

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Laura Santos Martins Costa**

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL EM PLANTAS TRANSGÊNICAS  
DE *Nicotiana benthamiana* E TESTES DA RESISTÊNCIA EM  
*Solanum tuberosum* INDUZIDA PELO MESMO GENE CONTRA  
*Pectobacterium atrosepticum***

Dissertação

Juiz de Fora

2019

**LAURA SANTOS MARTINS COSTA**

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL EM PLANTAS TRANSGÊNICAS  
DE *Nicotiana benthamiana* E TESTES DA RESISTÊNCIA EM  
*Solanum tuberosum* INDUZIDA PELO MESMO GENE CONTRA  
*Pectobacterium atrosepticum***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

**Orientador:**

**Dr. Marcelo de Oliveira Santos**

**Co-orientador:**

**Dr. Leonardo Ramos Quellis**

Juiz de Fora, MG

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Costa, Laura Santos Martins.

Proteômica diferencial em plantas transgênicas de *Nicotiana benthamiana* e testes da resistência em *Solanum tuberosum* induzida pelo mesmo gene contra *Pectobacterium atrosepticum* / Laura Santos Martins Costa. -- 2019.

88 f. : il.

Orientador: Marcelo de Oliveira Santos

Coorientador: Leonardo Ramos Quellis

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Proteômica. 2. Domínio B. 3. *Nicotiana benthamiana*. 4. *Pectobacterium atrosepticum*. I. Santos, Marcelo de Oliveira, orient. II. Quellis, Leonardo Ramos, coorient. III. Título.

**Laura Santos Martins Costa**

**Proteômica Diferencial Em Plantas Transgênicas De *Nicotiana benthamiana* E Testes Da Resistência Em *Solanum tuberosum* Induzida Pelo Mesmo Gene Contra *Pectobacterium atrosepticum***

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso Pós-graduação em Ciências Biológicas, área Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Santos  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Leonardo Ramos Quellis  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
(Co-Orientador)

---

Prof. Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada  
Universidade Católica de Brasília (UCB), Brasília, DF  
(Membro Externo)

---

Profa. Dra. Eveline Gomes Vasconcelos  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
(Membro Interno)

---

Prof. Dr. Jorge Fernando Pereira  
Embrapa Gado de Leite  
(Membro externo)

---

Prof. Dr. Saulo Marçal de Souza  
Universidade Federal de Juiz de Fora  
(Membro interno)

## AGRADECIMENTOS

Não posso deixar de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Marcelo de Oliveira Santos, por toda a paciência, e empenho com que sempre me orientou neste trabalho.

Ao Doutor Leonardo, meu co-orientador, obrigado por todos os conhecimentos que obtive com você, além de todas as ajudas pensando nos experimentos. E obrigada pela confiança de seguir um trabalho tão importante para você

Aos colegas do laboratório de Engenharia Genética de Plantas, mesmo alguns de vocês não estando mais no laboratório, agradeço o companheirismo e a paciência em pensar nos experimentos juntos e fazê-los acontecer.

Não poderia deixar de agradecer ao Professor Doutor Octavio Luiz Franco, por me aceitar um tempo no seu grupo de pesquisa. Essa pequena participação me fez crescer e amadurecer muitas ideias. Obrigada!

Agradeço também ao Professor Doutor Marcelo Ramada, por toda a paciência comigo, leiga na bioinformática, e com as minhas amostras. A sua torcida de que ia dá certo, e que ia dá tempo foi muito importante.

Agradeço também a todas as ótimas e divertidas amigas que fiz na Universidade Católica pelos meses que passei. Foi uma experiência única! Todas as risadas, os almoços. Vocês me mostraram que nem só de experimento errado vive o mestrado. Espero levar essa amizade para o resto da vida.

Obrigada especialmente aos meu pais, Solange e Sérgio, e ao meu irmão, Gustavo, por todo o apoio mesmo com todos os percalços que passamos juntos nesse período, me fazendo tentar ser o melhor de mim. Sinto-me orgulhosa de poder ter uma família como vocês.

Agradeço à minha família e aos meus amigos que não consegui ver o tanto que eu queria, mas que sempre tiveram respeito e paciência com os meus horários.

Agradeço ao Programa de pós-graduação em Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora por essa oportunidade.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa por todo o mestrado, e a todos os suportes financeiros.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para esse trabalho, e foram muitas. Muito obrigada!!

## RESUMO

O gene sintético DomB, isolado da fração da apirase de batata (*Solanum tuberosum*), apresenta atividade antigênica em animais e confere resistência a plantas de fumo (*Nicotiana benthamiana*) à infecção bacteriana por *Pectobacterium atrosepticum*. No presente trabalho, propusemos a análise proteica diferencial em plantas de *Nicotiana benthamiana* geneticamente modificadas com o gene sintético g2S2-6His-DomB por nanoUPLC-MS<sup>E</sup>. Para esse fim, comparamos o conteúdo proteico da progênie hemizigótica R0 de *N. benthamiana* modificadas geneticamente com o gene ao conteúdo proteico de *N. benthamiana* selvagem, e desses grupos desafiados com *P. atrosepticum*. Além disso, propusemos a avaliação da atividade do mesmo gene em *S. tuberosum* via agroinfiltração. A partir da análise das proteínas tripsinizadas, os resultados sugerem que ocorre a produção de proteínas possivelmente ligadas à sinalização de defesa quando as plantas são submetidas à um desafio com uma fitobactéria, porém devido ao baixo número de identificações, temos como perspectiva repetir os experimentos com um maior número de réplicas. As análises preliminares com a cultivar comercial *Solanum tuberosum* cv. Asterix da expressão transiente do mesmo gene sintético pelo método de infiltração via *Agrobacterium* cepa 3101 contendo o plasmídeo pk7WG2D-gfp-g2S2-6His-DomB, comparada a outro grupo onde houve a co-infiltração com *Agrobacterium* EHA101 contendo TCV-CP, que funciona como um supressor do silenciamento de genes pós-transcricionais, apresentou resultado promissor. Após o quinto dia de agroinfiltração, as folhas de *S. tuberosum* com 5 - 8 semanas foram desafiadas com a bactéria fitopatogênica e observadas por mais sete dias. Ao final desse período observamos que houve uma reação de hipersensibilidade no local de aplicação, mas que tal processo não se expandiu por todo o tecido foliar. O imunoensaio dot-blot sugere a expressão do polipeptídeo p2S26His-DomB nas folhas infiltradas com o plasmídeo e com o TCV-CP. Buscando obter cultivares resistentes a um problema nas culturas de batata, que é a infecção por *P. atrosepticum*, o projeto pode potencialmente adicionar informações sobre os mecanismos de defesa das plantas modificadas geneticamente com o gene g2S2-6His-DomB e propiciar uma melhor ação na produção de plantas transgênicas resistentes a fitopatógenos com o gene sintético DomB.

Palavras-chave: Domínio B. *Nicotiana benthamiana*. Proteômica. *Pectobacterium atrosepticum*. *Solanum tuberosum*.

## ABSTRACT

The DomB synthetic gene isolated from potato (*Solanum tuberosum*) apyrase fraction has demonstrated anti-gene activity in animals and resistance of tobacco (*Nicotiana benthamiana*) plants against *Pectobacterium atrosepticum*. In this work we propose differential proteomic profile analysis in *Nicotiana benthamiana* plants genetically modified with g2S26His-DomB synthetic gene by nanoUPLC-MS<sup>E</sup> tool. We compared the R0 hemizygotic progenie protein content of transgenic *N. benthamiana* with native *N. benthamiana* protein content, and these groups challenged with *P. atrosepticum*. Moreover, we proposed the evaluation of this gene activity in *S. tuberosum* by agroinfiltration. Trypsinized proteins initial analyses suggests that defense signalization proteins were produced by *N. benthamiana*. The preliminary analysis of *Solanum tuberosum* cv. Asterix commercial cultivar of transiently expressing the same quimeric gene by agroinfiltration method using *Agrobacterium* 3101 with pk7WG2D-gfp-g2S2-6His-DomB plasmid, compared to another group where exist co-infiltration with *Agrobacterium* EHA101 containing TCV-CP, that works like a suppressor of silencing of post-transcriptional gene, showed promising results. After the fifth day of agro-infiltration, 5 - 8weeks *S. tuberosum* leaves were, tested with phytopathogenic bacterium and observed for seven days. By the end of this period, a hypersensitivity reaction was observed at application site which did not expanded for the whole leaf tissue. The dot-blot immunoassay suggest that the expression of p2S26His-DomB polypeptide, in infiltrated leaf with plasmid and TCV-CP. To get resistant cultivars against *P. atrosepticum* infection, this work can add information about defensive mechanism of transgenic plants with g2S2-6His-DomB gene and get a better production of transgenic potato plants resistant to phytopathogenic with DomB synthetic gene.

Keywords: B domain. *Nicotiana benthamiana*. Proteomic. *Pectobacterium atrosepticum*. *Solanum tuberosum*



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção de hormônios após o estímulo de um patógeno .....	18
Figura 2	Modelo zigue-zague ilustrando quantitativamente a produção do sistema imune da planta.....	19
Figura 3	Esquema do sistema de secreção do tipo 3 (T3SS) .....	21
Figura 4	Plasmídeo final.....	25
Figura 5	<i>Solanum tuberosum</i> . Vista superior de um vaso com folhas de <i>S. tuberosum</i> no dia da agroinfiltração .....	36
Figura 6	SDS-PAGE 12% de amostras de folhas de <i>N. benthamiana</i> .....	40
Figura 7	Comparação entre os grupos .....	41
Figura 8	Proteínas identificadas em <i>N. benthamiana</i> e separadas de acordo com as funções celulares.....	42
Figura 9	Desafio do tubérculo de <i>Solanum tuberosum</i> cv. Asterix com a fitobactéria .....	44
Figura 10	Avaliação do aspecto fenotípico de folha de <i>S. tuberosum</i> cv. Asterix infiltrada com <i>P. atrosepticum</i> .....	45
Figura 11	Detalhes da infiltração em folhas de <i>S. tuberosum</i> .....	46
Figura 12	Desafio das folhas de batata com <i>P. atrosepticum</i> .....	46
Figura 13	Avaliação da expressão do GFP em folhas de <i>S. tuberosum</i> .....	47
Figura 14	"DOT - BLOT" .....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Produção, área e produtividade de batata no Brasil, entre as décadas de 1960 a 2010 e em 2018 .....	29
----------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ACR	Apyrase conserved region - "regiões conservadas da apirase"
AJ	Ácido Jasmônico
ATP	Adenosina trifosfato
CP	Coat protein - "proteína do capsídeo"
DTT	Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT)
ESI	<i>Electrospray</i>
ET	Etileno
ETI	<i>Effector-Triggered Immunity</i> - "imunidade desencadeada por efetores"
ETS	<i>Effector-Triggered susceptibility</i> - suscetibilidade desencadeada por efetor
GFP	Glu-fibrino peptídeo humano
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GR	Grupo resistente
GRD	Grupo resistente desafiado
GS	Grupo suscetível
GSD	Grupo suscetível desafiado
IAA	<i>Indole-3- acetic acid</i> - ácido indolacético
LB	Luria Bertani
LRR	<i>Leucine-rich repeats</i> - repetições ricas em leucina

mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MES	<i>2- (N- morpholino) ethanesulfonic acid</i>
MS	<i>Murashine and Skoog medium</i>
NB-LRR	<i>Nucleotide binding leucine-rich repeats</i> - "nucleotídeos contendo repetições ricas em leucina"
NTPDase	Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
OD	Optical density - "Densidade óptica"
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> - "Tampão fosfato salino"
PCWDE's	<i>Plant Cell Wall Degrading Enzymes</i>
PMAD	Padrão molecular associado ao dano
PMAM/MAMP	<i>Microbial Associated Molecular Patterns</i> - "padrão molecular associado à microorganismo"
PMAP/PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> - "padrão molecular associado à patógeno"
PTI	<i>Pattern-Triggered Immunity</i> - "imunidade desencadeada por padrões"
R	Resistência
RH/HR	Resposta de Hipersensibilidade
RLK	<i>Receptor-like kinases</i> - "receptor do tipo quinase"
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RUBISCO	Ribulose-1,5- bifosfato carboxilase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T3SS	Sistema de secreção T3

TFA      Ácido trifluoroacético

UV      Ultravioleta

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	16
1.1	FUNCIONAMENTO DO SISTEMA DE DEFESA DE PLANTAS.....	16
1.2	<i>Nicotiana benthamiana</i> COMO PLANTA MODELO PARA ESTUDO DA INTERAÇÃO PLANTA - PATÓGENO.....	21
1.3	FITOBACTÉRIA <i>Pectobacterium atrosepticum</i> COMO CAUSADORA DE "PODRIDÃO - MOLE".....	22
1.4	A APIRASE E O DOMÍNIO B.....	23
1.5	PROTEÔMICA .....	26
1.6	FERRAMENTAS MOLECULARES PARA O ESTUDO PROTEÔMICO .....	27
1.7	<i>Solanum tuberosum</i> COMO MODELO COMERCIAL PARA OS TESTES COM O GENE QUIMÉRICO .....	29
2.	OBJETIVOS .....	31
2.1	OBJETIVO GERAL .....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
3.	METODOLOGIA .....	32
3.1	CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DE PLANTAS <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	32
3.2	ANÁLISE PROTEÔMICA DE PLANTAS DE <i>N. benthamiana</i> R <sub>0</sub> .....	32
3.2.1	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FOLHA PARA ANÁLISE NO ESPECTRÔMETRO.....	32
3.2.2	ESPECTROMETRIA DE MASSA POR nanoUPLC-MS <sup>E</sup> .....	34
3.2.3	PROCESSAMENTO DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA .....	35
3.3	CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DE PLANTAS <i>Solanum tuberosum</i> cv. Asterix PARA OS EXPERIMENTOS DE INFILTRAÇÃO .....	35

