomics**, v. 2015, 2015.

KISSEN, R.; BONES, A. M. Nitrile-specifier proteins involved in glucosinolate hydrolysis in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry** 284, 12057–12070, 2009a.

KISSEN, R.; ROSSITER, J. T.; BONES, A. M. The 'mustard oil bomb': not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. **Phytochemistry Reviews**, v. 8 (1), p. 69-86, 2009b.

KLIEBENSTEIN, D. J.; KRYOYMANN, J.; MITCHELL-OLDS, T. The glucosinolate-myrosinase system in an ecological and evolutionary context. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8 (3), p. 264-271, 2005.

KLEY, J. et al. Isolating intact chloroplasts from small *Arabidopsis* samples for proteomic studies. **Analytical biochemistry**, v. 398, n. 2, p. 198-202, 2010.

KLISIEWICZ, J.; POUND, G. S. Studies on control of black rot of crucifers by treating seeds with antibiotics. **Phytopathology**, v. 51, n. 8, p. 495-&, 1961.

KNOESTER, M. et al. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. **Plant Biology**, v. 95, p. 1933-1937, 1998.

KOLLER, A., et al. Proteomic survey of metabolic pathways in rice. 3rd. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v. 99, 11969-11974, 2002.

KOMATSU, S.; HOSSAIN, Z. Preface—Plant Proteomic Research. In.: **Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, 2017.

KONDOU, Youichi; HIGUCHI, Mieko; MATSUI, Minami. High-throughput characterization of plant gene functions by using gain-of-function technology. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 373-393, 2010.

KONG, X. Y KISSEN, R.; BONES, A. M.Characterization of recombinant nitrile-specifier proteins (NSPs) of *Arabidopsis thaliana*: Dependency on Fe(II) ions and the effect of glucosinolate substrate and reaction conditions. **Phytochemistry**, V. 84, p. 7–17, 2012.

KONISHI, T. et al. A plant mutase that interconverts UDP-arabinofuranose and UDP-arabinopyranose. **Glycobiology**, v. 17 (3), p. 345-354, 2006.

KONISHI, T. et al. An arginyl residue in rice UDP-arabinopyranose mutase is required for catalytic activity and autoglycosylation. **Carbohydrate Research**, v. 345 (6), p. 787-791, 2010.

KOORNNEEF, A.; PIETERSE, C. M. J. Cross talk in defense signaling. **Plant Physiology**, v. 146, p. 839-844, 2008.

KOSITCHAROENKUL, N. et al. Detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* from field samples using single-tube nested PCR. **Plant pathology**, v. 60, n. 3, p. 436-442, 2011.

KRAUTHAUSEN, H.; LAUN, N.; WOHANKA, W. Methods to reduce the spread of the black rot pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, in brassica transplants. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 118, n. 1, p. 7-16, 2011.

KRETSCHMER, M.; CROLL, D.; KRONSTAD, J. W. Chloroplast-associated metabolic functions influence the susceptibility of maize to *Ustilago maydis*. **Molecular Plant Pathology** 18, 1210-21, 2017.

KUTTIYATVEETIL, J.R.; Sanders, D.A. Analysis of plant UDP-arabinopyranose mutase (UAM): Role of divalent metals and structure prediction. **BBA-Proteins Proteomic**, v. 1865: 510–519, 2017.

KWON, S. W. et al. Shotgun quantitative proteomic analysis of proteins responding to drought stress in *Brassica rapa* L. (Inbred Line “Chiifu”). **International journal of genomics**, v. 2016, 2016.

KWON, S. I.; HWANG, D. J. Expression analysis of the metacaspase gene family in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Biology**. 56, 391-8, 2013.

LAIZET, Y., et al. Subfamily organization and phylogenetic origin of genes encoding plastid lipid-associated proteins of the fibrillin type. **Journal of Genome Science and Technology**. 3, 19-28, 2004.

LAMBRIX, V., et al. The Arabidopsis epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. **The Plant cell**. 13, 2793-807, 2001.

LANGEVELDM, S. M. et al. Glucosylation activity and complex formation of two classes of reversibly glycosylated polypeptides. **Plant Pathology**, v. 129 (1), p. 278-289, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEITNER-DAGAN, Y., et al. Expression and functional analyses of the plastid lipid-associated protein CHRC suggest its role in chromoplastogenesis and stress. **Plant Physiology**. 142, 233-44, 2006.

LEPPIK, E. E. Gene centers of plants as sources of disease resistance. **Revista de Phytopatologia**, v. 21. 1970.

LEÓN-REINA, L., et al. Structural and surface study of calcium glyceroxide, an active phase for biodiesel production under heterogeneous catalysis. **Journal of catalysis**, v. 300, p. 30-36, 2013.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. **Nucleic Acids Research**. 2016

LEYNS, F. et al. The host range of the genus *Xanthomonas*. **The Botanical Review**, v. 50, n. 3, p. 308-356, 1984.

LI, L. et al. The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. **The Plant Cell**, v. 16, n. 1, p. 126-143, 2004.

LI, Y., et al. Aspartyl protease mediated cleavage of AtBAG6 is necessary for autophagy and fungal resistance in plants. **The Plant cell**, TPC2015-00626, 2016.

LIU, Z., et al. Plasma membrane CRPK1-mediated phosphorylation of 14-3-3 proteins induces their nuclear import to fine-tune CBF signaling during cold response. **Molecular cell**. 66, 117-28, 2017.

LIWANAG A. J et al. Pectin biosynthesis: GALS1 in *Arabidopsis thaliana* is a β -1,4-galactan β -1,4-galactosyltransferase. **Plant Cell**. V, 24(12), p. 5024-36, 2012.

LODISH, Harvey et al. Post-Translational Modifications and Quality Control in the Rough ER. In: **Molecular Cell Biology**. 4th edition. WH Freeman, 2000.

LOW, L. Y. et al. Transgenic Plants: Gene Constructs, Vector and Transformation Method. In: **New Visions in Plant Science**. IntechOpen, 2018.

LUNDBY, A.; OLSEN, J. V. GeLCMS for in-depth protein characterization and advanced analysis of proteomes. **Gel-Free Proteomics: Methods and Protocols**, p. 143-155, 2011.

LUU, D. T.; MAUREL, C. Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. **Plant, Cell & Environment**. 28, 85-96, 2005.

MacCOSS, M. J.; WU, C. C.; YATES, J. R. Probability-based validation of protein identifications using a modified SEQUEST algorithm. **Analytical chemistry**, v. 74, n. 21, p. 5593-5599, 2002.

MacLEOD, A.J ROSSITER, J.T.The occurrence and activity of epithiospecifier protein in some cruciferae seeds. **Phytochemistry**, v 24, p. 1895–1898, 1985.

MARINO, D.; PEETERS, N.; RIVAS, S. Ubiquitination during plant immune signaling. **Plant Physiology**. 160, 15-27, 2012.

MARINGONI, A. C. Doenças das Crucíferas. In: KIMATI, H. et al.**Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres,cap. 31, p. 285-291, 2005.

MARONE, D.; et al.Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: active guardians in host defense response. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14 (4), p. 7302-7326, 2013.

MARTIN W., et al. Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99 (19), p.12246-51, 2002.

MERKOUROPOULOS, G., et al. An Arabidopsis protein phosphorylated in response to microbial elicitation, AtPHOS32, is a substrate of MAP kinases 3 and 6. **Journal of Biological Chemistry**. 283, 10493-9, 2008.

McKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26 (5), p. 195-218, 1923.

MEYER, D., et al. Optimization of pathogenicity assays to study the Arabidopsis thaliana–Xanthomonas campestris pv. campestris pathosystem. **Molecular Plant Pathology**. 6, 327-33, 2005.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: 2005.

MINE, A., et al. Pathogen exploitation of an abscisic acid-and jasmonate-inducible MAPK phosphatase and its interception by Arabidopsis immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**.114, 7456-61, 2017.

MITHÖFER A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: Chemical aspects. **Annual Review of Plant Biology**. 63(1):431-450, 2012.

MOCELLIN, S.; ROSSI, C. R. Principles of gene microarray data analysis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 593:19-30, 2007.

MONDAL, K. K. et al. Chitinase-mediated inhibitory activity of *Brassica* transgenic growth of *Alternaria brassicae*. **Current Microbiology**, v. 47, p. 171-173, 2002.

MOT, R. D.; VANDERLEYDEN, J. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v 35, p 960-967, 1989.

MONTEOLIVA, L.; ALBAR, J. P. Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Briefings in Functional Genomics*, v. 3, n. 3, p. 220-239, 2004.

NAGAHARU U. Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization". *Japan. Journal Botany*, v. 7, p.389–452, 1935.

NÄGELE, E.; VOLLMER, M.; HÖRTH, P. Improved 2D nano-LC/MS for proteomics applications: a comparative analysis using yeast proteome. **Journal of biomolecular techniques: JBT**, v. 15, n. 2, p. 134, 2004.

NOMURA, H., et al. Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in Arabidopsis. **Nature Communications**. 3, 926, 2012.

ODELL, J. T.; NAGY, F. Chua NH. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**. 313(6005):810-812. 1985.

O'DONNELL, P. J. et al. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. **Science**, v. 274, p. 1914-1917, 1996.

OHTSU, K., et al. Cell Type-Specific Gene Expression Profiling in Plants by Using a Combination of Laser Microdissection and High-Throughput Technologies. **Plant Cell Physiology**, v. 48, p. 3–7, 2007.

OLSEN, J. V. et al. A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. **Molecular & cellular proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2759-2769, 2009.

OMBUNA, G. J.; NYANGERI, B. J.; MAOBE, S. N. Control of black rot disease in cabbage by integration of mulching, pruning and hot water treatment of seeds. **Plant Pathology & Quarantine** 9(1): 23–29, 2019.

O'NEILL, M. A.; YORK, W. S. The composition and structure of plant primary cell walls. **The plant cell wall**, p. 1-54, 2003.

ONG, S. E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature chemical biology**, v. 1, n. 5, p. 252, 2005.

PADMANABHAN, M. S; DINESH-KUMAR, S. P. All hands on deck—the role of chloroplasts, endoplasmic reticulum, and the nucleus in driving plant innate immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 23, 1368-80, 2010.

PARK, O. K. Proteomic Studies in Plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Vol. 37: 1, pp. 133-138, 2004.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v, 2, p. 1-51, 1994.

PATEL, V. J. et al. A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 7, p. 3752-3759, 2009.

PELLIZA, L., et al. Codon usage clusters correlation: towards protein solubility prediction in heterologous expression systems in *E. coli*. **Nature**. Scientific Report 8:10618. 2018.

PELTIER, J-B., et al. Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. **The Plant cell**. 12, 319-41, 2000.

PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. I. J. (Ed). **Proteomics: from protein sequence to function**. Garland Science, 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**. 30, e36-e, 2002.

PRAKASH, S. et al. Taxonomy, cytogenetics and origin of crop Brassicas, a review. **Opera Botanica**, n. 55, 1980.

PRELICH, G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. **Genetics**, v. 190, n. 3, p. 841-854, 2012.

QIAN, W. et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* sp. *campestris*. **Genome Research**, v. 15, 2005.

QIU, N., et al. Physiological and transcriptomic responses of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*) to salt stress. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 9, p. 1953, 2017.

RADULOVIC, D., et al. Informatics platform for global proteomic profiling and biomarker discovery using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Molecular & cellular proteomics**, v. 3, n. 10, p. 984-997, 2004.

RARDIN, M. J. et al. MS1 peptide ion intensity chromatograms in MS2 (SWATH) data independent acquisitions. Improving post acquisition analysis of proteomic experiments. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 14, n. 9, p. 2405-2419, 2015.

RAUTENGARTEN, C. et al. The interconversion of UDP-arabinopyranose and UDP-arabinofuranose is indispensable for plant development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 23 (4), p. 1373-1390, 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Guanabara, 2007.

REIS, M.R. et al. Selectivity of herbicides to cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). **Planta daninha**, v. 35, 2017.

REYES-PRIETO, A.; WEBER, A. P. M.; BHATTACHARYA, D. The origin and establishment of the plastid in algae and plants. **Annual Review of Genetics**, voll 41, p. 147-168, 2007.

REUBER, T. L.; AUSUBEL, F. M. Isolation of *Arabidopsis* genes that differentiate between resistance responses mediated by the RPS2 and RPM1 disease resistance genes. **The Plant cell** 8, 241-9, 1996.

RHODES, M. J. C., et al. Metabolic changes in excised fruit tissue-I. Factors affecting the development of a malate decarboxylation system during the ageing of disks of pre-climacteric apples. **Phytochemistry**. 7, 1439-51, 1968.

RIBEIRO, D. G., et al. *Brassica oleracea* resistance-related proteins identified at an early stage of black rot disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 2018.

REYMOND, P.; FARMER, E. E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 1, p. 404-411, 1998.

ROJAS, C. M. et al. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in plant science**, v. 5, 2014.