3.4	CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DA BACTÉRIA NECROTRÓFICA <i>Pectobacterium atrosepticum</i> E AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA NO TUBÉRCULO .....	36
3.5	EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE QUIMÉRICO g2S2-6His-DomB EM PLANTAS DE <i>Solanum tuberosum</i> cv. Asterix INDUZIDA POR AGROINFILTRAÇÃO .....	37
3.6	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FOLHAS DE <i>S. tuberosum</i> cv. Asterix COM EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE .....	39
3.7	"DOT-BLOT" .....	39
4	RESULTADOS .....	40
4.1	SDS-PAGE 12% DE FOLHAS DE <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	40
4.2	ANÁLISES REALIZADAS A PARTIR DAS ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS.....	41
4.3	INFILTRAÇÃO DE CEPAS DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> TRANSFORMADAS EM FOLHAS DE <i>Solanum tuberosum</i> cv. Asterix E DESAFIO COM A FITOBACTÉRIA <i>Pectobacterium atrosepticum</i> .....	43
4.3.1	VIRULÊNCIA DA <i>Pectobacterium atrosepticum</i> EM <i>Solanum tuberosum</i> cv. Asterix .....	43
4.3.2	AVALIAÇÃO INICIAL DA SUSCEPTIBILIDADE DE <i>Solanum tuberosum</i> cv. Asterix À FITOBACTÉRIA <i>Pectobacterium atrosepticum</i> .....	44
4.3.3	INFILTRAÇÃO DE CEPAS DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> CARREGANDO O CASSETE DE EXPRESSÃO DO GENE DomB EM FOLHAS DE <i>Solanum tuberosum</i> cv. Asterix DESAFIADAS COM A FITOBACTÉRIA <i>Pectobacterium atrosepticum</i> .....	45
4.4	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GFP EM FOLHAS DE <i>Solanum tuberosum</i> .....	46
4.5	"DOT - BLOT" DE AMOSTRAS PROTEICAS DE FOLHAS DE <i>S. tuberosum</i> INFILTRADAS COM O GENE QUIMÉRICO .....	47
5	DISCUSSÃO .....	48
5.1	ANÁLISE PROTEÔMICA .....	48
5.2	EXPRESSÃO TRANSIENTE DO POLIPEPTÍDEO QUIMÉRICO p2S2-6His-DomB EM <i>Solanum tuberosum</i> cv. Asterix INDUZIDA	

	POR AGROINFILTRAÇÃO E DESAFIO COM <i>Pectobacterium atrosepticum</i> .....	51
6	CONCLUSÕES .....	55
7	PERSPECTIVAS .....	56
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57
	APÊNDICE A .....	69
	APÊNDICE B .....	74
	APÊNDICE C .....	77
	APÊNDICE D .....	80
	APÊNDICE E .....	84
	APÊNDICE F .....	86
	APÊNDICE G .....	87
	APÊNDICE H .....	88



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. FUNCIONAMENTO DO SISTEMA DE DEFESA DE PLANTAS

Diferente dos mamíferos, as plantas carecem de um sistema imune adaptativo e possuem apenas a imunidade inata, além de sinais que auxiliam na defesa contra algum ataque (BARI & JONES, 2009). Em um primeiro momento, a planta libera substâncias que podem evitar a progressão da infecção, incluindo ceras, cutinas, deposição de lignina, além de moléculas antimicrobianas (VANETTEN et al., 1994; OSBOURN, 1996; ALIA et al, 2018). Muitos patógenos conseguem ultrapassar essa barreira, o que pode ativar o sistema imune por duas rotas de defesa: ele pode ser desencadeado por padrões moleculares (*pattern triggered immunity*- PTI) ou por efetores (*effector triggered immunity*- ETI) (CHISHOLM et al., 2006).

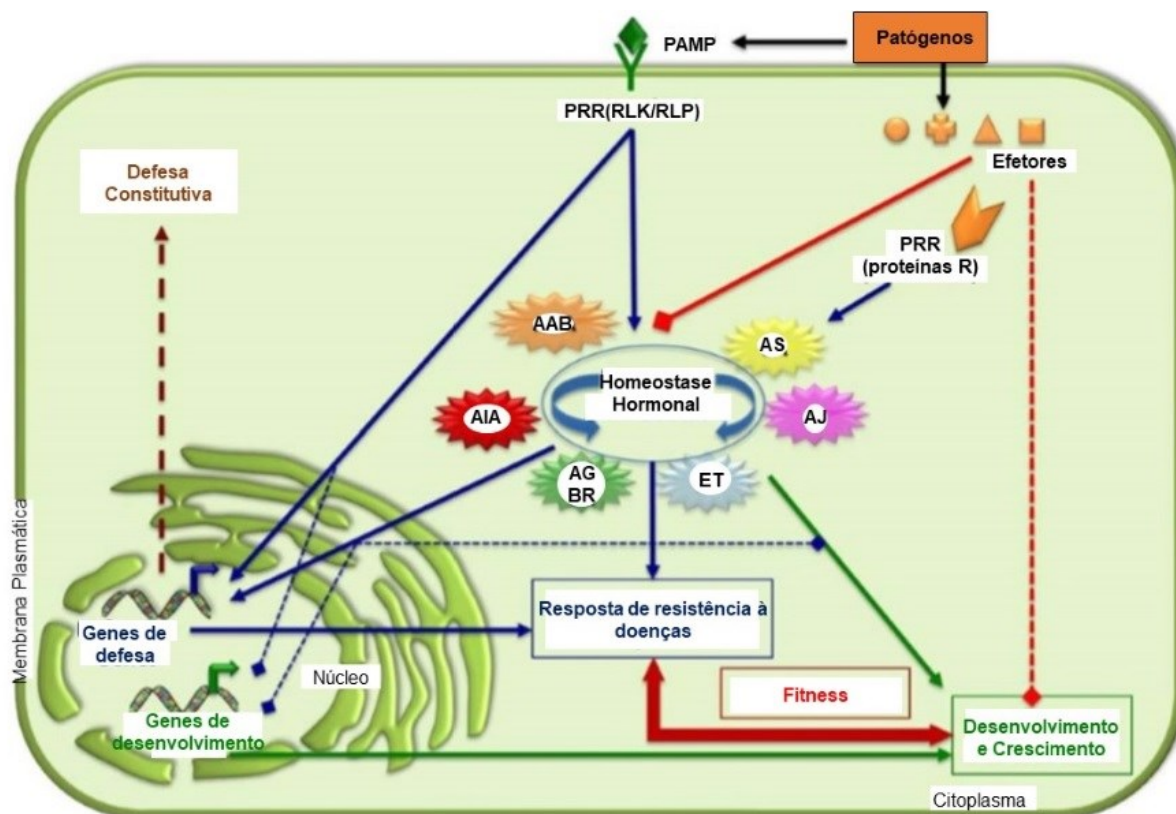
Quando desencadeado por padrões moleculares, estes podem ser padrões associados a patógenos (PMAP); à microorganismos não patogênicos (PMAM); ou aos danos (PMAD), quando são causados por moléculas produzidas a partir da ação de enzimas do patógeno durante o processo de infecção. Um exemplo bem descrito de PMAP é a flagelina bacteriana, que possui um epítipo de 22 aminoácidos (flg22) presente no flagelo, estrutura de locomoção da bactéria, e é reconhecida por uma quinase receptora rica em repetições de Leucina (*leucine rich repeat* - LRR) sintetizada a partir do gene FLS2, caracterizado em *Arabidopsis* (GÓMEZ-GÓMEZ & BOLLER, 2000).

No caso de uma imunidade desencadeada pelo reconhecimento dos padrões, as plantas possuem receptores na superfície da membrana celular, como exemplo os receptores do tipo quinase (RLK) que são domínios extracelulares que reconhecem padrões (PRR) conservados dos patógenos e incitam a imunidade (PTI) na planta; ou internamente, em que existem os receptores intracelulares, como os domínios ricos em repetições de leucina (LRR) que reconhecem as moléculas efetoras e levam à imunidade desencadeada por efetores (ETI) liberados em ataques por pragas ou microorganismos (JONES & DANGL, 2006; SAIJO et al, 2018).

Um conjunto de alterações ocorre na célula vegetal após o reconhecimento desses PAMPs/MAMPs como o influxo de íon  $\text{Ca}^{2+}$ , ativação da via MAP-quinase, ativação de genes de defesa, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), deposição de calose e lignificação da parede celular, fechamento dos estômatos, além da alteração nas concentrações dos hormônios etileno e jasmonato (GRANT & LAMB, 2006; BIGEARD et. al., 2015).

Os hormônios vegetais são pequenas moléculas produzidas em diferentes condições fisiológicas a que a planta está sujeita, seja para defesa contra patógenos ou estresses abióticos. O ácido salicílico, jasmonato e etileno são hormônios chave na imunidade da planta. O ácido salicílico é produzido quando o ataque ocorre com patógenos biotróficos ou hemibiotróficos e também em estresse abiótico. O jasmonato e o etileno são produzidos em maiores quantidades quando o ataque é de um patógeno necrotrófico. Outros fitormônios também são produzidos sob essas condições como as auxinas, o ácido abscísico, citocininas, brassinosterides, além das estrigolactonas, sendo que a relação entre eles pode ser de sinergismo ou antagonismo (FIGURA 1) (GOMEZ-ROLDAN et al. 2008; UMEHARA et al. 2008; DENANCÉ et. al. 2013; BERENS et. al., 2017).

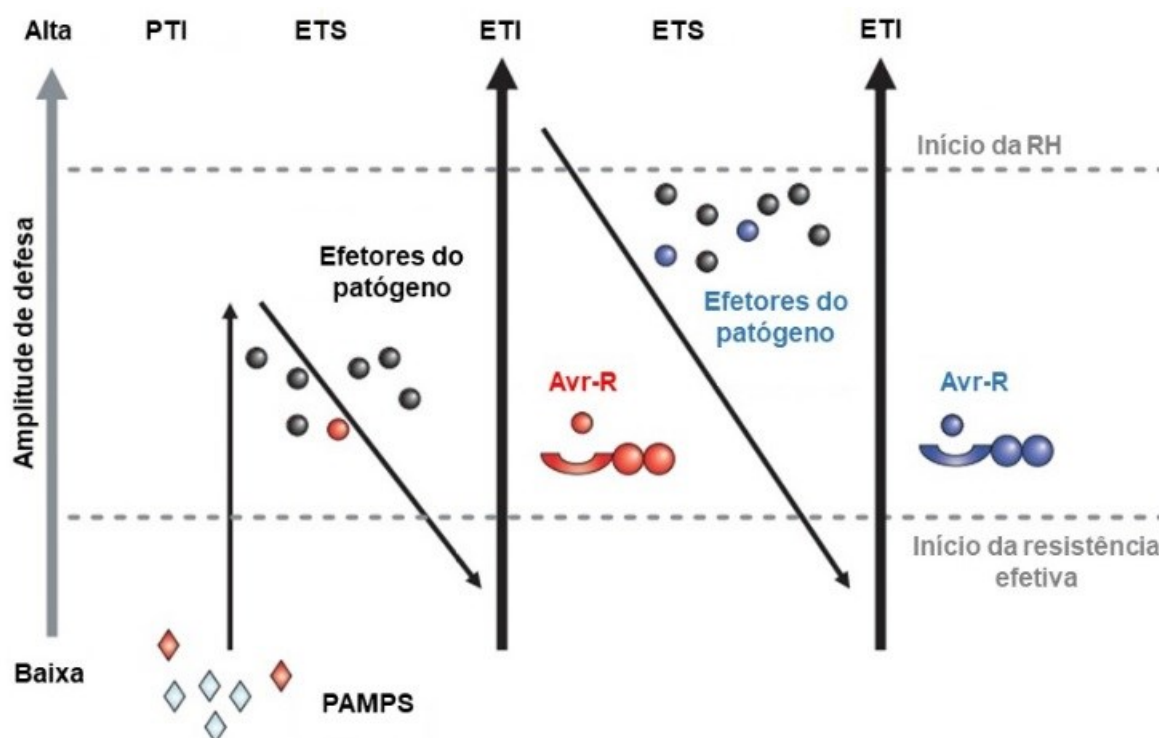
As vias de sinalização desses hormônios têm sua importância pois muitos patógenos interferem diretamente nos níveis hormonais das plantas quando as atacam, podendo até potencializar a infecção causada (SHOJI & HASHIMOTO, 2011).