ROLLAND, N. et al. The biosynthetic capacities of the plastids and integration between cytoplasmic and chloroplast processes. **Annual review of genetics**, v. 46, p. 233-264, 2012.

ROMANO, E.; VIANNA, G. R. In: **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 2015.

ROSA, E. A. S. Glucosinolates from flower buds of Portuguese Brassica crops. **Phytochemistry**, v. 44, n. 8, p. 1415-1419, 1997.

ROSE, A. B.; BROACH, J. R. Propagation and expression of cloned genes in yeast: 2- μ m circle-based vectors. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1990. p. 234-279.

ROSSIGNOL, M. et al. Plant proteome analysis: a 2004–2006 update. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5529-5548, 2006.

RUSSELL, H. L. **A bacterial rot of cabbage and allied plants**. University of Wisconsin, Agricultural Experiment Station, 1898.

RYAN, R. P. et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344, 2011.

SANLIER, N.; GULER SABAN, M. The Benefits of Brassica Vegetables on Human Health. **Journal Human Health Research**, v. 1, p. 104, 2018.

SANTOS, C. Identificação de proteínas expressas por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* durante a interação com plantas de *Brassica oleracea* usando 2D-nanoUPLC/MS^E. (Dissertação). Universidade Católica de Brasília, 2015.

SANTOS, E. S. et al. Crescimento e produção de repolho sob diferentes adubações na presença e ausência de cobertura morta em agricultura familiar. **Irriga**, v. 21, p. 74-89, 2016.

SANTOS, C., et al. Differential accumulation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* proteins during the interaction with the host plant: Contributions of an in vivo system. **Proteomics**, 2017.

SCHAAD, N. W.; ALVAREZ, A. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: cause of black rot of crucifers. **Xanthomonas**, p. 51-55, 1993.

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. v Hemicelluloses. **Annu Rev Plant Biol**, v. 61, p. 263-89, 2010

SCHMIDT, R.; BANCROFT, I. **Genetics and Genomics of the Brassicaceae**. Germany: Springer, 2011.

SCHMITTEGEN, T. D; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by realtime, quantitative RT-PCR. **J Biochem Biophys Meth**, vol. 46, p. 69-81, 2000.

SCIGELOVA, M.; MAKAROV, A. Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. S2, p. 16-21, 2006.

SELTH, L. A. et al. Identification and characterization of a host reversibly glycosylated peptide that interacts with the Tomato leaf curl virus V1 protein. **Plant Mol Biol**, v. 61(1-2), p. 297-310, 2006.

SHARMA, G. **Novel approaches for evaluating brassica germplasm for insect resistance** (Tese). University of Birmingham, 2016.

SHARMA, B. B., et al. Genetics and molecular mapping of black rot resistance locus *xca1bc* on chromosome b-7 in Ethiopian mustard (*Brassica carinata* A. Braun). **PLoS One**. 11, e0152290, 2016.

SHARMA B. B et al. Introgression of black rot resistance from *Brassica carinata* to cauliflower (*Brassica oleracea botrytis* Group). **Frontiers in Plant Science**. V. 8, 2017.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2007.

SHULAEV, V.; et al. Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. **Nature**, v. 385, p. 718-721, 1997.

SHI, H-T., et al. *In vivo* role of nitric oxide in plant response to abiotic and biotic stress. **Plant signaling & behavior**, v.7, 437-9, 2012a.

SHI, L., et al. High-throughput root phenotyping screens identify genetic loci associated with root architectural traits in *Brassica napus* under contrasting phosphate availabilities. **Annals of botany**. 112, 381-9, 2012b.

SHOU, H., et al. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 13, p. 201-208, 2004a.

SHOU, H., et al. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. **Molecular Breeding**, v. 13, n. 2, p. 201-208, 2004b.

SILVA, K. S. et al. Produtividade e desenvolvimento de cultivares de repolho em função de doses de boro. **Horticultura Brasileira**, p. 520-525, 2012.

SIVAMANI, E.; QU, R. Expression enhancement of a rice polyubiquitin gene promoter. **Plant Molecular Biology**, v. 60(2):225-239, 2006.

SIZOVA, D. J. et al. Proteomics analysis of brain tissue from an Alzheimer's disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis. **Neurobiology of Aging**, v. 28, p. 357-370, 2007.

SMITH, E. F. The black rot of the cabbage. **Department Agricultural Farmer's Bull.** 68. 1898.

SONG, K. M.; OSBORN, T. C.; WILLIAMS, P. H. Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, n. 4, p. 593-600, 1988.

SPALLEK, T.; ROBATZEK, S.; GÖHRE, V. How microbes utilize host ubiquitination. **Cellular microbiology**, v. 11, 1425-34, 2009.

SPLETZER, M. E.; ENYEDI, A. J. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 89, p. 722-727, 1999.

STASKAWICZ, B., J. et al. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, 1995.

STICHER, L.; MAUCH, M., B; METRAUX, J. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, 1997.

STINTZI, A. et al. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v. 75, n. 8, p. 687-706, 1993.

STRACHAN, Tom; READ, Andrew. **Genética molecular humana**. Artmed Editora, 2016.

SUBRAMANIAM, S. **Identification and analysis of Gene Regulatory Networks involved in the drought stress response in *Arabidopsis thaliana*** (Tese). University of Essex, 2016.

SUTTON, J. C.; WILLIAMS, P. H. Relation of xylem plugging to black rot lesion development in cabbage. **Canadian Journal of B**, v. 48, 391-401, 1970.

SUZUKI, H. et al. Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, 2003.

SWARTZBERG, D., et al. *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the IPT gene. **European Journal of Plant Pathology** 120, 289-97, 2008.

SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman e Hall, 1993. p. 60-64.

SZALONEK, M., et al. Potato annexin STANN1 promotes drought tolerance and mitigates light stress in transgenic *Solanum tuberosum* L. plants. **PloS one**, v 10, e0132683, 2015.

SZYMANSKI, J., et al. Label-free deep shotgun proteomics reveals protein dynamics during tomato fruit tissues development. **The Plant Journal**, v. 90, n. 2, p. 396-417, 2017.

TACHIBANA, Y.; OHTA, Y. Root surface area, as a parameter in relation to water and nutrient uptake by cucumber plant. **Soil science and plant nutrition**, v. 29, 387-92, 1983.

TAKAYAMA, S., et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. **Cell**, v. 80, 279-84, 1995.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TAKAHASHI, Katsuhiko et al. Role of prolyl isomerase pin1 in pathogenesis of diseases and remedy for the diseases from natural products. **Current drug targets**, v. 15, n. 10, p. 973-981, 2014.

TANAKA, K. et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151-153, 1988.

TANAKA, Y., et al. The complete mitochondrial genome sequence of *Brassica oleracea* and analysis of coexisting mitotypes. **Current genetics**, v. 60, n. 4, p. 277-284, 2014.

TÁVORA, F. T. P. K et al. Pan Proteome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Isolates Contrasting in Virulence. **Proteomics**, p. 1900082, 2019.

THEILLET, F., et al. Cell signaling, post-translational protein modifications and NMR spectroscopy. **Journal of biomolecular NMR**, v. 54, n. 3, p. 217-236, 2012.

THOMMA, B. P. H. J; et al. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 63-68, 2001.

TIAN, S., et al. Plant aquaporin AtPIP1; 4 links apoplastic H₂O₂ induction to disease immunity pathways. **Plant Physiology**, pp-01237, 2016.

TING, J. T. L., et al. Constituents of the tapetosomes and elaioplasts in *Brassica campestris* tapetum and their degradation and retention during microsporogenesis. **The Plant Journal**, v. 16, 541-51, 1998.

TIMMIS, J. N. et al. Endosymbiotic gene transfer: organelle genome forge eukaryotic chromosomes. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 123-135, 2004.

TON, J. et al. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p. 27-34, 2001.

TRIVILIN, A. P.; HARTKE, S.; MORAES, M. G. Components of different signalling pathways regulated by a new orthologue of AtPROPEP1 in tomato following infection by pathogens. **Plant pathology**, v. 63, n. 5, p. 1110-1118, 2014.

TUCKER, M. R.; KOLTUNOW, A. M. Traffic monitors at the cell periphery: the role of cell walls during early female reproductive cell differentiation in plants. **Curr Opin Plant Biol**, v. 17, p. 137-45, 2014.

TULI, L.; RESSOM, H. W. LC-MS based detection of differential protein expression. **Journal of proteomics & bioinformatics**, v. 2, p. 416, 2009.

UBEREGUI, E., et al. An *Arabidopsis* soluble chloroplast proteomic analysis reveals the participation of the executor pathway in response to increased light conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, 2067-77, 2015.

UNTERGASSER, A., et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic acids research**, v.35, W71-W4, 2007.

VALLEDOR, L.; WECKWERTH, W. An improved detergent-compatible gel-fractionation LC-LTQ-Orbitrap-MS workflow for plant and microbial proteomics. In. **Plant proteomics methods and protocols**. Springer, 347-58, 2014.

VANDESOMPELE, Jo et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. research0034. 1, 2002.

VAN DEN MOOTER, M.; SWINGS, J. Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the

genus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 348-369, 1990.

VAÜTERIN, L. et al. Reclassification of xanthomonas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 472-489, 1995.

VEENSTRA, T. D. Global and targeted quantitative proteomics for biomarker discovery. **Journal of Chromatography B**, v. 847, n. 1, p. 3-11, 2007.

VERKMAN, A. S. Aquaporins. **Current Biology**, v. 23, R52-R5, 2013.

VICENTE, J. G.; HOLUB, Eric B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular plant pathology**, v. 14, n. 1, p. 2-18, 2013.

VILLETH, G. R. C. et al. Comparative proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the susceptible and the resistant cultivars of *Brassica oleracea*. **FEMS microbiology letters**, v. 298, n. 2, p. 260-266, 2009.

VILLETH, G. R. C. et al. Identification of proteins in susceptible and resistant *Brassica oleracea* responsive to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* infection. **Journal of proteomics**, v. 143, p. 278-285, 2016.

VILLETH, G. R.C. et al. *Cowpea–Meloidogyne incognita* interaction: Root proteomic analysis during early stages of nematode infection. **Proteomics**, v. 15, n. 10, p. 1746-1759, 2015.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, 227, 2012.

VOEGELE, R. T.; MENDGEN, K. W. Nutrient uptake in rust fungi: how sweet is parasitic life? **Euphytica**, v. 179:41–55, 2011.

VORHÖLTER, F.-J. et al. Comparison of two *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* genomes revealed differences in their gene composition. **Journal of biotechnology**, v. 106, n. 2, p. 193-202, 2003.

VYACHESLAVOVA, A. O. et al. Expression of heterologous genes in plant systems: new possibilities. **Russian journal of genetics**, v. 48, n. 11, p. 1067-1079, 2012.

WALTER, M. H., et al. Cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a molecular marker specific for lignin synthesis: cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, 5546-50, 1988.

WAN, J.; DANNING, M.; BENT, A. F. Probing pathogen-plant interaction and downstream defense signaling using DNA microarrays. **Functional Integrative Genomics**, v. 2, p. 259-273, 2002.

WANG, H, HANASH S. Multi-dimensional liquid phase based separations in proteomics. **Journal of Chromatography B** 787, 11-8, 2003.

WANG, X., et al. Antibiotic use and abuse: a threat to mitochondria and chloroplasts with impact on research, health, and environment. **Bioessays**. 2015;37(10):1045-53.

WARWICK, S. I.; FRANCIS, A.; AL-SHEHBAZ, I. A. Brassicaceae: species checklist and database on CD-Rom. **Plant Systematics and Evolution**, v. 259, n. 2-4, p. 249-258, 2006.

WARWICK, S. I.; FRANCIS, A.; GUGEL, R. K. Guide to wild germplasm of *Brassica* and allied crops (tribe Brassiceae, Brassicaceae). **Taxonomic checklist and life history, ecological, and geographical data, 3rd edn. Ottawa, Canada: Agriculture and Agri-Food Canada, Eastern Cereal and Oil seed Research Centre, 2009.**

WARWICK, S. I. Brassicaceae in agriculture. In: **Genetics and Genomics of the Brassicaceae**. Springer New York, 2011. p. 33-65.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES III, J. R. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 242, 2001.

WASTERNAK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany**, 2007.

WASHBURN, M. P.; WOLTERS, D.; YATES, J. R. 3rd. Large scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nature Biotechnology**. 19, 242-247, 2001.

WEISSBACH, L., et al. Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs. *Journal of Biological Chemistry* 269, 20517-21, 1994.

WERNER, Thomas. Next generation sequencing in functional genomics. **Briefings in bioinformatics**, v. 11, n. 5, p. 499-511, 2010.

WHITEHOUSE, C. M. et al. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

WHITELEGGE, J. P. Plant proteomics: BLASTing out of a MudPIT. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v. 99, 11564-11566, 2002.

WILKINS, M. R. et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and genetic engineering reviews**, v. 13, n. 1, p. 19-50, 1996.

WILLIAMS, P. H. Black rot: a continuing. **Plant disease**, v. 64, 1980.

WITTSTOCK, U.; BUROW, M. Glucosinolate breakdown in *Arabidopsis*: mechanism, regulation and biological significance. **The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists**, v. 8, 2010.

WOLTERS, D. A.; WASHBURN, M. P.; YATES, J. R. 3rd. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. **Analytical Chemistry**. 73, 5683-5690. 2001

WRIGHT, H. T; SANDRASEGARAM, G.; WTIGHT, C. S. Evolution of a family of N-acetylglucosamine binding proteins containing the disulfide-rich domain of wheat germ agglutinin. **J. Mol. Evol.**, v. 33, p. 283-294, 1991.

WU, L. et al. Comparative proteomic analysis of the plant–virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. **Journal of proteomics**, v. 89, p. 124-140, 2013a.

WU, L. et al. Proteomic and phytohormone analysis of the response of maize (*Zea mays* L.) seedlings to sugarcane mosaic virus. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e70295, 2013b.

YADAV, P., et al. Recent Perspective of Next Generation Sequencing: Applications in Molecular Plant Biology and Crop Improvement. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: **Biological Sciences**. V. 88: 2, p. 435–449, 2018.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko; SHINOZAKI, Kazuo. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 57, p. 781-803, 2006.

YAMADA, K., et al. Regulation of sugar transporter activity for antibacterial defense in *Arabidopsis*. **Science**, aah5692, 2016.

YAMAGUCHI, Y.; PEARCE, G.; RYAN, C. A. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. Proceedings of the **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, 10104-9, 2006.

YANG, P. et al. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 47-71, 1993.

YANG, K., et al. Whole-genome sequencing of *Brassica oleracea* var. *capitata* reveals new diversity of the mitogenome. **PloS one**, v. 13, n. 3, p. e0194356, 2018.

YESILIRMAK, F.; SAYERS, Z. Heterologous expression of plant genes. **International journal of plant genomics**, v. 2009, 2009.

YI, E. C.; GOODLETT, D. R. Quantitative Protein Profile Comparisons Using the Isotope-Coded Affinity Tag Method. **Current Protocols in Protein Science**, p. 23.2. 1-23.2. 11, 2003.

YUAN, L. et al. Involvement of Histone Modifications in Plant Abiotic Stress Responses. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 10, p. 002, 2013a.

YUAN, Z. et al. Genetic and proteomic analyses of a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* purC mutant deficient in purine biosynthesis and virulence. **Journal of genetics and genomics**, v. 40, n. 9, p. 473-487, 2013a.

ZHANG, L.; et al. A proline iminopeptidase gene upregulated *in planta* by a LuxR homologue is essential for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular Microbiology**, 65 (1), p. 121-136, 2007.

ZHANG, J.; ZHOU, J. M. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. **Molecular Plant**, v. 7, p. 783-793, 2010.

ZHANG, Yaoyang et al. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343-2394, 2013.

ZHANG, Y. et al. Overexpression of three glucosinolate biosynthesis genes in *Brassica napus* identifies enhanced resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0140491, 2015.

ZHAO, Z., et al. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. **Plant molecular biology**, v. 44, n. 6, p. 789-798, 2000.

ZHU, W, MAGBANUA, M. M, WHITE, F. F. Identification of Two Novel hrp-Associated Genes in the hrp Gene Cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of bacteriology* 182, 1844-53, 2000.

ZHU, W.; SMITH, J. W.; HUANG, C. M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. **BioMed Research International**, v. 2010, 2009.

APENDICE 1: FIGURAS SUPLEMENTARES

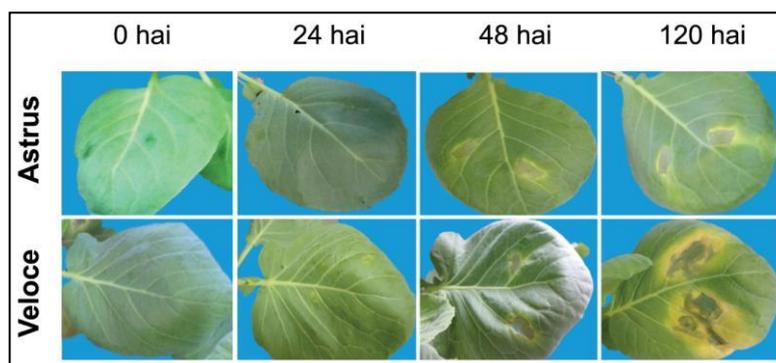


Figura S1. Sintomas das cultivares Astrus Plus (moderadamente resistente) e VELOCE (suscetível) de *B. oleracea* var. *capitata*, em diferentes horas pós-inoculação (hpi).

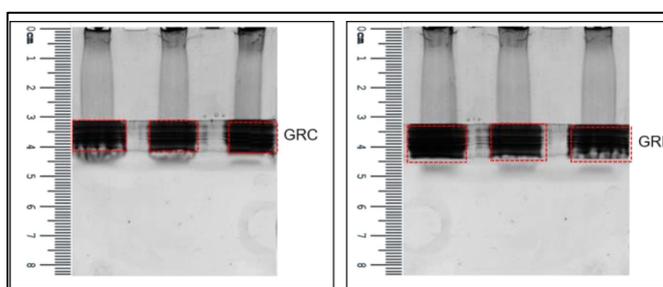


Figura S2. Figura exemplificando o fracionamento padrão em SDS-PAGE 12 %. Retângulos vermelhos pontilhados delimitam a área excisada no gel, a régua indica o fim da eletroforese, 1 cm após a amostra migrar no o gel separador.

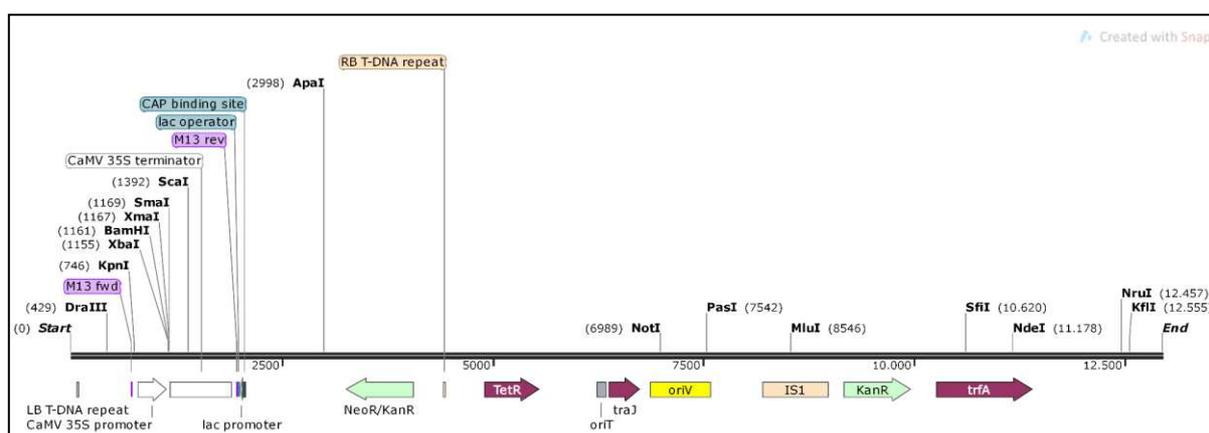


Figura S3. Mapa do linear do pBIN61, representando os sítios de restrição de algumas enzimas incluindo *XbaI*. Fonte: Snapgene.

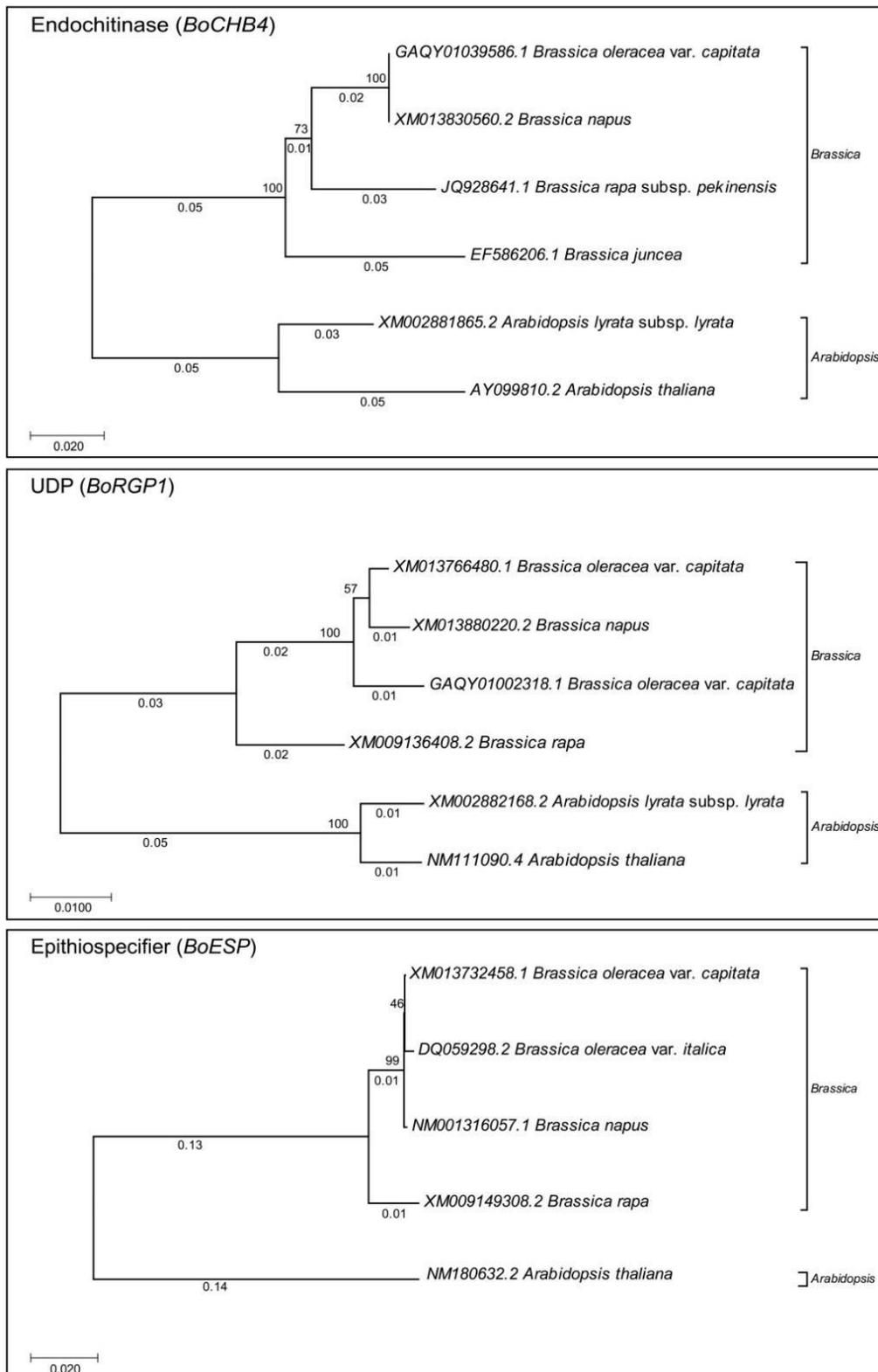


Figura S4. Árvores filogenéticas baseadas no método de *Neighbor-joining* dos genes de interesse (*BoCHB4*, *BoESP*, *BoRGP1*) em plantas de *Brassica* e *Arabidopsis*. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxons associados são agrupados no método de bootstrap (1000 réplicas) é mostrada na parte superior das ramificações. As distâncias evolucionárias foram computadas utilizando o método de Kimura 2-parâmetros e a dissimilaridade é expressa abaixo das ramificações. Ramos sem um valor não apresentaram dissimilaridade, similaridade = 100%.

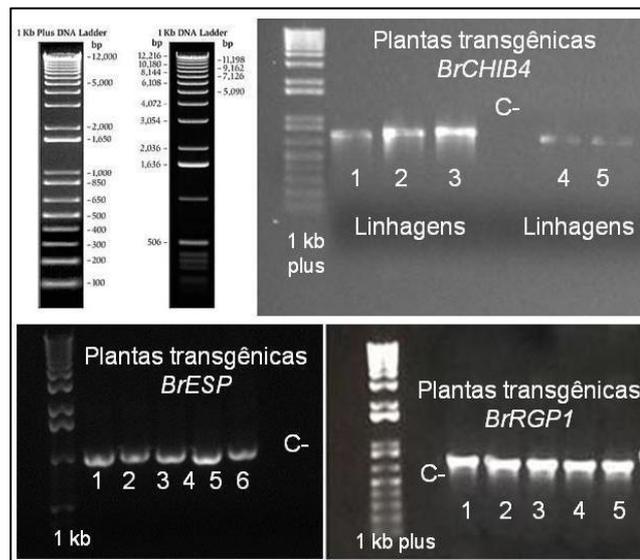


Figura S4. PCR convencional realizado com primers específicos para a região codante do transgene em plantas de *A. thaliana* transformadas, para confirmação da presença do gene. Números indicam o número de transgenes testadas para cada gene nas plantas da geração T2. Cinco das linhagens em homozigose, selecionada para obtenção da geração T3, dos transgenes *BoCHIB4* (~818 pb) e *BrRGP1* (~767 pb), das transgenes *BoESP* (~10204 pb) somente as três primeiras estavam em homozigose. (C-) controle negativo, DNA de plantas não transformadas. No canto superior esquerdo as especificações comerciais dos marcadores utilizados (Invitrogen).