**Figura 1.** Produção de hormônios após o estímulo de um patógeno. As respostas de resistência a doenças de plantas são induzidas por reconhecimento de PAMPs / efetores de patógenos e pragas por proteínas PRR de plantas. Esse reconhecimento modula a homeostase hormonal da planta e a reprogramação transcricional de genes defensivos. A ativação destas respostas de resistência induzíveis (PTI e / ou ETI) regula negativamente a expressão de genes associados ao desenvolvimento. Efetores de patógenos interferem no equilíbrio hormonal e na ativação de PTI e ETI. Os patógenos também podem afetar negativamente o crescimento das plantas e os processos associados ao desenvolvimento como a expressão transcricional dos genes e a regulação negativa das vias de sinalização. Interações positivas e negativas são indicadas por setas e quadrados, respectivamente. AAB: ácido abscísico; AIA: ácido indolacético; ET: etileno; AJ: ácido jasmônico; AS: ácido salicílico; AG, ácido giberélico; BR, brassinosteróides (Fonte: adaptado de Denancé et al., 2013).

A segunda frente de defesa na planta é a imunidade desencadeada por efetores. Segundo Dalio (2014), "Os efetores são moléculas liberadas ou associadas a um organismo que modificam a fisiologia de outro organismo". Os patógenos podem liberar moléculas efetoras que driblam a imunidade da planta e levam à uma susceptibilidade desencadeada por efetores (ETS). Algumas plantas são capazes de reconhecer essas moléculas por meio de proteínas de resistência (R) e conseguem desencadear uma imunidade desencadeada por efetores (ETI). Nesse caso, no local da infecção geralmente ocorre uma resposta de hipersensibilidade (RH), com a consequente necrose tecidual restringindo a infecção, e ampliando a sinalização para células vizinhas gerando uma resistência distal induzida (SILVA et al., 2018).

O modelo zigue-zague (FIGURA 2) traduz o sistema de defesa em plantas, mostrando as duas linhas de defesa que podem ocorrer, seja ela pelo reconhecimento de padrões moleculares (PTI) ou pela liberação de moléculas efetoras (ETI) por parte do hospedeiro, levando a expressão dos genes R (JONES & DANGL, 2006).



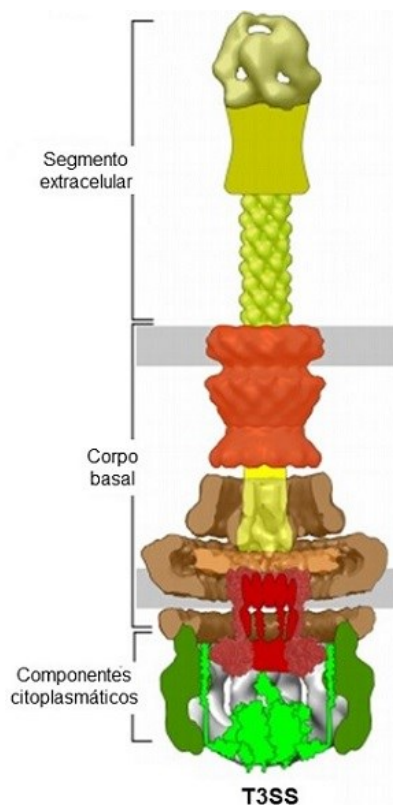
**Figura 2.** Modelo zigue-zague ilustrando o funcionamento no sistema imune da planta. Na primeira fase os padrões moleculares associados a microorganismos/ patógenos (MAMPs/PAMPs, marcados como "diamantes" vermelhos) são reconhecidos pela planta por meio dos PRRs e medeiam a imunidade desencadeada por PAMP (PTI). Na fase seguinte os patógenos bem sucedidos implementam efetores que suprimem a PTI, resultando em uma susceptibilidade desencadeada por efector (ETS). Na terceira fase, um efector (indicado em vermelho) é reconhecido por uma proteína NB-LRR e ativa a imunidade desencadeada por efector (ETI). Algumas plantas apresentam proteínas ligadas à resistência (R) e reconhecem a atividade dos efetores, o que leva à imunidade desencadeada por efector (ETI). A ETI atua como uma PTI amplificada que pode passar para uma indução de morte celular hipersensível (HR). Na última fase, alguns patógenos isolados que perderam o efector (vermelho), e talvez tenham adquirido novos efetores (azul), por exemplo por meio do fluxo horizontal de genes, podem ajudar a suprimir a ETI. A seleção favorece os novos alelos NB-LRR da planta que podem reconhecer um dos efetores recém-adquiridos, resultando novamente em ETI (Fonte: adaptado JONES e DANGL, 2006).

Bactérias gram-negativas patogênicas de plantas expressam proteínas efetoras a partir dos clusters gênicos *hrp* (*hypersensitive response* [HR] *and pathogenicity*) e *hrc* (*HR and conserved*) e são capazes de inocular essas moléculas diretamente do seu citosol nas células das plantas por um sistema de secreção do tipo III (T3SS). Esse aparato, por vezes chamado de injetossoma, apresenta uma agulha extracelular, o corpo basal, e os componentes citoplasmáticos na sua estrutura (FIGURA 3) (CORNELIS, 2006; PORTALIOU et. al. 2016).

O T3SS é o mais utilizado por essas espécies de bactérias, que tem como representante o objeto de nosso estudo *P. atro Septicum*, para infecção em plantas, animais ou simbioses e apresentam componentes, alguns dos quais substratos efetores, chaperonas e reguladores transcricionais, que são do próprio sistema secretor do patógeno. Esses componentes originam um sistema secretor completo, que tem como característica ser induzido quando entram em contato com a membrana da célula hospedeira (NANS et al. 2015). Tal expressão no caso de infecção em plantas tem sua progressão com sinais da própria planta, por exemplo compostos fenólicos, ou condições químicas ou fisiológicas como pH baixo e baixa osmolaridade (NOTTI, 2016).

Para que a virulência da infecção seja efetiva nas células hospedeiras, as bactérias possuem proteases intra e extracelulares que contribuem no processo da infecção desde a destruição da matriz da célula até atrapalhando a sinalização na célula hospedeira (HOU et al, 2018). Zhou et al. (2018) observaram que a fosforilação do grupo de proteases extracelulares *LON* auxilia na virulência bacteriana e na indução da resposta hipersensitiva (HR), mantendo a expressão dos genes *hrp/hrc* no hospedeiro.

A compreensão do sistema imune na planta é uma importante ferramenta para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes às infecções que atingem grande parte das culturas agrícolas no país, e o estudo nas plantas modelo auxiliam nessa etapa (MILLER et al., 2017; CHANG et al., 2016).



**Figura 3.** Esquema do sistema de secreção do tipo 3 (T3SS). A imagem apresenta a estrutura do sistema que consiste no segmento extracelular, o corpo basal e os componentes citoplasmáticos. Os componentes homólogos são apresentados com a mesma cor nas estruturas. No núcleo do sistema existe uma espécie de nanoseringa para injetar os efetores no citoplasma da célula hospedeira (Fonte: adaptado de Portaliou et al., 2016).

## 1.2. *Nicotiana benthamiana* COMO PLANTA MODELO PARA ESTUDO DA INTERAÇÃO PLANTA - PATÓGENO

A escolha da espécie da planta é um passo importante para o uso dessa plataforma. Fatores como rendimento total de biomassa, armazenamento, transporte, custos de manutenção, tamanho da estrutura necessária para manutenção da planta influenciam nessa decisão (SCHILLBERG et al., 2005). Com esses fatores as plantas se mostram um sistema vantajoso para a produção de proteínas. Existem duas formas de expressão proteica com esse modelo. A primeira em que se tem a expressão de forma estável, ou seja, a sequência codificante da proteína de interesse é clonada em um cassete de expressão e ocorre a integração da região T-DNA no genoma do hospedeiro, e a expressão ocorrendo após a regeneração dos tecidos. Dessa forma, a expressão tem caráter hereditário, sendo repassado para as próximas gerações, apesar de poder acontecer algum evento de silenciamento. O segundo método de

expressão é a transiente, nesse caso, os vetores construídos com a sequência de interesse são injetados, via *Agrobacterium tumefaciens*, na planta já desenvolvida, de forma que a produção da proteína seja rápida e atinja um pico entre 2 a 5 dias após a infecção (sendo estes dias variáveis), declinando em seguida (LEUZINGER et al., 2013; KRENEK et al., 2015).

Representante da família Solanaceae, *N. benthamiana* teve sua primeira descrição na Austrália no século XIX (GOODIN et al., 2008). Essa espécie tem sua importância nos estudos da interação planta-patógeno por serem capazes de expressar genes exógenos por meio de um vetor de vírus de planta; e também por ser suscetível a infecções por bactérias, fungos ou vírus, que fez dessa planta um modelo muito utilizado em estudos de infecções virais. Apresentam uma alta eficiência em silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS), expressão eficiente de uma proteína expressa de forma transiente por infiltração via *Agrobacterium tumefaciens* (TODESCO & FELIPPES, 2016). Além disso, o tabaco tem outras vantagens tais como elevado rendimento de biomassa, é uma planta não alimentícia, possui crescimento e colheita durante o ano todo e apresenta protocolos de transformação bem estabelecidos (FISCHER et al., 2004; STOGER et al., 2000). Outras plantas como alfalfa (*Medicago sativa*) e alface (*Lettuce sativa*) também estão sendo utilizadas para a produção de moléculas recombinantes (SOURROUILLE et al., 2008; LAI et al., 2011). Atualmente, *N. benthamiana* tem sido usada como modelo de estudo para produção de antígenos recombinantes, visando a produção de vacinas (TIWARI et al., 2009).

### **1.3. FITOBACTÉRIA *Pectobacterium atrosepticum* COMO CAUSADORA DE "PODRIDÃO - MOLE"**

Listada entre as 10 bactérias patogênicas em plantas de interesse tanto econômico quanto científico, a *Pectobacterium atrosepticum* é responsável por grandes perdas na produção de batata. Representante de Enterobacteriaceae, *P. atrosepticum* (antigamente nomeada como *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*) é um fitopatógeno necrotrófico, anaeróbico facultativo oportunista que causa grandes prejuízos na agricultura atingindo culturas como as do arroz, trigo e batata, sendo que na batata causa a doença conhecida como "podridão-

mole" (PÉROMBELON, 2002; MANSFIELD et al., 2012). As formas de contaminação por esse patógeno incluem o contato com tubérculos contaminados; a presença deles no solo; e transmissão por insetos, sendo esta última uma importante linha de pesquisa que indica uma evolução do inseto com o patógeno e a sua influência na transmissão para a planta (DAVIDSSON et al., 2013).

Os organismos necrotróficos são mais agressivos do que os biotróficos ou hemibiotróficos, pois eles provocam a morte celular extraíndo nutrientes do tecido da planta. O mecanismo de virulência dessa bactéria se inicia com a degradação da parede celular por pectinases e celulases. Além disso, produz proteínas indutoras de necrose, seguida de uma intensa motilidade adquirida pelo flagelo da bactéria e a atuação dessas enzimas que degradam a parede celular de plantas (PCWDEs) que auxiliam na determinação do caráter necrotrófico da infecção por *Pectobacterium*. É uma bactéria oportunista em que o estágio inicial da infecção é na forma assintomática, e quando a população da bactéria aumenta, e a oferta de oxigênio diminui, a infecção passa para sua fase sintomática. O mecanismo geral de defesa na planta contra *Pectobacterium* é principalmente a PTI (*pattern triggered immunity*), sendo ela PAMP/DAMP (MATTINEN et al., 2008; BOWDEN et al., 2013; DAVIDSSON et al., 2013).

Considerando as frentes de defesa após contato com o patógeno, algumas substâncias são produzidas como, por exemplo, o ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET), sendo o AJ e ET em casos de infecção com microorganismos necrotróficos (MINE et al., 2014).

Baseado na complexidade das proteínas envolvidas durante o ataque de um patógeno à uma planta, estudá-las seria uma forma de elucidar melhor o mecanismo envolvido. A proteômica será a ferramenta utilizada nesse trabalho a fim de identificar essas proteínas para assim, entender a interferência do gene inserido de forma transiente no processo de infecção por *P. atrosepticum*.

#### **1.4. A APIRASE E O DOMÍNIO B**

Também conhecida como NTPDase (*nucleoside triphosphate diphosphohydrolase*) a apirase é uma enzima que atua na hidrólise de ATP, tendo como ativador um cátion bivalente (JIANG et al., 2017). Além de participar



da interação planta - hospedeiro, esta enzima está relacionada ao crescimento e proliferação celular, mecanismos de sinalização celular e, também, no acúmulo de amido em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*) (WUJAK et al., 2013; RIEWE et al., 2008).

As NTPDases são definidas por possuírem cinco regiões conservadas (ACRs 1-5; "apyrase conserved regions") já descritas que atuam no sítio catalítico da enzima (HANDA & GUIDOTTI, 1996; VASCONCELOS et. al., 1996).

Em *Arabidopsis*, foi relatada a relação da enzima apirase com resistência à herbicidas, além de gravitropismo associado à auxina (WINDSOR et al., 2003; TANG et al., 2003).