Figura S5. Diferença entre as plântulas de 7-10 após *floral dip*, no momento de selecionar plantas transformadas, resistentes a canamicina, para aquisição de sementes T1.

APÊNDICE 2: TABELAS SUPLEMENTARES

TABELA S1: Informação dos primers usados no trabalho.

GeneBank ^a	Protein Name ^b	Primers Informations (RTq-PCR)			
		Forward (5'-3') Reverse (5'-3')	TM (°C)	[§] pb	Efficiency
GAQY01006468.1	Ankyrin repeat domain-containing protein 2-like Gn=N/A (ANK)*	CGTGGAGATGTTGAGGGTTT GCCGTATCCACAAGCAAAAT	60.0 60.0	105	0.8403
GAQY01000191.1	Annexin E1 Gn=N/A (ANNAT2)* EC 1.1.1.284	AAATGGGAAGTACGAGTGG TCCTGCGCTGATACTCCTCT	60.0 60.1	93	0.8553
GAQY01037035.1	Apyrase 5 Gn=106295086 (APY5)*	CTTGGGTGGTTGCGAACTAT CGTACGAGAGAACCCAGGAG	60.0 59.9	140	0.8441
GAQY01000707.1	Aquaporin PIP1-2 Gn=N/A (PIP1-2)*	CCCTATTGGATTGCTGTGT AGAGTTTTGGAACCGTGGTG	60.0 60.0	96	0.8631
GAQY01003687.1	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit Gn=106322440 (CLPP)*	CGAGCAATGGGCTGTTTTAT TGAAGCTGCTTTGCTTCTGA	60.1 60.0	90	0.8912
GAQY01035111.1	ATP synthase gamma chain 1, chloroplastic Gn=106335613 (ATPC1)*	TTCCTCTCCCAAACCACAAC GGCTTCGGTGATCTTCTGAG	59.9 60.0	125	0.8925
GAQY01036959.1	BAG family molecular chaperone regulator 7-like Gn=N/A (BAG7)*	GAGTGGGGAAGGTGATGAGA CACCGAGAAACCTCCATTGT	60.0 60.0	108	0.8589
GAQY01039586.1	Basic Endochitinase CHB4-like Gn=N/A (CHI-B4)*	CCTGATCCTAACCGTTTCCA CTTGCAAGGTCTTCTTTGC	59.9 60.0	136	0.8496
AKM97935.1	Cytochrome b559 subunit alpha Gn=PSBE	TGTCTGGAAGCACAGGAGAA AACCGGTGCTGACGAATAAC	59.5 60.0	123	0.8505
GAQY01005237.1	Epithiospecifier -like Gn=106296341 (ESP)*	AGACAAACCTTCTGCCGAGGA TCCAAAGCAAACCTTCATC	60.0 60.1	138	0.8491
GAQY01006041.1	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-3 Gn=106318979 (ERF1-3)	CTCTGCGACAACAAGTTCCA TCCCACTCAAAGTCCCAAAC	60.0 59.9	115	0.8721
GAQY01003838.1	Gibberellin-regulated protein 1 GN=106298463 (GIBB)*	CCTAACCTTTGCCACAGAGC TAGCGTAGCACTGGCACTTG	59.9 60.2	100	0.8369
GAQY01002059.1	Lectin-like protein At3g16530 Gn=106343897 (LLP)*	CTTGTTCTTCTCGGAGACG AATGGGATGGGGTTGATGTA	60.0 59.9	132	0.8577
GAQY01050797.1	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At1g29720 Gn=At1g29720 (RFK1)*	GTCATGGAGCCTAGCCAATC TTCTCCACCACGGATCTAC	59.7 59.9	120	0.8731
GAQY01001479.1	Metacaspase-4 Gn=106300010 (AMC4)*	TCATCATCCTCCCCTGTCTC CAAACCTACGGGAAGAACA	60.0 60.0	132	0.8332
GAQY01017042.1	MLP-like protein 31 Gn=106326827 (MLP31)*	GAGCAACCTCGTCGCTAATC AAGCTTCTTGCTCACGATCC	60.1 60.0	90	0.8417
GAQY01042838.1	Peroxiredoxin-2F, mitochondrial Gn=N/A (PRX5)*	TGCCCAACCGTTTATGGTAT GCATGTGCCAAGCTACAAGA	60.1 60.0	106	0.83
GAQY01000503.1	Peroxidase Gn=106312869 (PRX)* EC:1.11.1.7	TTGGTTCGTAAGGGTTGC CCTCCACTGCTGCTTTCATT	60.0 60.4	138	0.8763
GAQY01037531.1	Photosystem II D2 protein Gn=PSBD* EC:1.10.3.9	ACTTCCCCACCTAGCCACTT AGCCCAAACCTGCAAGAAGAA	60.0 60.0	116	0.7992
GAQY01000204.1	Protease Do-like 8, chloroplastic Gn=106336631 (DEGP8)*	AGACGGCAAGATCCTTAGCA ACCCAATCCCTGGTGATGTA	60.0 59.9	114	0.8518
GAQY01019483.1	Protein DETOXIFICATION Gn=N/A (DTX)*	AGTTTCGCTGCCCTTGACTA AACGGAGATACCGAGTGTGG	60.0 60.0	141	0.8537
GAQY01045530.1	psbP domain-containing protein 4, chloroplastic GN=106298415 (PSBP4)*	ATCAAACGCCATTTCTCAGG TGTGGATGAGGATGACAGGA	59.9 60.0	106	0.882
GAQY01034654.1	Superoxide dismutase Gn=FSD1	AAATGGCTGCTTCAAGTGCT CATAAACGGCTCCAAAGCAT	60.0 60.1	83	0.8507
GAQY01042895.1	Thylakoid lumenal 17.4 kDa protein, chloroplastic Gn=106313560 (TL17)*	CTTCGCTTCTGTCCAGTTC AAGATCTCTGCTCCGTGGAA	60.0 60.0	90	0.8355

GeneBank ^a	Protein name ^b	Primers Informations			
		Forward (5'-3') Reverse (5'-3')	TM (°C)	*pb	Efficiency
GAQY01000155.1	Translation initiation factor IF-2 Gn=106294757 (<i>IF-2</i>)*	AACTGTCATGCTCGTTGCTG TCTTCTCAACGTGCCCTTCT	60.1 60.0	142	0.8833
GAQY01002318.1	UDP-arabinopyranose mutase 1-like Gn=N/A (<i>RGP1</i>)*	CTGGCTCAACATCCCTGATT AGGCCAAGTTCATTCCACAC	60.1 60.0	134	0.849
GAQY01002282.1	Uncharacterized protein At5g02240 Gn=106318266	GATTTGTTCCACCCATGGAC GATTGGATTGGCCAGAAGAA	60.0 60.0	91	0.8558
GAQY01044825.1	Uncharacterized protein Gn=106318549	TCCCAAGATCACTCAAAGG GTCGCTTCAAAGGAATCAGC	60.0 60.0	121	0.8564
GAQY01004057.1	Uncharacterized protein Gn=106322559 (<i>RUB</i> *)	CCTCCTTCCACACCAGTGAT ACAGCAGCTTGAAGACCAT	60.0 60.0	104	0.8444
GAQY01006072.1	Universal stress protein YxiE-like Gn= 106296807 (<i>USPA</i>)*	TGACATGCTCGACACTGGTT CCTCTGCTTCCCATGACAAT	60.3 60.1	135	0.8753
AT3G18780	[£] Actin (<i>ACT2</i>)*	CTTGCACCAAGCAGCATGAA CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT	60.0 60.0	68	0.857
AT5G60390	[£] Elongation factor 1- α (<i>EF-1α</i>)	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA	60.0 60.0	76	0.859
XM_013776124.1	[£] SAND family protein (<i>SAND</i>)	GGTAAAATCGGTGTGGCTTC ATGGCGACTTCAGATTTCGAG	60.0 60.0	171	0.842
XM_013728490.1	[£] TATA-box-binding protein 1 (<i>TBP1</i>)	TCTTGGCTCCAGTACAAACC ACATTGTGTCGACGGTGAAC	60.0 60.0	177	0.8584
XM_013755988.1	[£] Tubulin beta-6 (<i>TUB6</i>)	TCCATCTCGTCCATTCTTC AACGTGAAGTCAAGCGTGTG	60.0 60.0	179	0.860
XM_013778573.1	[£] Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 Ubiquitin (<i>UBQ1</i>)	GGCCTTGATAATCCCTGATGAATAAG AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT	60.0 60.0	186	0.8354
GAQY01039586.1 [#]	Basic Endochitinase CHIB4-like (<i>CHI-B4 like</i>)	ATGACCAGTTTGCTACTTTACTCA TTAACAAGTGAGGTTTTCTCCAGG	58.0 59.0	818	---

^aIdentification number of available in NCBI database; Gn=gene name available in UniProt database; ^{*}Amplicon size (bp base pairs); [£]Reference genes. ^{*}The homologous gene, names from *A. thaliana* used for naming the gene to RTq-PCR genes, because the most proteins be coming of predicted information, and not have gene information in UniProt database, in this work we used the symbol of homologous genes to name them. [#]specific primer for gene sequencing.

TABELA S2: PROTEÍNAS COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NA INTERAÇÃO RESTENTE - INOCULADO:CONROLE.

<i>Accession</i>	<i>Description</i>	<i>Score</i>	<i>Max fold change</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Mass</i>	<i>Length</i>	<i>#Peptide</i>	<i>#Unique</i>
ENERGETIC METABOLISM								
Metabolic process								
A0A0D3D4E9	Aconitate hydratase Gn=LOC106306006 (EC:4.2.1.3; 1.1.1.37)	468.28	1.685	13	107.66	987	8	4
A0A0D3BK76		71.99	3.088	9	98.17	898	6	2
A0A0D3BPL2	Basic Endochitinase CHI-B4-like Gn=CHI (EC 3.2.1.14)	45.26	6.162	3	30.30	281	1	1
A0A0D3BMU9	Malate dehydrogenase mitochondria Gn=MDH (EC 1.1.1.37)	123.17	4.486	45	39.66	373	18	2
A0A0D3CQE1		187.42	2.594	50	35.75	341	17	1
A0A0D3CGI3	Malate dehydrogenase, chloroplastic Gn=Bo5g092980 (EC 1.1.1.37)	491.68	2.029	28	80.95	745	13	10
A0A0D3BXB6	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like like Gn=LOC106341843 (EC 4.1.2.13)	282.76	6.592	20	41.08	365	4	4
<i>Glycolytic/glycolysis and gluconeogenesis</i>								
A0A0D3C0Z6	Fructose biphosphate aldolase Gn=Bo4g145900 (EC 4.1.2.13)	34.48	2.146	40	41.68	384	16	1
A0A0D3BSL1	Fructose-1,6- cytosolic Gn=Bo4g045270 (EC 3.1.3.11)	47.10	8.756	38	32.28	292	7	1
A0A0D3DXN8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase chloroplastic Gn=GABA2 (EC 1.2.1.-)	95.30	1.568	60	42.58	399	32	2
A0A0D3D1V1	Phosphoglycerate cytosolic Gn=LOC106300883 (EC 2.7.2.3)	46.78	1.653	44	42.08	401	15	1
A0A0D3AA76	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha- mitochondrial Gn=LOC106312421 (EC 1.2.4.1)	94.98	2.204	9	42.92	389	3	2
<i>Processo biosintetico</i>								
A0A0D3EEL1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1-like Gn=Bo9g159630	152.28	2.203	33	82.61	745	20	1
A0A0D3E2U4	Serine--glyoxylate aminotransferase-like Gn=AGT (EC 2.6.1.45)	55.44	2.470	32	44.15	401	11	1
A0A0D3B9D8	UDP-arabynopyranose mutase 1-like Gn=Bo3g055540 (EC 5.4.99.30)	51.15	8.624	24	44.10	390	7	1
Aminoacid Metabolism								
A0A0D3CZT9	Serine hydroxymethyltransferase mitochondrial Gn=Bo6g112870 (EC 2.7.2.3)	90.34	2.000	24	57.16	515	11	2
PROTEIN BIOSINTESIS, FOLDING, ASSEMBLI, FATE AND DEGRADATION								
A0A0D3AL95	26S protease regulatory subunit 6B homolog Gn=LOC106327908	254.93	1.730	15	45.47	404	5	5
A0A0D3E058	Elongation factorTu mitochondrial Gn=LOC106315471	37.06	1.619	18	49.51	456	6	1

Continuation

Accession	Description	Score	Max fold change	Coverage (%)	Mass	Length	#Peptide	#Unique
PROTEIN BIOSYNTHESIS, FOLDING, ASSEMBLY, FATE AND DEGRADATION								
A0A0D3CRG6	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-1 (EC 3.4.24.64)	21.18	12.424	12	54.44	504	4	1
A0A0D3D6K0	T-complex 1 subunit epsilon Gn=LOC106306029 (EC 1.2.1.-) Processos de tradução, pós-tradução e transdução	45.45	4.618	8	59.47	535	2	2
A0A0D3EF45	Proteína 40S ribosomal S7-3 Gn=LOC106317945	66.48	2.097	17	22.00	190	2	2
A0A0D2ZSK2	Ribosilation factor-ADP 1-like Gn=LOC106320540 (EC 1.2.4.1)	134.69	4.027	15	20.61	181	2	2
PHOTOSYNTHESIS, PHOTORESPIRATION AND CHLOROPLASTIC PROCESS								
A0A0D3CND9	Photosintetic NDH subunit of lumenal location chloroplastic -like Gn=Bo5g155140	176.30	1.837	37	18.98	169	4	4
DISEASE/DEFENSE RESPONSE								
A0A0D3BET0	14-3-3 GF14 kappa isoform X1 (EC 4.2.1.3) Gn=LOC106336315	161.92	1.510	29	27.96	248	7	1
A0A0D3BR44	Aldo-keto reductase family 4 member C8 Gn=LOC106341758	97.88	1.570	12	34.81	311	2	2
I3Y171	Annexina D2 Gn=ANN2 (EC 1.1.1.284)	203.65	1.685	19	36.02	316	5	5
A0A0D3EHU5	Sulfase redutase assimilatória (ferredoxina) chloropastic Gn=LOC106318512 (EC 1.15.1.1)	136.71	2.606	16	72.31	645	8	3
A0A0D3B771	Glutathiona S-transferase U5 Gn=LOC106336013	428.89	2.152	38	25.78	224	7	7
A0A0D3CVZ5	Glutathiona S-transferase U19 Gn=LOC106301073 (2.1.2.1)	810.15	1.510	40	25.66	219	9	7
A0A0D3CJY3	Lectina At3g16530 Gn=LOC106343897	43.15	1.759	3	30.66	276	1	1
F8U7Z7	Superoxide dismutase [Fe] chloropastic Gn=FSD1	174.08	3.098	20	23.90	212	2	2
A0A0D3CTQ3	Universal stress PHOS34-like Gn=LOC106296807	121.97	1.908	22	17.69	159	2	2
SIGNALING PATHWAY								
A0A0D3CSX5	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase Gn=Bo6g061010	44.34	2.117	3	86.87	783	2	2
OXIDATION REACTION								
J7GP93	S-(hydroxymethyl)glutathiona dehydrogenase-3 Gn=ADH3 (EC:1.1.1.284)	239.75	2.159	20	40.70	379	5	5
ASSIMILATION, FIXATION PROCESS								
A0A0D3CH25	ATP sulfurylase chloroplastic Gn=LOC106295272	401.54	1.666	28	50.74	459	8	2
CELL HOMEOSTASIS AND ORGANIZATION								
A0A0D3CPQ2	Thioredoxin chloroplastic Gn=LOC106298282 (EC 1.1.1.37)	27.32	3.176	8	19.59	180	1	1

Continuation

<i>Accession</i>	<i>Description</i>	<i>Score</i>	<i>Max fold change</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Mass</i>	<i>Length</i>	<i>#Peptide</i>	<i>#Unique</i>
DEVELOPMENT AND REPRODUCTOTION PROCESS								
A0A0D3C124	Violaxanthin de- partial Gn=Bo4g148160	27.95	3.790	2	83.51	733	1	1
NO INFORMATION								
A0A0D3AX01	5 -nucleotidase domain-containing 4-like Gn=LOC106318774	35.35	3.613	2	69.37	613	1	1
A0A0D3E4P3	Adenosine tRNA methyltransferase Gn=LOC106313724	144.71	2.055	17	27.17	236	4	4
A0A0D3ECB6	PREDICTED: protein LOC106318549	118.95	3.467	29	24.17	210	3	3

Accession: code of protein in database UniProt

Description: Protein name

No information: The proteins that not has GO information in UniProt Database with any other similarity with model plants, referent to same protein at present work

Coverage (%): the percent of the residues in each protein sequence that have been identified

Max fold change: how many times the proteins is more abundant in relation at control

#Unique: The number of peptide sequences unique to a protein group.

#Peptides: The number of distinct peptide sequences in the protein group.

Length: number of amino acids in the canonical sequence displayed by default in the entry

GN: gene name (N/A: no annotated)

EC number: enzyme code

PROTEÍNAS COM ABUNDÂNCIA DIMINUÍDA NA INTERAÇÃO RESISTENTE - INOCULADO:CONTROLE

Accession	Description	Score	Max fold change	Coverage (%)	Mass (Da)	Length	#Peptides	#Unique
METABOLISM								
Metabolic process								
A0A0D3EC46	(DL)-glycerol-3-phosphatase 2 Gn=N/A	56.23	2.91	2	101.34	878	1	1
A0A0D3A148	6-phosphogluconate decarboxylating chloroplastic Gn=N/A	44.76	2.28	12	13.83	128	1	1
A0A0D3BB71	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex (EC 2.3.1.12)	201.80	1.52	13	61.99	568	5	5
A0A0D3AX14	Beta-D-xylosidase 1 Gn=BXL1 (EC 3.2.1.-)	34.69	2.78	10	83.22	772	5	1
A0A0D3CBP7	Endoglucanase Gn=LOC106327099 (EC 3.2.1.4)	92.44	1.55	4	125.55	1131	4	3
A0A0D3B2U9	malate dehydrogenase [NADP] chloroplastic -like Gn=LOC106335373 (EC 1.1.1.82)	183.75	1.62	27	48.31	444	12	2
A0A0D3CLB4	Phosphoglucan phosphatase chloroplastic Gn=LOC106292619	48.17	1.85	3	32.51	286	1	1
Biosynthetic process								
A0A0D3CGS6	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, chloroplastic Gn=GPAT (EC 2.3.1.15)	98.38	1.85	8	49.88	451	2	2
A0A0D3DET7	UDP-N-acetylglucosamine transferase subunidade ALG14 homolog Gn=N/A	29.84	2.30	3	20.14	176	1	1
A0A0D3AI64	Porphobilinogen deaminase, chloroplastic -like Gn=LOC106327858	49.99	1.70	28	40.70	380	9	1
A0A0D3BF93	SAL1 phosphatase Gn=LOC106328745	378.11	1.74	18	43.39	405	7	7
A0A0D3CSK4	Pentatricopeptide repeat-containing protein Gn=LOC106296692At4g14850	25.19	2.19	1	75.11	684	1	1
A0A0D3CPS1	Formate--tetrahydrofolate ligase Gn=LOC106300060	311.46	1.52	14	67.78	633	8	5
A0A0D3A124	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase Gn=N/A (EC 2.5.1.54)	99.36	1.77	8	53.35	483	4	2
A0A0D3DCM7	UMP-CMP kinase Gn=UMP/CMPK (EC 2.7.4.14)	167.20	1.55	26	23.25	209	4	4
A0A0D3C154	aspartate aminotransferase Gn=LOC106337354 (EC 2.3.1.15)	55.94	1.74	5	50.62	470	2	2
Lipid and Fatty Acid Biosynthesis								
A0A0D3BPL9	Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase Gn=LOC106342438(EC 1.14.19.-)	64.37	1.55	3	45.31	399	1	1
Aminoacid Metabolism								
A0A0D3AAX8	Dihydroxy-acid chloroplastic Gn=LOC106317268	23.75	2.26	3	64.71	605	1	1
A0A0D3DL12	Glutamine synthetase Gn=LOC106312454 (EC 6.3.1.2)	74.09	1.72	46	47.39	428	30	2
A0A0D3E238	Histidinol dehydrogenase, chloroplastic Gn=HDH (EC 1.1.1.23)	27.85	1.91	2	50.97	470	1	1

Continuation

<i>Accession</i>	<i>Description</i>	<i>Score</i>	<i>Max fold change</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Mass (Da)</i>	<i>Length</i>	<i>#Peptides</i>	<i>#Unique</i>
Aminoacid Metabolism								
Q5FAL5	Putative 2-isopropylmalate synthase Gn=B21F5.11	44.57	2.26	4	67.64	623	2	2
A0A0D3E3G6	Threonine synthase chloroplastic -like Gn=N/A	96.31	1.72	14	72.01	649	8	2
A0A0D3A3B8	Threonine synthase 1, chloroplastic Gn=LOC106304601	556.46	1.84	28	57.80	525	11	5
PROTEIN BIOSYNTHESIS, FOLDING, ASSEMBLY, FATE AND DEGRADATION								
A0A0D3CSF1	RuBisCO large subunidade-binding protein subunidade beta, chloroplastic Gn=LOC106300192	254.86	2.00	56	63.90	600	36	2
A0A0D3BJ97	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP18-3 (EC 5.2.1.8)	578.79	1.60	56	18.37	172	7	3
A0A0D3BTP6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP19-4 (EC 5.2.1.8)	80.40	1.93	13	21.73	201	3	2
A0A0D3ECI2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-1 (EC 5.2.1.8)	42.89	1.79	5	22.11	205	1	1
<i>Ubiquitination process</i>								
A0A0D3BLH4	E3 ubiquitin ligase SUD1 isoform X2 Gn=N/A	23.93	2.43	1	95.63	846	1	1
A0A0D3BAZ0	Mediator of RNA polymerase II transcription subunidade 37c Gn=LOC106335088	535.35	1.59	38	71.26	650	24	1
A0A0D3ARJ5	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 36 Gn=LOC106327600	113.50	1.74	22	17.25	153	2	2
A0A0D3ECQ3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 7 Gn=LOC106313793	37.19	2.00	6	18.76	166	1	1
<i>Translation, pos-translational and Transduction process</i>								
A0A0D3BJ90	26S proteasome non-ATPase regulatory subunidade 4 homolog Gn=LOC106335639	130.35	1.65	11	40.32	383	2	2
A0A0D3CJZ8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunidade 5 Gn=N/A	156.73	2.26	4	84.09	769	3	3
A0A0D3B232	40S ribosomal S8-1 Gn=LOC106328694	41.25	1.61	23	25.33	226	4	1
A0A0D3A6U1	60S ribosomal L14-2 Gn=LOC106292181	53.14	1.75	7	15.50	134	1	1
A0A0D3D9N2	60S ribosomal L3-1 Gn=LOC106306509	126.64	1.77	9	44.66	391	4	4
A0A0D3BD13	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunidade B, chloroplastic / mitochondrial (Glu-AdT subunidade B) Gn=GATB (EC 6.3.5.-)	142.23	1.79	10	54.06	489	3	3
A0A0D3E141	Histone H2A Gn=LOC106317918	68.19	1.94	18	16.05	153	3	2
A0A0D3AEE9	Lysine--tRNA ligase Gn=LOC106336618 (EC 6.1.1.6) (Lysyl-tRNA synthetase)	160.82	2.13	7	70.02	618	4	4

Continuation

Accession	Description	Score	Max fold change	Coverage (%)	Mass (Da)	Length	#Peptides	#Unique
PROTEIN BIOSYNTHESIS, FOLDING, ASSEMBLY, FATE AND DEGRADATION								
A0A0D3CWB1	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase COG0212 Gn=LOC106296821	135.59	1.79	10	39.35	352	3	3
A0A0D3BJ21	Elongation factor 1-delta 1 Gn=LOC106331419	57.88	1.70	20	25.05	230	5	2
A0A0D3B7N9	Serina threonine- kinase HT1 Gn=LOC106327935	37.06	1.64	2	42.64	385	1	1
PHOTOSINTNESIS, PHOTORESPIRATION AND CHLOROPLASTIC PROCESS								
A0A0D3EEB1	Divinyl chlorophyllide a 8-vinyl- chloroplastic Gn=LOC106318279	48.91	1.96	3	45.41	415	1	1
A0A0D3B8L3	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur chloroplastic Gn=N/A	150.62	1.75	24	30.48	284	5	2
A0A0D3DI26	Oxygen-evolving enhancer chloroplasticGn=LOC106301616	82.62	1.73	24	34.08	319	6	3
A0A0D3B7Z5	Chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplasticGn=LOC106328597	64.68	3.64	32	30.09	280	8	1
A0A0D3B879	PGR5-like protein 1B, chloroplasticGn=LOC106335540	160.99	1.81	18	35.60	320	4	3
A0A0D3CFB6	Photosystem II CP43 reaction center protein Gn=N/A	215.37	2.22	8	59.91	548	3	2
A0A0D3A6Y4	Protochlorophyllide reductase chloroplasticGn=N/A	168.35	1.70	34	20.51	186	8	3
A0A0D3C9T1	Tetratricopeptide repeat 1 Gn=N/A	48.88	2.51	2	100.14	913	1	1
A0A0D3CAZ7	Translation initiation factor IF- chloroplastic Gn=LOC106294757	114.21	1.97	3	108.61	1022	3	3
A0A0D3CJR9	Uncharacterized protein LOC106296115	44.38	1.87	4	29.60	267	1	1
A0A0D3C7D0	Protochlorophyllide reductase chloroplastic	33.96	1.55	37	48.43	439	14	1
A0A0D3BBE1	Multiple organellar RNA editing factor chloroplastic mitochondrial-like Gn=LOC106336338	96.95	1.62	6	43.16	399	2	2
A0A0H3Y354	Photosystem I iron-sulfur center Gn= psaC (EC 1.97.1.12)	467.53	1.53	84	9.04	81	7	7
A0A0D3CZK2	Carbonic anhydrase Gn=N/A (EC 4.2.1.1) (Carbonate dehydratase)	22.29	3.02	10	30.89	280	2	1
A0A0D3DEV3	Mg-protoporphyrin IX chelatase Gn=LOC106306835 (EC 6.6.1.1)	586.13	1.53	37	46.53	427	11	11
K4FZS3	Ribulose biphosphate carboxylase large chain Gn=rbcL (EC 4.1.1.39)	53.54	1.67	68	42.32	384	88	2
A0A0D2ZQG6	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase oxygenase large partial (chloroplast) Gn=N/A	48.20	1.65	63	42.68	381	65	1
A0A0D3CLT0	Chlorophyll a-b binding protein CP29.2, chloroplasticGn=LOC106294502	141.84	1.69	15	31.18	289	3	3