Em algumas infecções parasitárias causadas por *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis*, e *Schistosoma mansoni*, essas enzimas, presentes também nesses parasitos, exercem seu papel de potencializar a infecção na célula hospedeira (SANSOM, 2012).

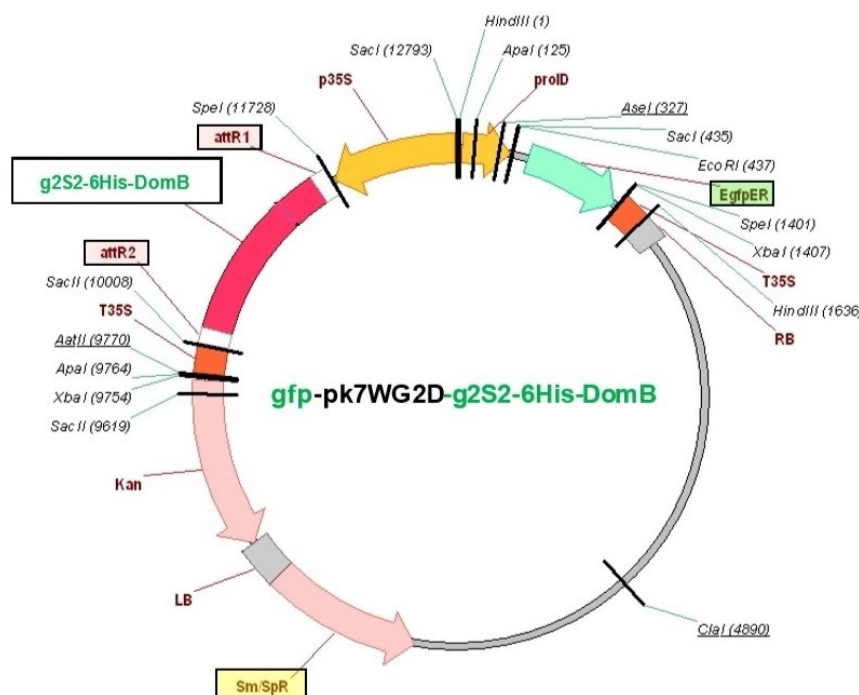
Demonstrou-se que as apirases de parasitos e de plantas compartilham um domínio chamado de "B" com 40 aminoácidos. A partir da hipótese de convergência evolutiva entre as apirases de plantas e de parasitos, foram feitos vários trabalhos com o recombinante do domínio B da apirase de batata *S. tuberosum* (r-6His-DomB) e peptídeos sintéticos (potB1LJ e potB2LJ) oriundos deste domínio e também pertencentes ao domínio B de NTPDases de *S. mansoni* e *Leishmania braziliensis*. Foram feitos testes de imunização em camundongos mostrando o compartilhamento de epítomos entre os domínios B das apirases de plantas e de parasitos (FARIA-PINTO et al., 2004; 2006; 2008, 2010a, b; MENDES et al., 2011; COIMBRA et al., 2008; REZENDE-SOARES et al., 2010; MAIA et al., 2011; PORCINO et al., 2012; DETONI et al., 2013; MAIA et al., 2013; DETONI, 2015).

A comparação das apirases de batata (*S. tuberosum*) com as de outras famílias de plantas, mostrou, por um alinhamento das sequências primárias dos domínios B, uma alta similaridade e identidade (QUELLIS, 2013).

Quellis (2017) mostrou que os peptídeos sintéticos potB1LJ e potB2LJ, e o recombinante r-6His-DomB foram capazes de reduzir o calibre dos vasos e do fluxo vascular, além de induzirem deposição de calose e produção de peróxido de hidrogênio, em folhas de *Nicotiana benthamiana*, ambos indicadores de ativação de defesa de planta (OH e COLLMER, 2005; LUNA et al., 2011; CHOI

et al., 2016). O potB1LJ foi relacionado à redução do calibre dos vasos, o potB2LJ na indução e produção de calose, e o r-6His-DomB na indução de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estes resultados mostraram que, ambas as porções N- e C-terminal do domínio B da apirase de batata, representadas pelos peptídeos potB1LJ e potB2LJ, respectivamente, são aptas para ativar a imunidade disparada por padrão (PTI) (QUELLIS, 2017).

O plasmídeo de expressão final obtido para os estudos da expressão transiente pk7WG2D-GFP-g2S2-6HisDomB foi construído por Quellis (2017) (FIGURA 4). O gene quimérico g2S2-6His-DomB reúne características defensivas quando inserido na cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* e na cepa EHA101 de *A. tumefaciens* previamente transformada com a proteína de capsídeo (CP) do vírus TCV. O TCV-CP é o gene que codifica para a proteína do capsídeo (CP; p38) do “vírus do encrespamento do nabo” (TCV; Turnip crinkle vírus), uma supressora de silenciamento gênico em plantas, que foi utilizada a fim de evitar um possível silenciamento de genes pós-transcrição enquanto os experimentos eram realizados. Tal associação se mostrou eficiente na expressão do polipeptídeo quimérico p2S2-6His-DomB em *N. benthamiana* de aproximadamente 7 kDa (QUELLIS, 2017).



**Figura 4.** Plasmídeo final pk7WG2D-GFP-g2S2-6HisDomB. O esquema apresentado demonstra o local de inserção do gene quimérico (Modificado de Invitrogen, USA). (Fonte: QUELLIS, 2017)

Os testes em *N. benthamiana* continuaram com o desafio do fitopatógeno necrotrófico *Pectobacterium atrosepticum* após a infiltração com os peptídeos sintéticos, os quais se mostraram capazes de estimular uma resposta de hipersensibilidade, ocorrendo uma sinalização de defesa e uma resistência sistêmica naquelas plantas expressando transitoriamente o polipeptídeo quimérico p2s2-6His-DomB (QUELLIS, 2017).

Além dos testes em *N. benthamiana* utilizando o polipeptídeo g2S2-6HisDomB, os mesmos foram feitos em sementes de *Calliandra brevipes*, representante da família Fabaceae que apresenta atividade apirásica nas suas folhas e caule, e quando desafiadas com a bactéria *P. atrosepticum*, sobreviveram a infecção, mantendo o crescimento e desenvolvimento normais de órgão da plântula, por 20 dias (DETONI et al., 2012; QUELLIS, 2017).

Muitos programas de melhoramento buscam soluções em cima da relação entre a planta hospedeira e o patógeno, estimulando mecanismos de defesa da própria planta. Sendo uma planta modelo, os testes de resistência feitos em *N. benthamiana*, contra a infecção por *P. atrosepticum*, que é o objeto de estudo, podem ser ampliados para outras espécies de Solanaceae com importância agrônoma como tomate e batata e que também sofrem com a infecção por bactérias desse gênero (ALEXANDERSSON et al., 2016; PANDA et al., 2016; AHMED et al., 2017).

## 1.5. PROTEÔMICA

Sendo o conjunto de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, as proteínas podem ser classificadas como o fruto da expressão gênica dos diversos organismos, podendo ser variável com o tempo, com a condição fisiológica e ambiental do sistema em estudo, e quando assumem a estrutura tridimensional nativa passam a ter atividade biológica (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011; BARACAT-PEREIRA et al., 2014).

Com a utilização de métodos bioquímicos cunhou-se o termo proteômica, em 1995, que consiste na caracterização qualitativa e quantitativa do conjunto das proteínas de uma linhagem celular, tecido ou organismo (ZALUZEC et al., 1995).

Com uma compreensão que vai além da genômica, o estudo proteômico se baseia na interação proteica.

A era pós-genômica levou ao desenvolvimento e utilização de várias técnicas que auxiliaram a interpretação dos eventos que ocorrem dentro da célula. As estratégias “ômicas” incluindo, transcriptômica, metabolômica, proteômica, avançaram no estudo da fisiologia celular (RAJA et al., 2017).

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 & RESSOM, 2009). Esse método permite conhecer o produto final de um determinado gene, as propriedades químicas e locais da atuação na célula através de metodologias reprodutíveis e sensíveis, que podem levar à análise de todo conteúdo proteico e suas modificações pós-traducionais, de acordo com a abordagem utilizada.

As condições de estresse biótico ou abiótico que afetam as plantas podem interferir na expressão de proteínas, por isso, nos últimos anos, a caracterização proteômica tem sido uma estratégia para geração de sementes resistentes a infecções por pragas ou mesmo com melhor rendimento em condições climáticas adversas (TAKAC et al., 2016; TRUONG et al., 2018).

O desenvolvimento desse estudo se deve ao concomitante avanço nas metodologias de separação de peptídeos e proteínas, análises por espectrometria de massa e bioinformática, além de metodologias híbridas. O desafio passa a ser integrar e analisar os inúmeros dados gerados com essa ferramenta (PATTERSON & AEBERSOLD, 2003).

## **1.6. FERRAMENTAS MOLECULARES PARA O ESTUDO PROTEÔMICO**

Quando a análise proteômica é feita a partir da clivagem enzimática de um conjunto de proteínas fala-se em *bottom-up* (ou *shotgun*); quando não ocorre essa clivagem e a caracterização é realizada com as proteínas intactas, ela é classificada como *top-down* (CANTÚ et. al. 2008).

A eletroforese bidimensional (2-DE) é uma das ferramentas utilizadas em proteômica, que permite a separação a partir do ponto isoelétrico e do peso molecular, e visualização de diversas proteínas ao mesmo tempo, em um gel de poliacrilamida-SDS (OLIVEIRA et. al., 2014).

A análise proteômica do tipo *bottom-up (shotgun)* foi a utilizada no presente trabalho. Nesse caso, as proteínas são extraídas das células lisadas, e em seguida digeridas de forma enzimática. Os peptídeos então são analisados no espectrômetro (LI & TANG, 2016).

Tem se trabalhado na busca de eficiência, exatidão, além de sensibilidade nas técnicas possibilitando uma análise cada vez mais eficiente em amostras complexas. Isso se vê nos casos de acoplamento da cromatografia com a espectrometria de massa como, por exemplo, nas análises em nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, em que há a cromatografia líquida de ultra performance, acoplada ao espectrômetro de massa, e os dados proteicos são obtidos pela alternância de elevada e baixa energia de colisão.

A espectrometria de massa é uma técnica bastante sensível utilizada para entender a informação gerada pelos genes. Ela atua na identificação de compostos baseada na separação dos íons de acordo com a relação massa/carga. Um espectrômetro de massa é composto de quatro elementos: uma fonte de ionização; um separador de massas; um detector de íons; e um analisador de dados. O MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*) e o ESI (*electrospray ionization*) são fontes de ionização usadas com o espectrômetro de massa. Quadrupolos, *time-of-flight* (TOF), ou *ion-traps* são alguns exemplos de separadores de massa que existem no mercado. Eles podem ser usados de forma isolada ou associados, daí os equipamentos passam a ser chamados de híbridos (CHANDRASEKHAR et al., 2014).

Visando obter dados sobre a expressão do proteoma diferencial de plantas *N. benthamiana* susceptíveis e resistentes à infecção por *P. atrosepticum*, o presente trabalho avaliou as possíveis modificações que ocorreram frente à inserção do gene exógeno proposto por Quellis (2017).

O outro ponto a ser discutido neste trabalho é a transformação transiente em uma planta, de importância econômica, com o mesmo gene proposto por Quellis (2017). A batata (*S. tuberosum*) foi a planta escolhida para estes testes.

### **1.7. *Solanum tuberosum* COMO MODELO COMERCIAL PARA OS TESTES COM O GENE QUIMÉRICO**

Integrante da família Solanaceae, a batata (*Solanum tuberosum* L.), teve uma produção de 3.851.396 toneladas em 2016 (FAO, 2017), e em 2018 uma produção de mais de uma tonelada (SIDRA, IBGE 2018) (TABELA 1). É uma cultura que produz durante o ano todo, mas que sofre com doenças fúngicas, virais e bacterianas. Historicamente, *P. atrosepticum* é uma fitobactéria que causa muitos prejuízos na produção mundial de batatas. Além dessa espécie, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, podem causar podridão-mole no Brasil, ocorrendo em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, que são os estados de maior produção (EL TASSA e DUARTE, 2004; BENELLI et al., 2004).

**Tabela 1.** Produção, área e produtividade de batata no Brasil, entre as décadas de 1960 a 2010 e em 2018

Item quantificado	Década					
	60	70	80	90	10	18
Brasil						
Produção (t)	1.080.310	1.583.465	2.059.785	2.233.721	3.547.510	1.778.541
Área (ha)	191.255	214.155	181.084	158.326	137.044	62.247
Produtividade (t.ha <sup>-1</sup> )	5,6485	7,394	10,7107	14,1084	25,8859	28,575

Fonte IBGE, 2018; FAO, 2018.

Tendo em vista que grande parte das cultivares plantadas hoje no Brasil é de origem europeia, os programas de melhoramento têm como foco adaptações à temperatura e luminosidade. O ajuste à temperatura tem como foco combater as infecções por diferentes patógenos, devido à maior temperatura média, já que estamos em uma região tropical, e o ajuste ao fotoperíodo é devido às diferentes amplitudes luminosas nas diferentes regiões do Brasil (12-14h) quando comparado com o das regiões europeias (16-18h em uma safra de verão) (HAVERKORT & VERHAGEN, 2008; AKSENOVA et al., 2009). O uso apenas de defensivos agrícolas para controle de doenças tem um custo muito alto, além de trazer riscos futuros para o solo manejado e comunidade no entorno, por isso

se faz necessário a busca de formas alternativas para tratar esses problemas (DELEO e CARDOSO, 2014).

Apesar de técnicas de cuidado no manejo e armazenamento de tubérculos, o uso de cultivares resistentes à podridão-mole são vistos como uma solução para se evitar as grandes perdas geradas por essa patogenicidade (VITALE et al, 2004; PEREIRA, 2011; CHAGAS, 2017).

Assim, o presente trabalho visou avaliar se o gene quimérico g2S2-6His-DomB apresenta atividade contra a pectobactéria por meio da análise proteômica diferencial de *N. benthamiana* já transformada. Este estudo fornecerá dados que permitirão a transformação genética de cultivares comerciais de *S. tuberosum* com o gene quimérico g2S2-6His-DomB, consolidando os estudos de proteção contra a bactéria fitopatogênica *P. atrosepticum*, iniciados na planta modelo *N. benthamiana*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Diferenciar a expressão do conteúdo proteico entre *Nicotiana benthamiana* selvagem e *N. benthamiana* transgênica que contém o gene g2S2-6HisDomB e o padrão molecular relacionado à defesa contra o patógeno necrotrófico *Pectobacterium atrosepticum*, e desafiar plantas de batata (*Solanum tuberosum*) modificadas de forma transiente com o mesmo patógeno.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Examinar o conteúdo qualitativo de proteínas em R<sub>0</sub> de *N. benthamiana* por análise proteômica *shotgun*.

2.2.2. Validar as transformações transientes nas folhas de *S. tuberosum* cv Asterix por meio da visualização da proteína repórter GFP.

2.2.3. Desafiar as folhas de *S. tuberosum* cv Asterix previamente agroinfiltradas com a bactéria *P. atrosepticum*, avaliando os aspectos fenotípicos da infecção.



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DE PLANTAS *Nicotiana benthamiana*

Para um grupo controle, foram germinadas 120 sementes de *N. benthamiana* selvagem *in vitro* em meio MS (Murashige and Skoog Basal Medium, SIGMA, USA), sacarose (20 g/L) e ágar (7 g/L), e 120 sementes transgênicas sob condições estéreis.

#### 3.2. ANÁLISE PROTEÔMICA DE PLANTAS DE *N. benthamiana* R<sub>0</sub>

##### 3.2.1. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FOLHA PARA ANÁLISE NO ESPECTRÔMETRO

As proteínas totais das folhas foram extraídas de plantas constituintes de quatro grupos experimentais: *Nicotiana benthamiana* controle (GS); *N. benthamiana* controle desafiada (GSD); *N. benthamiana* transgênica/resistente (GR); *N. benthamiana* transgênica/resistente desafiada (GRD) (BR10201700439) (VASCONCELOS et al., 2017). Cada grupo foi composto por cinco vasos.

Vinte e quatro horas (24 h) após o desafio com *Pectobacterium atrosepticum*, um pool de 15 g de folhas infiltradas de *N. benthamiana* foi coletado de cada tratamento e submetido à extração de proteínas seguindo a metodologia MPLEX (NAKAYASU et al., 2016), que consistiu na maceração do tecido foliar, seguido da adição de água em um volume suficiente para cobrir o conteúdo macerado, além da mistura clorofórmio-metanol (2:1).

Os microtubos foram então levados ao vórtex por um minuto e incubados no gelo por cinco minutos. Em seguida foram centrifugados durante 10 minutos a 4°C, 10835 g. Foi obtido um sistema trifásico em que a camada intermediária corresponde a porção proteica. Esta fase foi então lavada com 1 ml de metanol gelado, colocado no vórtex durante um minuto, e posteriormente centrifugado a 10835 g durante 10 minutos a 4°C.

Os sobrenadantes foram então descartados, e os sedimentos foram secos em uma centrífuga a vácuo por cinco minutos. O material resultante foi congelado em um freezer -80 °C para posteriores análises.

A dosagem de proteínas foi feita por Bradford (Bradford, 1976) utilizando o Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit - Thermo Scientific.

Parte das amostras foram então liofilizadas resultando em uma concentração de 50 µg e suspensas em 10 µl de tampão de amostra e 10 µl de água para eletroforese e aplicadas em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 12% (p/v) usando uma cuba de eletroforese Mini-protean Tetra System (BIORAD). Os marcadores de peso molecular pré corados (*BIO-RAD SDS-PAGE Standards Broad Range*) também foram aplicados. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram coradas com Azul de Coomassie.

Para a tripsinização, 100 µg de proteínas foram liofilizadas por 24 h. Foram adicionados 30 µl de *RAPIGEST*<sup>®</sup> (Waters, USA). Os microtubos foram homogeneizados com auxílio de vórtex. Com o intuito de reduzir as pontes dissulfeto das cisteínas, foram adicionados 3 µl de DTT (50 mM) a cada microtubo, sendo novamente homogeneizados em vortex, e incubados a 60 °C por 30 minutos. Após a incubação foi adicionado 3,3 µl de iodoacetamida - IAA (100 mM) visando a alquilação das cisteínas reduzidas, e novamente os microtubos ficaram por 30 minutos no escuro à temperatura ambiente. Logo após foram adicionados 5 µl de tripsina (1 µg/µl) incubados em banho seco a 37 °C *overnight* para digestão proteolítica das amostras.

Passadas 24h, centrifugou-se as amostras por 10 minutos a 11738 g, e adicionou-se o ácido trifluoroacético TFA (0,5% v/v), a fim de precipitar o surfactante *RAPIGEST*<sup>®</sup>, e as amostras foram deixadas por mais 30 minutos em banho à seco a 37°C, seguido de uma nova centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, congelados e liofilizados para serem ressuspensos posteriormente, em formato de amônio. Em seguida foram transferidos para *vials Waters Total Recovery* (Waters, USA), onde se adicionou fosforilase B (*Waters Massprep PHOSB standard* - 100 µL de uma solução a 3 % (v/v) de acetonitrila 1 mL de acetonitrila em água ultrapura, contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico). A concentração final obtida da proteína foi de 1 µg/µL para um volume final de 200 µL, e a de PHOSB correspondia a 50 fmol/µL.

### 3.2.2. ESPECTROMETRIA DE MASSA POR nanoUPLC-MS<sup>E</sup>

Os Experimentos de espectrometria foram realizados na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob a supervisão do Prof. Marcelo Henrique Soller Ramada, da Universidade Católica de Brasília.

A separação em nano escala dos fragmentos trípticos foi realizada através de sistema nanoACQUITY<sup>TM</sup> (Waters, USA). A cromatografia foi realizada em pré-coluna *Symmetry* C18 de partícula 5µm, 5 mm x 300 µm e coluna analítica de fase reversa HSST3 C18 de partícula 1,8 µm, 75 µm x 150 mm (Waters, USA). A fase móvel A correspondeu a ácido fórmico 0,1% v/v em água ultrapura e a fase B à ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetonitrila grau LC-MS. Uma corrida de 200 min foi realizada para separar e quantificar as amostras. Para ela, 5 µL das amostras foram inicialmente transferidas para pré coluna numa taxa de fluxo de 600 nL.min<sup>-1</sup> e 3 % de B. Os peptídeos foram separados utilizando um gradiente de 3-85% na fase B por 190 min, com uma taxa de fluxo de 600 nL.min<sup>-1</sup> seguido de lavagem com 85% da fase móvel B por 10 minutos. Durante esse processo, a temperatura da coluna foi mantida a 37 °C. O íon de referência (*lock mass*) peptídeo glu-fibrino humano (GFP) foi entregue a partir do sistema fluídico do SynaptG2 utilizando uma taxa de fluxo constante de 600 nL/min a uma concentração de 320 fmol de GFP para o vaporizador de referência da fonte do *NanoLockSpray* do espectrômetro de massas. Após a aquisição, as amostras foram quantificadas utilizando o método de identificação descrito no próximo item. As demais réplicas técnicas foram realizadas ajustando-se a injeção do volume para uma concentração final de 1000 ng. A entrega do íon de referência em todas as frações foi feita nas mesmas condições descritas anteriormente. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas técnicas.

Os peptídeos trípticos foram analisados em espectrômetro de massas *Synapt*<sup>®</sup> G2 HDMSTM (Waters, USA) com geometria quadrupolo híbrida/mobilidade iônica/aceleração ortogonal por tempo de voo (oa-TOF). Para todas as mensurações, o espectrômetro de massa foi operado em modo resolução com alcance típico de pelo menos 20000 FWHM (“metade do máximo da largura do total”, do inglês *full-width half-maximum*). Todas as análises foram realizadas utilizando o modo íon-positivo do nanoelectrospray (nanoESI+) o analisador de tempo de voo do espectrômetro de massas será externamente

calibrado com íons GFP b+ e y+ com m/z 50 a 2000 com dados de pós-aquisição dos íons de referência corrigidos usando o íon precursor dupla-carga da GFP  $[M+2H]^{2+} = 785.8426$ . O vaporizador de referência foi ajustado para uma frequência de 30 s. Os dados de massa exata por tempo de retenção (*Exact Mass Retention Time*) do nanoLC-MS<sup>E</sup> (GEROMANOS et al., 2009) foram coletados em modos alternados de aquisição de baixa e alta energia. O tempo de aquisição do espectro contínuo, em cada modo, foi de 1,5 s com um atraso de 0,1 segundo por interscan. No modo MS de baixa energia, os dados foram coletados a uma energia de colisão constante de 3 eV; no modo de alta energia, a energia de colisão foi rampeada de 27 a 45 eV a cada intervalo de 1,5 s do espectro.

### 3.2.3. PROCESSAMENTO DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

Os dados obtidos por nanoUPLC-MS<sup>E</sup> foram processados e comparados a um banco de dados com auxílio do software *ProteinLynx Global Server* (PLGS) versão 2.5.2 (Waters, GBR). As identificações das proteínas foram obtidas com um algoritmo de "ion accounting" incorporado ao programa e comparado às sequências de *Nicotiana benthamiana* depositadas no *SOLgenomics* com padrões de digestão Mass PREP (MPDS) *UnitProtKB/Swiss-Prot* anexado ao banco de dados (Phosphorylase - P00489).

### 3.3. CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DE PLANTAS *Solanum tuberosum* cv. Asterix PARA OS EXPERIMENTOS DE INFILTRAÇÃO

Foram obtidos nove tubérculos de *S. tuberosum* cv. Asterix do comércio local, plantados em terra autoclavada e armazenados em uma temperatura estável de 25 °C e um regime de luminosidade de 16 h. Após 6 semanas desde a germinação das sementes, com uma média de cinco folhas por vaso, os grupos, foram submetidos aos experimentos de infiltração (FIGURA 5) (DU et al, 2014, adaptado). Dividiu-se em três grupos: o primeiro grupo foi infiltrado com uma solução tampão de MMA (meio MS; 10 mM MES; 20g/L sacarose; 200 µM de acetosiringona; pH 5,6), o segundo grupo foi infiltrado com uma solução contendo a condição experimental Agro-TCV-CP-DomB, e o terceiro grupo com

a condição *A. tumefaciens* GV3101 carreando o plasmídeo gfp-pk7WG2D-g2S2-6His-DomB.



**Figura 5.** *Solanum tuberosum*. Vista superior de um vaso com folhas de *S. tuberosum* no dia da agroinfiltração (Fonte: arquivo pessoal).

#### **3.4. CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DA BACTÉRIA NECROTRÓFICA *Pectobacterium atrosepticum* E AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA NO TUBÉRCULO**

A bactéria *Pectobacterium atrosepticum* (IBSBF 232; Sin: *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*; GARDAN et al., 2003) usada neste trabalho foi obtida da Coleção de Cultura de Fitobactérias do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Centro Experimental do Instituto Biológico (IBSBF), São Paulo, SP.

Uma colônia da bactéria foi crescida em meio LB (triptona 10 g/L, levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L) a 28°C sob agitação de 180 rpm por 16 horas.

Com tubérculos de *S. tuberosum* cv. Asterix obtidos no mercado local, foram feitos testes de infecção direta. A higienização foi feita com etanol 70% (v/v) durante 3 min, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% (v/v) por 5 min e à lavagem por seis vezes sucessivas em água destilada

e estéril. Foram feitas quatro perfurações na superfície da batata com uma ponteira estéril (BENELLI et.al, 2004)

Os grupos foram divididos em: controle sem injeção (3), outro grupo que foi injetado com água (3), e em um terceiro grupo injetado com uma solução contendo a bactéria *P. atrosepticum* (3), em um total de nove tubérculos.

Ao todo foram inoculados 1 mL de solução bacteriana em cada tubérculo do terceiro grupo. As batatas foram então cobertas com filme plástico para evitar dessecação e incubadas a 22°C. O desenvolvimento de lesões foi monitorado por 5 dias. Ao final deste período, cada batata foi cortada e o tecido foi fotografado (FIGURA 9).