Continuation

<i>Accession</i>	<i>Description</i>	<i>Score</i>	<i>Max fold change</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Mass (Da)</i>	<i>Length</i>	<i>#Peptides</i>	<i>#Unique</i>
DESEASE/DEFENSE RESPONSE								
A0A0D3BEN2	2-oxoglutarate mitochondrial Gn=LOC106334854	82.38	2.20	2	114.98	1015	2	2
A0A0D3C2E9	Copper ion binding Gn=LOC106336957	68.40	1.51	25	11.85	112	2	2
A0A0D3AT05	Glutathione peroxidase mitochondrial Gn=LOC106321579	164.86	1.56	23	25.36	229	4	4
A0A0D3BJE9	Glycine-rich RNA-binding 10 isoform X1 Gn=LOC106335131	102.02	2.03	30	16.22	167	4	1
A0A0D3E3R7	Hsp70-Hsp90 organizing 2 Gn=LOC106319102	46.42	1.65	3	63.07	561	2	2
A0A0D3BE15	L-ascorbate peroxidase peroxisomal-like Gn=LOC106328411	151.26	1.61	18	35.87	325	3	3
A0A0D3APR4	MLP-like protein 31 Gn=LOC106326827	38.43	2.10	4	23.93	218	1	1
A0A0D3E2V6	Peroxidase 32 Gn=LOC106312869 (EC 1.11.1.7)	29.43	1.63	3	41.38	374	1	1
A0A0D3B8J8	Plastid lipid-associated protein 1, chloroplastic Gn=LOC106328517	20.25	2.08	15	35.70	327	5	1
A0A0D3A546	Plastid lipid-associated protein 2, chloroplastic Gn=LOC106292489	67.25	1.79	9	34.55	317	3	1
A0A0D3CPI3	Polyadenylate-binding protein Gn=PABP	135.53	1.71	5	70.97	653	2	2
A0A0D3DLP4	Selenium-binding 2 Gn=LOC106312718	98.94	2.52	11	53.99	487	4	2
A0A0D3D061	Uncharacterized protein LOC106298385 Gn=LOC106298385	95.92	1.86	7	33.26	309	1	1
A0A0D3C143	Uncharacterized protein LOC106339685	135.49	1.63	17	20.12	182	3	3
TRANSPORT								
A0A0H3Y2E8	ATP synthase subunidade b, chloroplastic Gn=atpF	333.55	1.85	29	21.04	184	4	4
A0A0D3CY16	Protein HHL1, chloroplastic -like isoform X2 Gn=HHL1	63.19	2.04	22	25.43	227	3	1
CELL ORGANIZATION, HOMEOSTASIS AND REPAIR								
A0A0D3A3P4	Glutaredoxin-C5, chloroplastic -like Gn=LOC106314950	108.80	1.60	23	18.76	175	3	2
A0A0D3C505	Hexosyltransferase Gn=LOC106342603 (EC 2.4.1.-)	22.03	1.84	2	69.14	611	1	1
A0A0D3C853	Histone H1.1 -like Gn=LOC106292483	62.59	1.61	4	25.88	248	1	1
A0A0D3CMF0	Peroxioredoxin- mitochondrial Gn=N/A	228.46	1.53	29	21.38	200	4	4

Continuation

Accession	Description	Score	Max fold change	Coverage (%)	Mass (Da)	Length	#Peptides	#Unique
DEVELOPMENT AND REPRODUCTOTION PROCESS								
A0A0D2ZQ33	Alfa beta-Hydrolases superfamily Gn=N/A	50.55	1.50	6	29.32	259	1	1
A0A0D3CMS5	Flowering locus K homology domain Gn=LOC106293793	45.08	1.83	3	54.91	510	1	1
A0A0D3DQ98	Protein transport protein SEC31 homolog A isoform X1 Gn=LOC106310314	22.64	2.23	1	103.74	942	1	1
A0A0D3EEY7	Valine--tRNA chloroplastica mitochondrial 2 isoform X1 Gn=N/A	886.70	1.70	8	142.40	1260	13	13
NO INFORMATION								
A0A0D3B9F1	14-3-3 GF14 protein nu Gn=LOC106336139	54.03	1.92	29	29.41	261	9	1
A0A0D3DYQ4	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 3-like Gn=N/A	150.84	1.57	19	20.40	181	3	3
A0A0D3CRD0	BnaC06g09650D Gn=N/A	24.29	18.50	6	14.91	136	1	1
B1Q3A8	Cysteine protease Gn=BrCP3	310.00	1.51	16	47.40	431	5	1
A0A0D3CVM1	D-glycerate 3- chloropastic -like Gn=LOC106300109	337.32	1.58	24	51.46	458	8	3
A0A0D3CHW5	DNA-damage-repair toleration DRT100-like Gn=LOC106295795	401.01	1.59	32	39.91	365	8	8
A0A0D3C4D6	FAD-dependent urate hydroxylase Gn=LOC106342207	284.65	2.13	14	48.69	445	5	5
A0A0D3E2Y9	Ferredoxin--nitrite chloropastic -like Gn=LOC106318938	942.10	1.58	32	65.15	584	18	7
A0A0D3DQE3	Glutathione S-transferase mitochondrial-like Gn=LOC106309564	223.19	1.54	25	23.22	210	5	5
A0A0D3CJR1	MAR-binding filament 1 Gn=N/A	155.71	1.76	3	80.73	716	3	3
A0A0D3DVU9	Polyadenylate-binding protein (PABP) Gn=LOC106312333	34.40	1.80	5	70.08	645	3	2
A0A0D3B4A1	PTI1-like tyrosine- kinase 2 isoform X1 Gn=LOC106327924	167.11	1.49	12	40.06	363	4	4
A0A0D3C4S4	SLOW GREEN chloropastic -like Gn=LOC106342420	53.22	1.85	4	36.95	327	1	1
A0A0D3B205	Uncharacterized protein LOC106329338	57.61	1.61	7	23.42	204	1	1

Accession: code of protein in database UniProt

Description: Protein name

No information: The proteins that not has GO information in UniProt Database with any other similarity with model plants, referent to same proteina at present work

Coverage (%): the percent of the residues in each protein sequence that have been identified

Max fold change: how many times the proteins is more abundant in relation at control

#Unique: The number of peptide sequences unique to a protein group.

#Peptides: The number of distinct peptide sequences in the protein group.

Length: number of amino acids in the canonical sequence displayed by default in the entry

GN: gene name (N/A: no annotated); **EC number:** enzyme code

TABELA S3. PROTEÍNAS COM ABUNDÂNCIA AUMENTADA NA INTERAÇÃO SUSCETÍVEL INOCULADO:CONTROLE.

Accession	Description	Coverage (%)	Max fold change	Mass (Da)	Length	#Peptides	#Unique
ENERGETIC METABOLISM							
<i>Metabolic Process</i>							
<i>Glycolytic/glucolysis and gluconeogenesis</i>							
A0A0D3CWB1	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase Gn=COG0212	6	1.514743674	39.346	352	2	2
A0A0D3APN7	Anthranilate partial	6	1.792034859	65.143	596	3	3
A0A0D3A0U9	Fructose-bisphosphate aldolase Gn=N/A (EC:4.1.2.13)	58	1.757947316	42.962	398	34	2
A0A0D3DIE9	Fructose-bisphosphate aldolase Gn=N/A (EC:4.1.2.13)	58	1.70723989	43.064	398	34	2
A0A0D3C8I5	Cysteine desulfurase chloroplastic Gn=NFS2 (EC 2.8.1.7)	2	2.066700007	50.786	463	1	1
A0A0D2ZZ40	Carboxylesterase 13 Gn=CXE13	9	1.683575424	17.015	152	1	1
A0A0D3E3Z1	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunidade beta, mitochondrial Gjn=N/A (EC 6.2.1.5)	20	1.657346094	45.242	421	7	1
A0A0D3C0Y4	Triosephosphate chloroplastic Gn=TIM (EC 5.3.1.1)	50	2.022388727	37.999	357	18	3
A0A0D3DSW6	Uracil chloroplastic -like	8	1.580179804	31.304	289	2	2
<i>Lipid and Fatty Acid Biosynthesis</i>							
A0A0D3E253	Bifunctional riboflavin biosynthesis RIBA chloroplastic Gn=RIBA1	4	1.61906832	56.767	521	2	2
<i>Biosynthetic Process</i>							
A0A0D3BBA2	Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO2 isoform X1 Gn=N/A	64	1.53389684	40.409	367	23	2
A0A0D3B530	Sucrose-phosphatase 2 Gn=SPP2 (EC 3.1.3.24)	6	1.595962599	48.017	424	3	3
Aminoacid Metabolism							
A0A0D3DWN7	2-isopropylmalate synthase chloroplastic Gn=IPMS2 (EC 2.3.3.13)	5	1.538097634	64.65	599	2	1
A0A0D3DRN5	Branched-chain-amino-acid aminotransferase Gn=N/A (EC 2.6.1.42)	2	1.506356625	44.545	411	1	1
A0A0D3DUU3	Cysteine synthase Gn=N/A (EC 2.5.1.47)	18	1.681981185	41.079	379	6	6
A0A0D3BR82	Diaminopimelate chloroplastic	8	1.821707644	39.835	364	2	2
HISX_BRAOC	Histidinol dehydrogenase, chloroplastic Gn=HDH (EC 1.1.1.23)	2	1.517888175	50.959	469	1	1
A0A0D3BZU4	Imidazole glycerol phosphate synthase chloroplastic Gn=HISN4	4	1.518356175	63.355	584	2	2
A0A0D3BD95	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Gn=N/A (EC 5.2.1.8)	8	1.719744163	61.138	550	4	4
A0A0D3A280	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase chloroplastic Gn=DHS1 (EC 2.5.1.54)	15	1.532896267	56.594	508	7	5