### **3.5. EXPRESSÃO TRANSIENTE DO GENE QUIMÉRICO g2S2-6His-DomB EM PLANTAS DE *Solanum tuberosum* cv. Asterix INDUZIDA POR AGROINFILTRAÇÃO**

Uma colônia de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 carreando o plasmídeo gfp-pk7WG2D-g2S2-6His-DomB foi inoculada em 2 mL de LB contendo os antibióticos de seleção rifampicina 50 µg/mL, gentamicina 50 µg/mL e espectinomicina 75 µg/mL, e incubada sob agitação de 200 rpm a 28°C por 16 horas.

Além desta, a cepa de *A. tumefaciens* EHA101 previamente transformada com o plasmídeo pPZP212 (9015 pb) carreando o TCV-CP (pPZP212-TCV-CP) foi também usada neste trabalho. Esta bactéria foi inoculada em 2 mL de LB contendo rifampicina 20 µg/mL, canamicina 50 µg/mL e espectinomicina 50 µg/mL, e incubada sob agitação de 200 rpm a 28°C por 16 horas.

A cepa *A. tumefaciens* EHA101 transformada com TCV-CP foi gentilmente doada pela Dra. María Alejandra Alvarez, Dpto. de Farmacia Y Bioquímica, Facultad de Ciencias de La Salud, *Universidad Maimônides*, Buenos Aires, Argentina.

Em um primeiro momento uma colônia de bactéria foi inoculada em meio LB e incubadas sob agitação de 200 rpm a 28 °C overnight. No dia seguinte uma alíquota da cultura de bactérias foi inoculada em LB foi inoculada em tampão MES (ácido 2 (N-morfolino) etanosulfônico) 10 mM, pH 5,85 (proporção 0,1 mL de bactéria em LB:7,5 mL MES), com a adição dos antibióticos nas mesmas

concentrações já citadas, e de acetoseringona (200 mM), que atua como um indutor fenólico promovendo a expressão dos genes de virulência de bactérias que medeiam a integração de T-DNA (WU et al., 2003). As bactérias foram incubadas sob agitação (180,6 g) a 28°C por 16 horas. No 3º dia, a concentração das bactérias foi determinada por medida de densidade ótica (OD; 600 nm), centrifugadas a 4515 g em centrífuga clínica por 15 minutos à temperatura ambiente, e suspensas gentilmente em tampão de agroinfiltração (MMA 10 mM, pH 5,85, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, acetoseringona 200 mM) em quantidade suficiente para atingir a OD 0,3.

Nesse experimento foram utilizadas folhas com idade de 4-6 semanas submetidas a três soluções infiltradas por folha diferentes. O volume total infiltrado por folha foi de 1 mL/folha de (A) combinação de *A. tumefaciens* EHA101 carreando o plasmídeo pPZP212-TCV-CP e *A. tumefaciens* GV3101 carreando o plasmídeo gfp-pk7WG2D-g2S2-6His-DomB na proporção 1:1; (B) *A. tumefaciens* GV3101 carreando o plasmídeo gfp-pk7WG2D-g2S2-6His-DomB; e (C) solução tampão MMA, para comparação visual. Em cada vaso foram infiltradas uma média de 8 folhas. A região infiltrada foi a abaxial, procurando a aplicação homogênea em ambos os lados da nervura central (DU et al. 2014, adaptado)

Após esse procedimento, as plantas ficaram em uma temperatura de 25°C, sob luz natural (16 h claro/ 8 h escuro). Após cinco dias, algumas das folhas que tiveram o primeiro tratamento foram infiltradas com *P. atrosepticum*, e a evolução da infecção foi então acompanhada por 7 dias.

As folhas infiltradas foram coletadas nos dias 5 e 7 após a agroinfiltração. Elas foram fotografadas e observadas por microscopia de epifluorescência para visualização da expressão de GFP, e estocada a - 80°C para experimentos posteriores. Após esses sete dias, seguiu-se para a extração de proteínas e dosagem pelo método de Bradford (1976).

### **3.6. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FOLHAS DE *S. tuberosum* cv. Asterix TRANSFORMADAS TRANSIENTEMENTE**

Conforme citado no item anterior, as folhas coletadas nos dias 5 e 7 posteriores à agroinfiltração, foram imediatamente visualizadas no microscópio de epifluorescência com filtro de epifluorescência para GFP (NIKON, modelo C-DS) para a visualização da expressão do GFP.

A extração de proteínas de cada folha, identificadas pelo dia da coleta e pelas condições experimentais (controle MMA, Agro-DomB e Agro-TCV-CPDomB), foi feita por recorte de 0,300 g de folha e maceração em nitrogênio líquido, seguido de homogeneização em meio padrão composto de Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, 8% (v/v) de sacarose e os inibidores de proteases leupeptina (0,5 µg/L), pepstatina (0,07 µg/L), inibidor de tripsina (50 µg/L) e PMSF (2 µg/L), seguida de centrifugação a 2500 x g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi estocado a -20°C. A concentração de proteína foi medida de acordo com Bradford (1976), com a leitura feita a 595nm, e a curva padrão utilizando BSA como proteína padrão.

### **3.7. DOT-BLOT**

Para detecção do polipeptídeo p2S26His-DomB realizou-se o imunoensaio Dot-Blot. À membrana de nitrocelulose foram adicionados 20 µg de proteínas de cada amostra, em forma de pontos. A membrana foi bloqueada com PBS 1x, 0,1% (v/v) de Tween-20 e 2% (v/v) de caseína durante 1:30h. Após o bloqueio, adicionou-se o anticorpo primário Anti-His de coelho na diluição de 1:1000 por 1:30 h. Em seguida, a membrana foi lavada em tampão de lavagem (tampão de bloqueio na ausência de caseína) por seis vezes durante 5 minutos cada, e depois com PBS puro por duas vezes durante 5 minutos. Incubou-se a membrana com anticorpo secundário Anti-His de coelho por 1:30h. A membrana foi novamente lavada, e posteriormente revelada com a utilização do substrato ECL, em câmara escura (GE Healthcare).

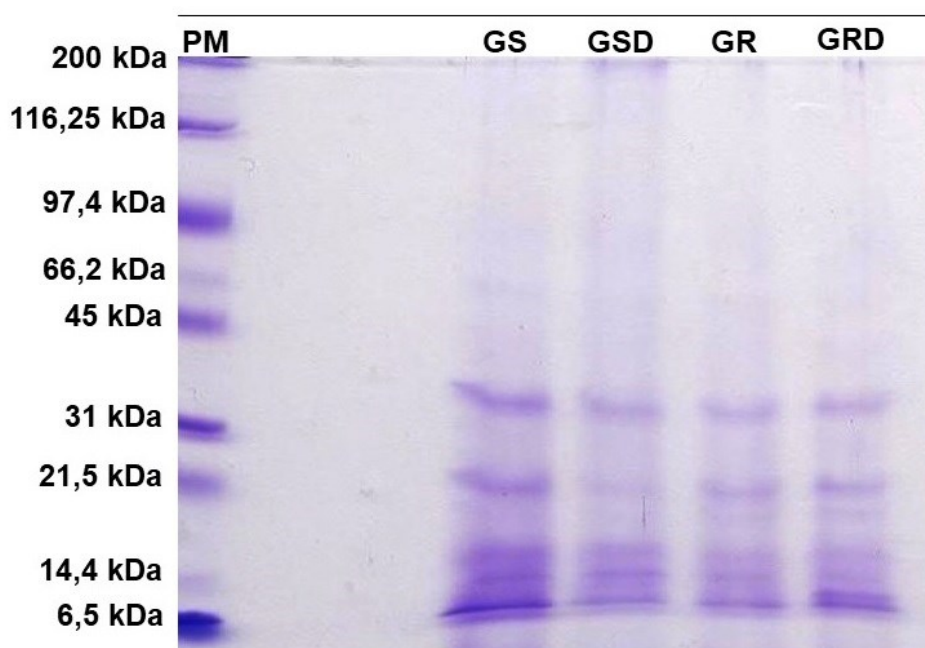


## 4. RESULTADOS

### 4.1. SDS-PAGE 12% DE FOLHAS DE *Nicotiana benthamiana*

Dos grupos experimentais dispostos para as análises foi realizado o protocolo Multiplex para a extração proteica.

A partir desse material foi feita a tripsinização, de uma concentração de 100 µg de proteínas para posterior análise por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massa (FIGURA 6).



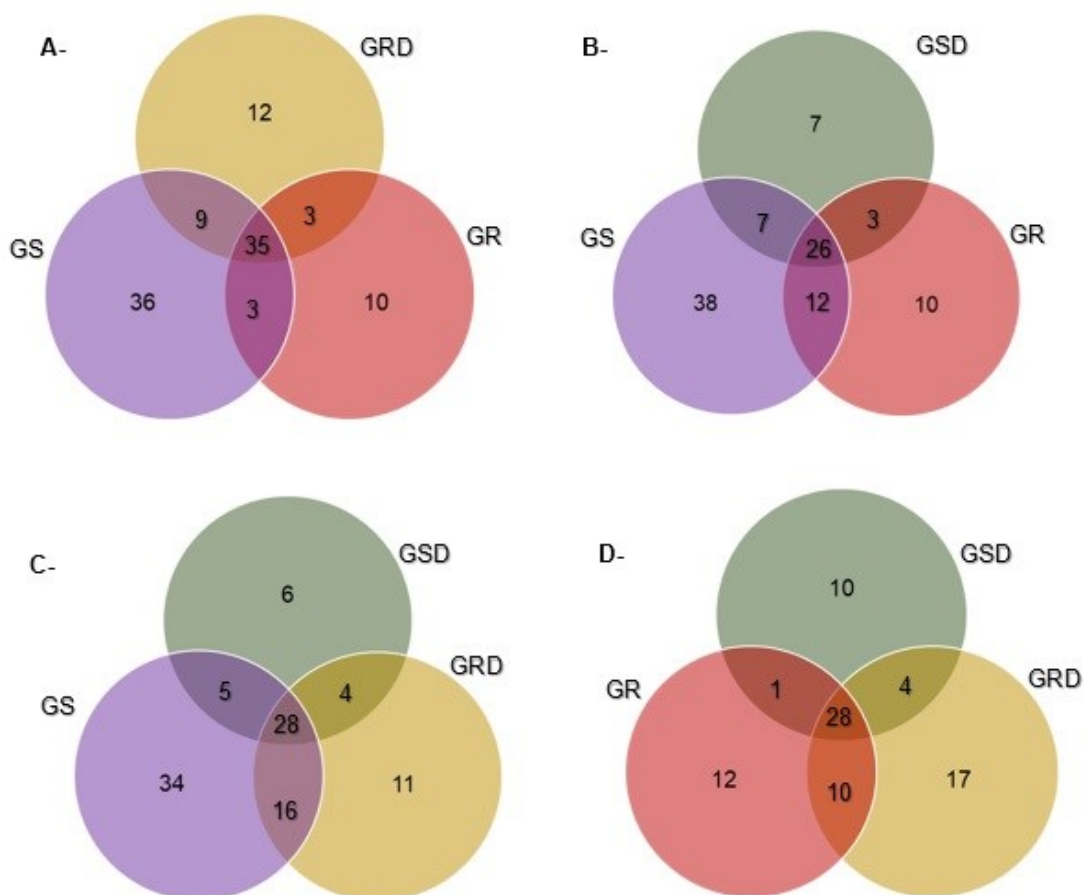
**Figura 6.** SDS-Page 12 % de amostras de folhas de *N. benthamiana*. Aliquotas de proteínas (100 µg) obtidas de folhas coletadas 24 h após o desafio com *P. atrosepticum* (GSD e GRD). PM: peso molecular; GS: controle; GSD: controle desafiado com a bactéria; GR: planta transgênica; GRD: planta transgênica desafiada com a bactéria.

Observamos que houve uma perda de material, possivelmente no processo de extração proteica. Percebemos também uma baixa amostragem de proteínas com elevado peso molecular, havendo um predomínio daquelas com peso abaixo de 45 kDa, com diferenças quantitativas visíveis em alguns polipeptídeos.

## 4.2. ANÁLISES REALIZADAS A PARTIR DAS ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS

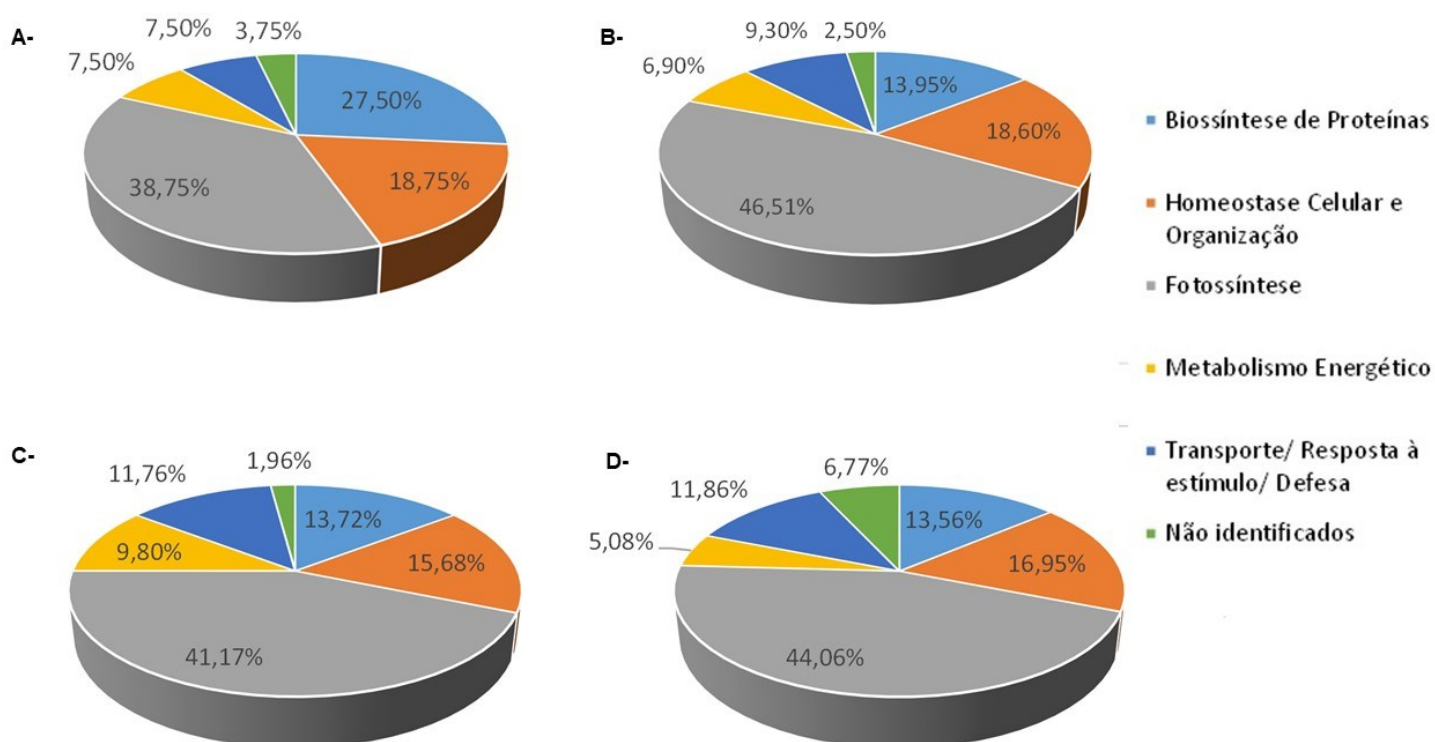
As folhas foram desafiadas com *P. atrosepticum* e após 24 h coletadas para a análise comparativa. O objetivo foi observar como se dá essa relação da planta com a bactéria, a partir das proteínas expressas.

Foram quatro grupos: plantas de genótipo susceptível (GS); plantas de genótipo susceptível desafiado (GSD); plantas de genótipo resistente (GR); e plantas de genótipo resistente desafiado (GRD). Os grupos foram comparados entre si. Na primeira comparação (GS:GRD:GR) foram identificados um total de 110 proteínas. Na segunda comparação (GS:GSD:GR) identificaram-se 103 proteínas. Com a terceira comparação (GS:GSD:GRD) foram identificadas 104 proteínas. Uma comparação feita entre os grupos desafiados (GR:GSD:GRD) identificou 82 proteínas (FIGURA 7).



**Figura 7.** Comparação entre os grupos, representado por um diagrama de Venn: (A): GS:GRD:GR; (B): GS:GSD:GR; (C): GS:GSD:GRD; (D): GR:GSD:GRD.

Todas as proteínas foram listadas em tabelas que estão nos apêndices. A identificação das proteínas foi realizada a partir da comparação da sequência de aminoácidos inferidos para os peptídeos ionizados com um arquivo contendo as proteínas preditas a partir do genoma de *N. benthamiana*, disponível em *SOLgenomics* (<https://solgenomics.net>). Elas foram separadas de acordo com a função biológica. Das proteínas que não foram identificadas pelo *SOLgenomics*, foram feitas buscas no *PFam*, porém mesmo assim, algumas continuaram sem identificação (FIGURA 8).



**Figura 8.** Proteínas identificadas em *N. benthamiana* e separadas de acordo com as funções celulares. Em A temos o grupo susceptível (GS); em B, as proteínas do grupo susceptível desafiado (GSD); em C as do grupo resistente (GR); e em D temos as proteínas identificadas do grupo resistente desafiado (GRD).

### **4.3. INFILTRAÇÃO DE CEPAS DE *Agrobacterium tumefaciens* TRANSFORMADAS EM FOLHAS DE *Solanum tuberosum* cv. Asterix E DESAFIO COM A FITOBACTÉRIA *Pectobacterium atrosepticum***

#### **4.3.1. VIRULÊNCIA DA *Pectobacterium atrosepticum* EM *Solanum tuberosum* cv. Asterix**

Foram três grupos experimentais: um grupo controle, um com água e o terceiro com a bactéria. Foram feitas quatro perfurações em cada tubérculo, e inoculados 1 mL/tubérculo de água no segundo grupo e 1mL da solução contendo a bactéria no terceiro grupo (FIGURA 9).

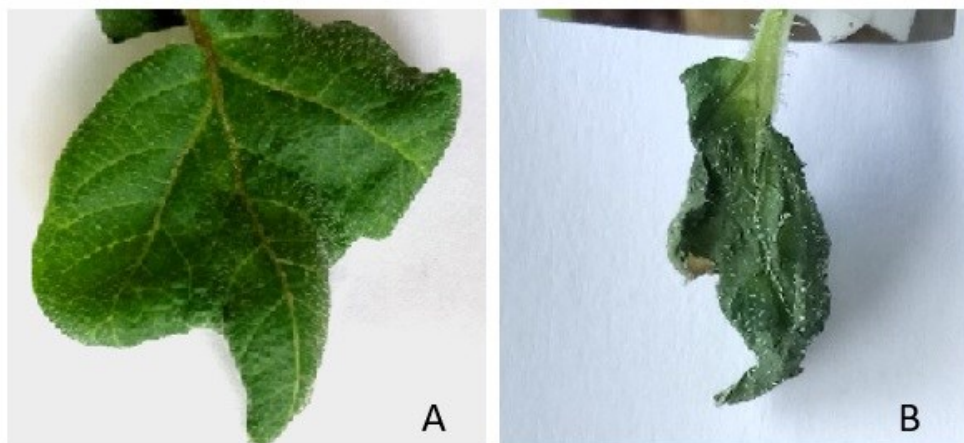
No primeiro grupo (A, B e C) não houve nenhum ponto de injeção; no segundo grupo (D, E e F) houve injeção com água; e no terceiro grupo (G, H, I e J) os tubérculos foram injetados com a solução bacteriana. Após cinco dias os tubérculos foram abertos, e como podemos observar na figura 8 nos tubérculos injetados com a solução bacteriana o tecido ficou totalmente destruído caracterizado por apodrecimento e murcha (I e J) quando comparado aos tubérculos usados como controle (C).



**Figura 9.** Desafio do tubérculo de *S. tuberosum* cv. Asterix com a fitobactéria. As bactérias foram injetadas nos tubérculos já higienizados, e após cinco dias foram analisados e fotografados. As imagens A, D e G mostram os tubérculos no dia da injeção. B, E e H correspondem aos tubérculos cinco dias depois do desafio, e C, F e I são os tubérculos cinco dias depois abertos. A, B e C correspondem aos tubérculos controle; D, E e F são os tubérculos inoculados com água; e G, H, I e J correspondem aos inoculados com *P. atrosepticum*.

#### **4.3.2. AVALIAÇÃO INICIAL DA SUSCEPTIBILIDADE DE *Solanum tuberosum* cv. Asterix À FITOBACTÉRIA *Pectobacterium atrosepticum***

Folhas de 4-6 semanas foram infiltradas apenas com a fitobactéria necrotrófica para acompanhar a progressão da doença. Essa observação aconteceu por sete dias. A figura 10 (A e B) mostra o resultado da infiltração, sendo a figura A no dia da infiltração, e a figura B referente a sete dias depois, mostrando a morte do tecido foliar, que é caracterizado pela murcha da folha.



**Figura 10.** Avaliação do aspecto fenotípico de folha de *S. tuberosum* cv. Asterix infiltrada com *P. atrosepticum*. Folha no momento após a infiltração (A). Observação sete dias após a infiltração com a fitobactéria, já com morte da folha (B).

#### **4.3.3. INFILTRAÇÃO DE CEPAS DE *Agrobacterium tumefaciens* CARREGANDO O CASSETE DE EXPRESSÃO DO GENE DomB EM FOLHAS DE *Solanum tuberosum* cv. Asterix DESAFIADAS COM A FITOBACTÉRIA *Pectobacterium atrosepticum***

As folhas de *S. tuberosum* cv. Asterix com 4 - 6 semanas foram infiltradas na face abaxial, em um volume de 1 mL por folha na condição experimental Agro-TCV-CP-DomB, na qual foram transformadas transitoriamente com os plasmídeos de 2 cepas de *A. tumefaciens*, uma carregando proteína do capsídeo de vírus (CP) e a outra o gene quimérico g2S2-6His-DomB (FIGURA 11).



**Figura 11.** Detalhes da infiltração em folhas de *S. tuberosum*. Folhas de *S. tuberosum* com 4 - 6 semanas foram infiltradas na condição Agro-TCV-CP-DomB, com 1 mL da solução por folha. O detalhe na imagem são os pontos de aplicação da seringa.

Após o quinto dia, as mesmas folhas foram desafiadas com 1 mL da fitobactéria *P. atrosepticum* e a evolução foi acompanhada por mais sete dias (FIGURA 12; A, B, C e D). Como mostrado na figura 9, de maneira comparativa com o desafio apenas com a bactéria fitopatogênica, observamos que não houve a morte total do tecido foliar, apesar de uma necrose no local da infiltração.



**Figura 12.** Desafio com *P. atrosepticum*. Após o quinto dia da primeira infiltração com Agro-TCV-CP-DomB, as mesmas folhas foram desafiadas com *P. atrosepticum* e a infecção foi observada por sete dias. As observações foram feitas no dia do desafio com a bactéria (A); no segundo dia do desafio (B); no sexto dia do desafio (C); e por fim no sétimo dia após o desafio (D).

#### **4.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GFP EM FOLHAS DE *Solanum tuberosum***

Notamos que a partir do terceiro dia já era possível observar a expressão de GFP no microscópio de epifluorescência, mas após sete dias da infiltração os níveis de fluorescência nas folhas de *S. tuberosum* cv. Asterix eram visualmente melhores. Das condições dispostas no experimento de agroinfiltração, as folhas infiltradas com Agro-TCV-CP-DomB observadas no microscópio emitiram

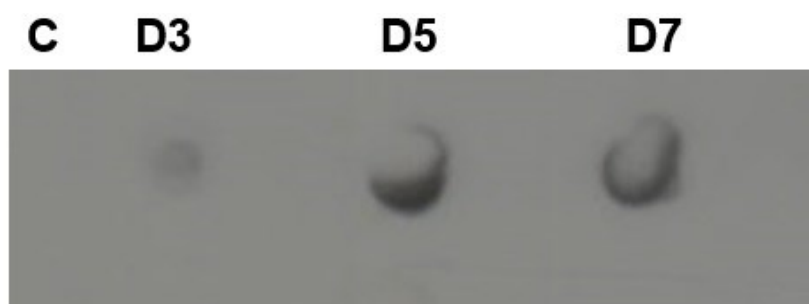
fluorescência verde sob UV, confirmando a expressão de GFP, sugerindo a expressão do gene de interesse como mostrado na imagem abaixo (FIGURA 13).



**Figura 13.** Avaliação da expressão do GFP em folhas de *S. tuberosum*. Em A, temos uma folha controle. As folhas infiltradas com Agro-TCV-CP-DomB foram observadas sete dias depois no campo claro (B), e UV por microscopia de epifluorescência (C), no aumento de 100 vezes.

#### 4.5. "DOT - BLOT" DE AMOSTRAS PROTEICAS DE FOLHAS DE *S. tuberosum* INFILTRADAS COM O GENE QUIMÉRICO

A expressão do gene quimérico foi observada no "Dot- Blot". Com esse experimento, a reatividade dos anticorpos anti-histidina com proteínas obtidas de folhas coletadas 3, 5 e 7 dias após a infiltração sob a condição experimental Agro-DomB foi observada em todas as amostras, comprovando a expressão do polipeptídeo quimérico p2-S2-6His-DomB (FIGURA 14). Essa expressão foi mais elevada nos dias 5 e 7 após a infiltração, e tal observação corroborou com as imagens no microscópio de epifluorescência (FIGURA 12) sugerindo a expressão do gene.



**Figura 14.** "DOT- BLOT". Em (C) planta agroinfiltrada com tampão MES. E as plantas agroinfiltradas com DomB no terceiro, quinto e sétimo dia respectivamente (D3, D5 e D7).