Continuation

Accession	Description	Coverage (%)	Max fold change	Mass (Da)	Length	#Peptides	#Unique
PROTEIN BIOSYNTHESIS, FOLDING, ASSEMBLY, FATE AND DEGRADATION							
A0A0D3CVM1	D-glycerate 3- chloroplastic -like Gn=GLYK	27	1.638083304	51.464	458	9	2
A0A0D3BTP6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) Gn=CYP ROT1 (EC 5.2.1.8)	17	1.671732013	21.728	201	4	2
A0A0D3C510		6	1.588139994	27.067	244	1	1
A0A0D3BWC2		41	1.602851689	28.467	261	8	3
A0A0D3DAR1	Heat shock protein 83-like Gn=HSP83-1	26	1.651258401	89.102	783	15	1
A0A0D3DEC3	Importin subunidade alfa-2-like Gn=N/A	8	1.551931891	65.92	597	3	1
A0A0D3DBA0	Proteasome subunidade beta type (EC 3.4.25.1)	8	1.758069045	29.713	274	2	2
A0A0D3E636	Proteasome subunidade alfa type (EC 3.4.25.1)	19	1.519103838	30.376	280	4	4
Ubiquitination process							
A0A0D3A759	SUMO-conjugating enzyme UBC9-like Gn=UBC9 (EC 2.3.2.-)	7	1.792504999	16.539	148	2	2
Translation, pos-translational and Transduction process							
A0A0H3XZT6	50S ribosomal protein L14, chloroplastic Gn=rpl14	30	1.656743061	13.585	122	3	3
A0A0D3DXD6	60S ribosomal L10-1	5	1.95037854	24.839	220	1	1
A0A0D3ACH8	60S ribosomal L30-1	29	2.016795602	17.132	154	3	3
A0A0D3BW18	Carotenoid 9,10(9,10)-cleavage dioxygenase 1 Gn=N/A	18	1.5122106	92.553	832	12	12
A0A067ZYQ0	Elongation factor 1-alfa 1 Gn=EF1a	34	1.5854505	13.509	123	4	1
A0A0D3CLW2	Elongation factor P (EF-P) family Gn=N/A	25	1.582190512	25.821	235	5	5
A0A0D3C5D1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunidade alfa-like	4	1.822303558	38.721	343	1	1
A0A0D3AEE9	Lysine--tRNA ligase (EC 6.1.1.6)	9	1.890473521	70.015	618	6	6
A0A0D3BW68	Peptide chain release factor chloroplastic -like Gn=APG3	9	1.576949285	47.655	422	3	3
PHOTOSINTNESIS, PHOTORESPIRATION AND CHLOROPLASTIC PROCESS							
A0A0D3AHD4	Chlorophyll a-b binding protein CP29.1, chloroplastic Gn=N/A	10	2.119087752	31.273	288	2	2
A0A0D3BQK6	Fotosintético NDH subunidade of lumenal location 1, chloroplastic Gn=PNSL1	16	2.326607352	26.918	237	3	3
A0A0D3CSR1	Peptide chain release factor PrfB1, chloroplastic isoform X1 Gn=PRFB1	2	1.886291015	50.2	450	1	1
A0A0H3Y354	Photosystem I iron-sulfur center Gn=psaC (EC 1.97.1.12)	53	1.922584598	9.038	81	4	4
A0A191SEV6	Photosystem II CP43 reaction center protein Gn=psbC	12	2.82050861	51.868	473	4	1
A0A191SEU8	Photosystem II D2 protein Gn=psbD (EC 1.10.3.9)	12	1.614475828	39.548	353	3	2
A0A0D3DA03	Probable inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase Gn=At1g66830	1	2.284886774	81.653	747	1	1

Continuation

Accession	Description	Coverage (%)	Max fold change	Mass (Da)	Length	#Peptides	#Unique
PHOTOSINTNESIS, PHOTORESPIRATION AND CHLOROPLASTIC PROCESS							
A0A0D3AZG3	SLOW GREEN chloroplastic Gn=SG1	4	1.860939454	35.186	309	1	1
A0A0D3E2E7	Thioredoxin-like protein AAED1, chloroplastic Gn= AhpC	9	1.694303812	28.387	262	2	2
A0A0H3XYM2	Cytochrome f Gn=petA	48	1.665562963	35.389	320	16	16
A0A0D3AI64	Porphobilinogen deaminase, chloroplastic -like Gn=N/A	28	1.605011404	40.703	380	9	1
A0A0D3CVI5	Glyoxylate hydroxypyruvate reductase A HPR2 Gn=HPR 2 (EC 1.1.1.79) (EC 1.1.1.81)	7	1.837143074	34.372	313	2	2
A0A0D3A658	Magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase Gn=CHLM (EC 2.1.1.11)	19	1.584617156	33.855	313	4	4
A0A0D3A6Y3	Protochlorophyllide reductase B chloroplastic Gn=PORB (EC 1.3.1.33)	38	1.514626626	25.271	235	8	2
A0A0D2ZQG6	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunidade (chloroplast) Gn=N/A	59	3.371036699	42.68	381	63	1
A0A0D3C4J2	Cell division protein FtsZ homolog 2-1, chloroplastic isoform X2	17	1.501583935	49.578	473	6	1
A0A0D3C008	Ferredoxin-thioredoxin reductase, catalytic chain Gn=N/A (EC:1.8.7.2)	17	1.689404119	16.097	144	2	2
DESEASE/DEFENSE RESPONSE							
A0A0D3BZV5	AIG2-like protein Gn=AIG2L (EC 2.3.2.-)	16	1.914120974	19.249	166	2	2
A0A0D3A222	Aldehyde dehydrogenase family 3 member chloroplastic isoform X2 Gn=LOC106315472	2	1.504443905	65.396	596	1	1
A0A0D3CQL2	Lectin At1g53070	10	1.660257866	30.759	275	3	3
A0A0D3A664	Peptide methionine sulfoxide reductase Gn=MSR	30	1.519007401	28.395	256	6	6
A0A0D3C4Z2	Peroxidase (EC 1.11.1.7)	4	1.724085826	38.929	350	1	1
D1MWF5	Pheophorbide a oxygenase Gn=BoPAO	3	2.728386783	33.964	299	1	1
A0A0D3CPI3	Polyadenylate-binding protein Gn=PABP	5	1.588165506	70.971	653	2	2
A0A0D3A3R8	Prohibitin-1- mitochondrial Gn=PHB1	17	2.036049932	32.049	290	4	1
A0A0D3C7E7	Prohibitin-2 mitochondrial-like Gn=PHB2	20	1.660840522	31.847	288	5	2
A0A0D3DB82	Prohibitin-4, mitochondrial Gn=PHB4	27	1.893854416	30.368	278	7	2
A0A0D3BJ77	Protein DETOXIFICATION (Multidrug and toxic compound extrusion protein)	1	1.647364232	87.215	805	1	1
A0A0D3CLB6	Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	12	2.341908533	25.433	231	3	1
A0A0D3EB42	Thiamine thiazole synthase, chloroplastic (Thiazole biosynthetic enzyme) Gn=THI1	27	1.832069623	37.018	352	8	8
SIGNALING PATHWAY							
A0A0D3CGF5	14-3-3-like protein GF14 phi Gn=GRF4	23	1.820275092	30.046	265	8	1

								Continuation
Accession	Description	Coverage (%)	Max fold change	Mass (Da)	Length	#Peptides	#Unique	
CELL HOMEOSTASIS AND ORGANIZATION								
A0A0D3AYC6	21 kDa protein-like	6	1.869605688	45.042	405	2	2	
A0A0D3B3D4	65-kDa microtubule-associated 1	2	2.218023755	54.99	483	1	1	
A0A0D3DJ59	ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH chloroplastic	44	1.647209094	73.87	694	24	2	
A0A0D3E4M2	Bifunctional dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	8	2.013646466	33.221	297	2	2	
A0A0D3E5T6	Haloacid dehalogenase-like hydrolase family	4	1.671669035	114.72	1056	5	5	
A0A0D3DZ53	Thioredoxin M- chloroplastic	19	1.989834343	19.665	180	2	1	
A0A0D3A3B8	Threonine synthase chloroplastic	23	1.540488348	57.796	525	10	4	
TRANSPORT								
A0A191SEV9	ATPase beta subunidade (chloroplast) (EC 3.6.3.14)	70	3.330830472	53.816	498	40	1	
A0A0D3D022	Calcium-dependent kinase 2-like	25	1.930086885	63.104	566	10	3	
A0A0D3BLE3	Coatomer subunidade gamma	4	1.538896613	98.366	886	2	2	
A0A0D3BAL7	mitochondrial dicarboxylate tricarboxylate transporter DTC	6	1.72411157	104.666	943	4	4	
A0A0D3AK03	Ribosomal L14 (chloroplast)	48	1.524007458	32.01	299	10	10	
A0A0D3C730	Translocase of chloroplast chloroplastic (EC 3.6.5.-)	11	1.580604854	33.089	298	3	3	
A0A0D3C2Z6	Transport SEC13 homolog B-like	5	1.581231206	27.982	261	1	1	
CELL MOVIMENT								
A0A0D3AKV1	Actin-depolymerizing factor 3-like	43	2.190319695	15.927	139	5	1	
A0A0D3B2I8	Actin-depolymerizing factor 3-like	43	2.067249549	15.955	139	5	1	
A0A0D3CTC6	Myosin heavy chain, non-muscle	1	1.818944636	182.857	1594	1	1	
NO G.O INFORMATION								
A0A0D3BZ09	3-hydroxyisobutyryl- hydrolase mitochondrial	5	1.633731603	45.919	423	2	2	
A0A0D3AYA5	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunidade	10	1.582374273	26.103	241	2	2	
A0A0D3BZ97	DNA-binding SMUBP-2	1	2.522893238	105.351	961	1	1	
A0A0D3D059	Germin 1	18	2.130620016	21.565	207	5	5	
A0A0D3BC94	Glutathione S-transferase mitochondrial-like	4	1.654784717	30.312	266	1	1	
A0A0D3D3Q6	Histone -like	16	1.717944596	18.996	164	3	3	
A0A0D2ZRH4	Lactoylglutathione lyase isoform X2	6	1.667510712	15.022	129	1	1	
A0A0D3DH75	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily	4	1.943214764	35.479	330	1	1	
A0A0D3B024	Polygalacturonase inhibitor 2-like	2	3.094477843	38.297	342	1	1	

Continuation

<i>Accession</i>	<i>Description</i>	<i>Coverage (%)</i>	<i>Max fold change</i>	<i>Mass (Da)</i>	<i>Length</i>	<i>#Peptides</i>	<i>#Unique</i>
NO G.O INFORMATION							
A0A0D3BPN7	PREDICTED: protein LOC106339338	12	1.615535886	53.974	485	5	5
A0A0D3BP79	PREDICTED: protein LOC106341664	0	2.730145197	263.689	2340	1	1
A0A0D3DGT1	S-adenosyl-L-methionine-dependent superfamily	3	2.676323207	39.571	352	1	1
A0A0D3A5J3	Short-chain dehydrogenase TIC chloroplastic	3	1.609540379	39.935	367	1	1
A0A0D3A8N8	Trans-2-enoyl- mitochondrial	14	1.764766367	43.151	395	4	4
A0A0D3EHG5	Tropinone reductase homolog At5g06060-like	11	1.758497819	27.971	262	3	2

Accession: code of protein in database UniProt

Description: Protein name

No information: The proteins that not has GO information in UniProt Database with any other similarity with model plants, referent to same protein at present work

Coverage (%): the percent of the residues in each protein sequence that have been identified

Max fold change: how many times the proteins is more abundant in relation at control

#Unique: The number of peptide sequences unique to a protein group.

#Peptides: The number of distinct peptide sequences in the protein group.

Length: number of amino acids in the canonical sequence displayed by default in the entry

GN: gene name (N/A: no annotated);

EC number: enzyme code

TABELA S4. PROTEÍNAS COM ABUNDÂNCIA DIMINUÍDA NA INTERAÇÃO SUSCETÍVEL INOCULADO:CONTROLE.

Accession	Description BlatoGo	Score	Coverage (%)	Max fold change	Mass (Da)	Length	#Peptides	#Unique
METABOLISM								
<i>Metabolic Process</i>								
A0A0D3B4N7	3-ketoacyl- thiolase peroxisomal	172.58	47	1.715906654	48,546	462	17	4
A0A0D3BSK2	3-ketoacyl- thiolase peroxisomal	1032.03	55	2.065556063	48,652	463	18	5
A0A0D3CN92	6-phosphogluconate decarboxylating 3 (EC 1.1.1.44)	18.43	33	5.539904608	53,785	488	14	11
A0A0D3CE12	Adenine phosphoribosyltransferase chloropastic	130.44	31	1.581063922	19,957	185	4	4
C9EH44	Catalase (EC 1.11.1.6)	1667.29	66	1.572450047	56,690	492	31	1
A0A0D3B6J8	Endoquitinase básica CHB4-like	26.22	6	12.19413988	30,076	278	1	1
A0A0D3BSL1	Fructose-1,6- cytosolic	25.89	38	28.35174358	32,276	292	7	1
A0A0D3C6Q7	Fumarate hydratase mitochondrial	69.18	5	1.703624683	55,264	509	2	2
A0A0D3BXB6	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase-like	368.37	31	2.831036621	41,076	365	8	8
A0A0D3A1T5	Isocitrate dehydrogenase [NAD] regulatory subunidade mitochondrial	122.01	11	1.659513332	45,259	416	4	2
A0A0D3BMU9	Malate dehydrogenase mitochondrial (EC 1.1.1.37)	38.37	60	14.43387378	39,656	373	20	1
A0A0D3DRJ8	Peroxidase 34-like (EC 1.11.1.7)	264.47	17	1.509218435	38,861	354	6	6
A0A0D3BBS5	S-adenosylmethionine synthase 2-like (EC 2.5.1.6)	323.04	42	1.546091648	42,859	393	12	3
<i>Glycolytic/glycolysis and gluconeogenesis</i>								
A0A0D3C4L8	Bifunctional enolase 2 transcriptional activator	731.36	61	1.564783926	39,231	366	17	2
<i>Biosynthetic Process</i>								
A0A0D3CVG9	2-methyl-6-phytyl-1,4-hydroquinone chloropastic	299.63	23	1.759624699	37,932	339	9	9
A0A0D3A5M6	Cystine lyase COR13-like	167.94	17	1.600109818	47,180	424	5	4
A0A0D3C3H0	Fructokinase-1	41.25	8	1.608748517	35,248	326	1	1
A0A0D3DCA0	GDP-mannose 3,5-epimerase	154.04	13	1.641995121	48,661	432	5	5
A0A0D3E5R1	Prolycopene chloropastic	32.67	4	13.79101302	62,116	577	1	1
Aminoacid Metabolism								
A0A0D3A332	Glutamine amidotransferase YLR126C	22.38	5	1.866447165	28,413	250	1	1
A0A0D3BZG9	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-1 (EC 6.3.1.2)	131.48	36	1.936721301	45,329	409	8	1
A0A0D3A5F0	Gamma-glutamylcysteine synthetase	286.96	19	1.719778237	57,927	514	7	7
A0A0D3A152	Serina hydroxymethyltransferase mitochondrial (EC 2.1.2.1)	295.58	69	1.597407042	57,261	517	38	5
A0A0D3CZT9		34.47	25	3.642839231	57,155	515	11	2

Continuation

Accession	Description BlatoGo	Score	Coverage (%)	Max fold change	Mass (Da)	Length	#Peptides	#Unique
Aminoacid Metabolism								
A0A0D3EEL1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1-like	110.07	28	4.05348488	82,606	745	19	1
A0A0D3BJI3	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2 homolog mitochondrial	118.48	13	1.676384428	48,750	447	3	3
PROTEIN BIOSYNTHESIS, FOLDING, ASSEMBLY, FATE AND DEGRADATION								
A0A0D3AL95	26S protease regulatory subunidade 6B homolog	90.81	13	2.23176032	45,473	404	4	3
A0A0D3A4W0	BAG family molecular chaperone regulator 7-like	31.95	4	80.87928813	59,229	511	1	1
A0A0D3CJV9	Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family	181.43	16	1.591261137	50,012	462	5	5
A0A0D3AK98	T-complex 1 subunidade beta-like	105.02	12	3.016966872	57,303	527	4	4
A0A0D3E032	Translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts 159	41.66	2	2.149496873	166,661	1563	2	2
Translation, pos-translational and Transduction process								
A0A0D3A622	31 kDa chloropastic	520.17	35	2.052183	33,255	304	10	1
A0A0D3AFK9	40S ribosomal S3a	871.57	31	1.509534337	58,869	533	17	4
A0A0D3CL16	40S ribosomal S5-1-like	218.02	28	4.400263353	22,977	207	6	6
A0A0D3B6F7	50S ribosomal L3- chloropastic	111.62	20	3.441421237	29,028	269	4	4
A0A0D3CLN1	60S ribosomal L4-1-like	349.43	23	1.884313065	44,643	406	6	6
A0A0D3BDA5	60S ribosomal L5-1-like	431.39	42	1.693095703	34,617	302	10	10
A0A0D3CEL8	Glycine--tRNA ligase mitochondrial	101.36	6	1.919195064	77,276	690	3	3
A0A0D3E141	Histone	31.92	14	2.552933591	16,048	153	2	1
A0A0D3C8T6	Leucine--tRNA cytoplasmic	24.36	2	36.65408959	132,514	1171	1	1
PHOTOSINTNESIS, PHOTORESPIRATION AND CHLOROPLASTIC PROCESS								
A0A0D3AQH8	Geranylgeranyl diphosphate reductase, chloropastic Gn=CHLP (EC 1.3.1.83)	273.12	24	1.859114709	51,815	466	7	7
A0A0D3B7J6	Thylakoid lumenal 19 kDa protein, chloropastic Gn=TEL3S	107.15	21	1.619860023	25,830	237	3	3
A0A075M3S9	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain Gn=rbcS (EC 4.1.1.39)	197.12	71	6.711520069	19,865	177	25	2
A0A191SEW5	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain Gn=rbcL (EC:4.1.1.39)	160.34	72	5.467007483	52,952	479	109	3

Continuation

Accession	Description BlatoGo	Score	Coverage (%)	Max fold change	Mass (Da)	Length	#Peptides	#Unique
PHOTOSINTNESIS, PHOTORESPIRATION AND CHLOROPLASTIC PROCESS								
A0A0D3BR44	Aldo-keto reductase family 4 member C8 Gn=AKR4C8 (EC 1.1.1.-)	112.32	15	1.957736399	34,813	311	3	3
A0A0D3DYQ1	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloropastic isoform X1 Gn=PSBP1	931.01	48	3.648495746	28,187	263	18	4
A0A0D3BZB9	Phosphoglycolate phosphatase 1B, chloropastic Gn=PGLP1B (EC 3.1.3.18)	123.36	22	3.63398285	39,569	359	4	4
DESEASE/DEFENSE RESPONSE								
Q43404	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	74.21	10	2.099027782	36,388	320	2	2
A0A0D3B249	20 kDa chloropastic	31.41	53	22.24993228	26,776	253	13	1
A0A0D3A7F3	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunidade-related chloropastic -like	123.44	16	1.57393992	32,991	301	4	4
A0A0D3DDE4	Calcium sensing chloropastic	604.63	38	1.762782139	41,367	388	11	11
A0A0D3DV31	Calvin cycle CP12- chloropastic	63.4	38	2.493483822	14,137	130	2	2
A0A0D3CQU9	Epithiospecifier -like	230.99	29	1.560587383	37,745	343	6	5
A0A0D3CKB5	GDSL esterase lipase ESM1	31.19	18	3.51853199	42,947	388	4	1
A0A0D3B244	Germin subfamily 3 member 3	118.37	43	1.608364685	21,885	211	12	1
A0A0D3CVZ5	Glutathione S-transferase U19	262.28	31	1.750814529	25,658	219	5	5
A0A0D2ZUH9	Glyoxylate succinic semialdehyde reductase 1	399.21	45	2.224646677	34,841	323	10	10
A0A0D3DVQ0	Leucine aminopeptidase 1	103.24	22	1.941817397	54,222	519	8	2
A0A0D3BMP0	mitochondrial-processing peptidase subunidade alfa-1	250.51	15	1.524953071	54,086	502	7	1
A0A0D2ZVR5	Nascent polypeptide-associated complex subunidade alfa 4	66.88	26	4.314828378	13,779	128	2	2
A0A0D3A9D2	Peroxidase 34 (EC 1.11.1.7)	148.94	15	2.067260507	38,412	349	3	3
A0A0D3E1R0	Quinone oxidoreductase	87.36	13	2.11336134	42,433	395	3	3
A0A0D3CMR7	Ribose-5-phosphate isomerase chloropastic	158.81	52	1.934707649	29,283	275	15	3
A0A0D3DLN8	Selenium-binding 1	90.6	9	1.501363722	53,739	487	3	2
A0A0D3EHU5	Sulfase redutase assimilatória (ferredoxin) chloropastic	64.35	17	2.270283311	72,312	645	7	2
TMT2_BRAOL	Thiocyanate methyltransferase 2 (EC 2.1.1.n4)	37.56	8	2.549264291	25,017	226	1	1

Continuation

Accession	Description BlatoGo	Score	Coverage (%)	Max fold change	Mass (Da)	Length	#Peptides	#Unique
CELL HOMEOSTASIS AND ORGANIZATION								
A0A0D3CLL4	Cell division control 48 homolog A	506.45	25	1.962294627	89,522	808	16	16
A0A0D3D1E1	Disulfide isomerase-like 1-2 (EC 5.3.4.1)	140.37	18	1.774015372	55,782	510	5	5
A0A0D3D7M0	Disulfide isomerase-like 1-1 (EC 5.3.4.1)	38.22	12	2.496017524	56,039	504	3	2
A0A0D3DQU3		139.75	15	1.793045552	55,726	500	4	3
A0A0D3C7P2	Disulfide-isomerase like 2-2	52.27	11	2.914799364	47,479	438	2	2
TRANSPORT								
A0A0D3E873	ATP synthase gamma chain chloroplastic	37.87	54	11.41753287	41,191	375	25	1
NLTPB_BRAOT	Lipid transfer	46.55	14	2.070840954	11,873	117	1	1
A0A0D3AE96	Nascent polypeptide-associated complex subunidade alfa 1	30.06	18	11.7118724	21,847	202	3	1
A0A0D3BAX8	Nascent polypeptide-associated complex subunidade alfa 1	159.56	28	2.098796966	21,797	201	5	3
NLTPA_BRAOT	Non-specific lipid-transfer A	109.25	31	2.128410025	11,911	118	3	3
REPRODUCTOTION PROCESS								
A0A0D3CW19	Glycine--tRNA ligase chloroplastic partial	28.92	2	13.87416512	117,304	1044	1	1
NO G.O INFORMATION								
A0A0D3C872	AC067971_24ESTs gb	78.48	8	1.96959737	42,725	385	2	2
A0A0D3BK51	Ankyrin repeat domain-containing 2A-like	70.53	13	2.197762814	35,904	335	2	2
A0A0D3CA22	Apyrase 5	35.09	6	9.951586854	51,808	470	1	1
A0A0D3B743	Calvin cycle CP12- chloroplastic -like	76.56	38	2.352943144	13,559	125	3	3
A0A0D3DPH1	Polyamine aminopropyl partial	66.84	11	2.22818029	37,892	338	2	2
A0A0D3EGY8	PREDICTED: protein LOC106422732	43.83	32	2.015868626	15,036	130	2	2
A0A0D3AJG1	Rubredoxin family	266.54	35	1.522894421	28,283	268	7	7
A0A0D3DJA5	Tropinone reductase homolog At1g07450	32.38	6	3.765365195	28,025	262	1	1

Accession: code of protein in database UniProt

Description: Protein name

No information: The proteins that not has GO information in UniProt Database with any other similarity with model plants, referent to same protein at present work

Coverage (%): the percent of the residues in each protein sequence that have been identified

Max fold change: how many times the proteins is more abundant in relation at control

#Unique: The number of peptide sequences unique to a protein group.

#Peptides: The number of distinct peptide sequences in the protein group.

Length: number of amino acids in the canonical sequence displayed by default in the entry

GN: gene name (N/A: no annotated);

EC number: enzyme code

APENDICE 4 – ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

Referente ao projeto de Doutorado

[doi: 10.3389/fpls.2019.00414](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00414)

Referente ao projeto de Mestrado

doi.org/10.1002/pmic.201700086

Co-autoria durante o Doutorado:

doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.06.002

doi.org/10.1002/pmic.201900082

Referente ao projeto de Iniciação científica

[doi 10.1007/s10886-016-0665-3](https://doi.org/10.1007/s10886-016-0665-3)

ARTIGO SUBMETIDO: COAUTORIA

MOLE-D-19-00671 - Submission Notification to co-author  

Caixa de entrada x

Molecular Biology Reports (MOLE.. dom, 24 de mar 13:51 (há 5 dias)   

 para eu ▾

Re: "Application of a novel Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) system for rapid detection of imidazolinone herbicide-tolerant GM crops"

Full author list: Vanessa Olinto dos Santos Evangelista; Regina Maria Santos Amorim; Niday Aline Nunes Fernandes; Marcos Fernando Basso; Liz Nathalia Ibarra Duarte; Peyman Habibi; Guilherme Souza Prado; Cristiane dos Santos; Angela Mehta; Maria Fátima Grossi de Sá

Dear Msc dos Santos,

We have received the submission entitled: "Application of a novel Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) system for rapid detection of imidazolinone herbicide-tolerant GM crops" for possible publication in Molecular Biology Reports, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr. Vanessa Olinto dos Santos Evangelista who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Molecular Biology Reports

PRÊMIO (2017)

TALENTO ESTUDANTIL EMBRAPA – 1º LUGAR, MELHOR TRABALHO DE PÓS-GRADUAÇÃO – ÁREA PLANTAS

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS: PALESTRANTE (SEMINÁRIO)

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS: PALESTRANTE (SEMINÁRIO)

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS: PALESTRANTE (WORKSHOP)

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS: MINISTRAÇÃO DE MINICURSO

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS: PALESTRANTE

PARTICIPAÇÃO EM EVENTO INTERNACIONAL

RESUMO-POSTER

"New Frontiers in Plant Biology"
Centre for Plant Biotechnology and Genomics UPM-INIA – Madrid, España
June 15th -17th, 2016

XIII Reunión de Biología Molecular de Plantas
Palacio de Exposiciones y Congresos "Ciudad de Oviedo". Oviedo, España
22/06/2016 - 24/06/2016

OUVINTE

VII Jornadas de divulgación de la investigación en biología molecular celular, genética y biotecnología
Universidade de Córdoba, Espanha

PARTICIPAÇÃO EM EVENTO NACIONAL

RESUMO E POSTER

23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu. 23rd IUBM Congress 44th Annual Meeting of SBBq, 2015.

RESUMO E POSTER

**VI Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas
Centro de Artes e Convenções da UFOP. Ouro Preto - MG
Resistance analysis of Brassica oleracea var. capitata to *Xanthomonas*
Congresso de Biotecnologia 2018**

RESUMO E POSTER

7th Conference on Mass Spectrometry and 4th BrProt 2018

CURSOS

Embrapa: Microscopia ótica e confocal

UFRJ: Proteômica aplicada

BrProt: Proteômica Top-Down