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. ANÁLISE PROTEÔMICA

As relações de microrganismos com as plantas afetam diretamente as respostas ao estresse. A essa relação, com conseqüente mudança a nível molecular, se deve a importância de integrar os novos conhecimentos ômicos (KISSOUDIS et al., 2014). A proteômica traduz parte da dinamicidade da célula. Essa técnica vem sendo utilizada para verificação de marcadores para diagnósticos, proteínas produzidas por uma planta sob condição de estresse, além de análise das proteínas produzidas em baixas ou maiores quantidades para produção de medicamentos (ASLAM et al., 2016). O método *shotgun* foi o utilizado no presente trabalho para obtermos o proteoma diferencial de folhas de *N. benthamiana* susceptível e resistente, sendo este transformado geneticamente com o gene sintético g2S26His-domB, quando desafiados com a bactéria *P. atrosepticum*.

As folhas de *Nicotiana* foram desafiadas com a *P. atrosepticum*, coletadas 24 h após o desafio e tripsinizadas para a análise comparativa. O objetivo foi observar como se dá a relação planta-bactéria, a partir das proteínas expressas identificadas.

Foram quatro grupos: plantas de genótipo susceptível (GS); plantas de genótipo susceptível desafiado (GSD); plantas de genótipo resistente (GR) e plantas de genótipo resistente desafiado (GRD).

Quando comparamos os grupos GS: GSD observamos uma redução de 64% na proporção de proteínas ligadas à fotossíntese. A redução nas proteínas ligadas à fotossíntese pode ser corroborada com trabalhos que mostram que em uma infecção por patógeno ocorre uma repressão dos genes fotossintéticos, para que a energia seja usada na defesa da planta. Esperava-se que as proteínas ligadas ao metabolismo aumentassem, porém, o número de proteínas ligadas ao metabolismo de carboidratos não aumentou no grupo GSD. Acreditamos que devido ao baixo número de proteínas identificadas tal observação não foi possível (BERGER et. al., 2004; HERBERS et. al., 2000). O número de proteínas ligadas ao fotossistema II identificadas nos grupos

desafiados (GSD e GRD), comparados ao grupo controle (GS), corrobora com os resultados obtidos por Jones (2006) que sugerem uma redução nas proteínas expressas do fotossistema II, durante a resposta de defesa à uma infecção bacteriana, mostrando que os mecanismos de resistência ou utilizam ou modificam esse fotossistema. Observamos que há uma redução da identificação de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RUBISCO), enzima que atua na fixação de carbono para futura produção de açúcar no ciclo de Calvin, nos grupos GSD, GR e GRD frente ao controle (GS), mais uma vez corroborando com a ideia de que ocorre uma redução dos processos de fotossíntese (ROJAS et. al., 2014).

Devido ao baixo número de proteínas identificadas ligadas ao metabolismo não poderemos relacioná-las com o desafio feito. Mesmo que a patogênese seja induzida por açúcares, a proporção dessas proteínas nos grupos GSD e GRD é a mesma.

O grupo controle (GS) teve algumas proteínas exclusivas, como é o caso das clatrininas. Estas são proteínas que revestem as vesículas celulares que carregam componentes de membrana e moléculas solúveis (BARACAT-PEREIRA et al., 2014). Essa é uma proteína muito importante para a cadeia de sinalização, pois é a partir dela que ocorre a endocitose dos receptores utilizados na cascata de sinalização, como os PRR's (MBENGUEA et. al., 2016). Por esse motivo, esperava-se que ela fosse identificada nos grupos desafiados (GSD e GRD). Contudo, possivelmente devido a baixas concentrações não houve sua identificação. Essa pode ser também a explicação para que a proteína glutaredoxina não tenha sido identificada nos grupos desafiados. Glutaredoxina é uma família de proteínas cuja localização é citosólica e que estão relacionadas à resposta à patógenos por meio da sinalização de ácido jasmônico e ácido salicílico (NDAMUKONG et. al., 2007). Além disso, estão envolvidas em respostas ao estresse oxidativo (ROUHIER et. al., 2008).

Arabinogalactano do tipo fasciclina é uma subclasse das proteínas arabinogalactano e também foi identificada apenas no grupo controle (GS). Testes realizados em *Arabidopsis* sugerem que essa proteína atua no crescimento e desenvolvimento da planta, desenvolvimento dos órgãos reprodutores masculinos da planta, adesão celular, formação da parede celular (ZANG et. al., 2015).

As cistatinas são inibidores competitivos de proteases de cisteína e tiveram sua primeira identificação na década de 1980 (ABE et al., 1988). Elas atuam desde o controle de proteólise endógena em órgãos vegetativos e reprodutivos até a inibição de proteases de cisteína extracelulares decorrentes de patógenos (BENCHABANE et. al., 2010).

Das proteínas exclusivas no grupo de plantas resistentes (GR) uma proteína do tipo tioredoxina foi identificada. Essa proteína já foi localizada no citosol ou no núcleo, e em plantas ela está relacionada a regulação de enzimas fotossintéticas (BUCHANAN, 1991). Em um trabalho feito em algodão (*Gossypium* spp.), os autores identificaram uma tioredoxina que aumentou a resposta de defesa contra um fungo (*Verticillium dahliae*) (LI et al., 2016). Em plantas, o papel dessa proteína na defesa ocorre na mudança conformacional de moléculas produzidas em um quadro de resistência adquirida local e sistêmica (SWEAT & WOLPERT, 2007).

Nesse mesmo grupo (GR) foram identificadas as proteínas DREPP que estão associadas ao transporte intercelular. Essa família de proteínas pode atuar no movimento de vírus que infectam plantas (GENG et al., 2015). Segundo o estudo de Meng e colaboradores (2018), proteínas da família DREPP estão sendo associadas à sinalização de resistência induzida por elicitores em *Nicotiana*. Por terem sido identificadas apenas no grupo de plantas resistente (GR) essas duas proteínas sugerem que uma sinalização de resistência está ocorrendo nas plantas resistentes, sendo de importância analisá-las nos próximos testes.

Uma proteína CPDK (calcium-dependent protein kinases), foi identificada apenas no grupo GRD, elas são proteínas que respondem aos níveis de cálcio. As CPDK's atuam em processos de sinalização do ácido abscísico nas células dos estômatos, e também para a imunidade desencadeada por padrões ou por efetores (PTI e ETI) da planta. Além disso novos aspectos estão sendo levantados sobre as diferentes vias que essa molécula é usada (BENDER et. al., 2018). Como essa proteína não foi identificada no outro grupo desafiado (GSD), sugere-se que a produção dessa proteína ocorreu em níveis mais elevados devido a inserção do gene exógeno, e não ao desafio com a pectobactéria.

Com as análises também podemos observar uma redução no número de proteínas relacionadas à biossíntese de proteínas e suas montagens dos grupos

GS, GR, GRD comparado ao GS. Isso pode retratar o fato de a planta passar a produzir mais moléculas voltadas à defesa. Porém foi identificada nos grupos resistentes e na condição susceptível (GS) proteínas ribossomais do tipo L12. Segundo o trabalho de Nagaraj e colaboradores (2016), quando o gene para essa proteína foi silenciado ocorreu um atraso na HR. Logo, mesmo sendo necessário novos estudos, podemos ver que a identificação dessa proteína sugere uma atuação no sistema de defesa da planta.

O número de chaperonas identificadas no grupo controle (GS) foi diferente em relação aos outros grupos, e este não era um resultado esperado, já que ao menos nos grupos desafiados (GSD e GRD) essas moléculas seriam recrutadas para a estabilização das proteínas durante sua montagem e secreção para uma resposta imune mais efetiva (ZIMARO et. al., 2011).

Não foi possível identificar muitas proteínas diferencialmente expressas nos grupos de planta resistente (GR e GRD), quanto ao sistema de defesa ou quanto ao metabolismo energético (carboidratos ou aminoácidos).

Como o número de proteínas identificadas foi baixo, essa pesquisa tem como perspectiva a repetição de mais réplicas. Porém com esses resultados preliminares conseguimos observar que com o desafio da bactéria na planta resistente, houve expressão de proteínas possivelmente relacionadas ao sistema de defesa. Tais resultados serão adicionados aos primeiros resultados obtidos por Quellis (2017).

## **5.2. EXPRESSÃO TRANSIENTE DO POLIPEPTÍDEO QUIMÉRICO p2S2-6His-DomB EM *Solanum tuberosum* cv. Asterix INDUZIDA POR AGROINFILTRAÇÃO E DESAFIO COM *Pectobacterium atrosepticum***

Inicialmente, nas infiltrações em folhas de *S. tuberosum* cv. Asterix na condição Agro-DomB, houve uma expressão do polipeptídeo quimérico p2S2-6His-DomB após três dias da infiltração, sendo que após cinco e sete dias a expressão aparentemente apresentou um nível mais elevado depois da infiltração inicial (FIGURA 10).

A bactéria *A. tumefaciens* GV3101 contendo o gene quimérico g2S2-6HisDomB foi infiltrada em folhas de *S. tuberosum* cv. Asterix. Junto com esta condição foi infiltrada também uma associação com a cepa EHA101 de *A. tumefaciens*

previamente transformada com a proteína de capsídeo (CP) do vírus TCV, sendo que tal associação tem como finalidade evitar um silenciamento pós-transcrição (LECKIE e STEWART, 2011).

Mesmo que a expressão do gene quimérico p2S2-6His-DomB tenha aparentemente aumentado até o sétimo dia de observação, é de interesse que a associação das diferentes cepas de *A. tumefaciens* transformadas seja feita, para permitir que a expressão prolongada do gene aconteça para o caso de uma transformação estável seguindo um dos objetivos do presente trabalho.

Após o experimento de infiltração com as cepas de *A. tumefaciens* em associação, a visualização do GFP sob luz UV por microscopia de epifluorescência sugere o funcionamento do plasmídeo inserido. Essa visualização foi possível devido a escolha do plasmídeo de expressão pk7WG2D-egfp-g2S2-6His-DomB, que possui a sequência da proteína GFP (green-fluorecent protein) ligada ao peptídeo sinal (EgfpER) que tem como alvo o retículo endoplasmático (KARIMI, INZÉ e DEPICKER, 2002), e teve seu pico no dia 7 após a infiltração.

As folhas na condição experimental Agro-TCV-CP-DomB, ambas expressando transitoriamente o polipeptídeo quimérico p2S2-6HisDomB, foram desafiadas com a bactéria fitopatogênica no dia 5 após a infiltração inicial. Sete dias após o desafio com a fitobactéria, não houve morte de todo tecido foliar, o que pôde ser constatado devido a coloração verde ter mantido nas folhas que não foram infiltradas, ficando claro que a infecção não se expandiu.

Com o passar dos dias, nos pontos de infiltração, observou-se clorose onde, possivelmente, ocorreu supressão de genes relacionados à fotossíntese, como um sinal inicial de defesa da planta (TRUMAN et. al, 2006; PRUSS et. al, 2008). O polipeptídeo desenvolvido apresenta características, decorrentes da região 2S2, que fazem dele uma opção para atuar sobre organismos invasores atuando na lise da parede celular, tais como 76% de hidrofobicidade, carga líquida +1, estrutura helicoidal e ligação dissulfeto, conforme previsto em análises de bioinformática (QUELLIS, 2017).

Quellis (2017) realizou testes de expressão transiente do gene quimérico g2S2-6His-DomB em *N. benthamiana* e *C. brevipes*, e se mostraram eficazes, sendo a inserção do gene confirmada pela expressão do GFP vista sob microscopia de epifluorescência, análise por Western - blot, além das atividades apirásicas.

Além disso, foi realizado pelo Laboratório de Genética junto com o Laboratório de Bioquímica a transformação estável de *N. benthamiana*, obtendo-se a geração R<sub>0</sub>.

Sendo a *N. benthamiana* uma planta modelo usada em diversos experimentos tais como para técnicas baseadas em vírus, como os VIGS; expressão de um transgene; ou funcionando como "biofábricas" ("biofactory") é possível que os resultados aqui mostrados sejam ampliados para outras espécies, incluindo as da mesma família, Solanaceae, que fazem parte tomate (*Solanum lycopersicum*), berinjela (*S. melongela*), pepino (*S. muricatum*), pimentas em geral e pimentão (*Capsicum* spp.), além da batata (*S. tuberosum*) (GOODIN et al. 2008; BALLY et al, 2018).

Com uma produção mundial de mais de uma tonelada em 2018 (SIDRA, IBGE 2018), a batata, em termos de consumo humano, é a terceira cultura mais importante, atrás do arroz e do trigo, sendo a China o maior consumidor. Estima-se que do aumento previsto na produção de alimentos em 20 anos, 50% seja da batata (CIP, 2018). Por isso, é interessante criar estratégias para evitar que perdas continuem acontecendo, já que 22% da produção anual mundial é perdida por infecções virais, bacterianas ou fúngicas.

A bactéria fitopatogênica *P. atrosepticum* é a principal responsável pela "podridão - mole" em tubérculos de batata. A lesão pode se iniciar pelas lenticelas, ou estolões, ou ainda por feridas nos tubérculos que, quando em condições úmidas podem se espalhar pelos outros tubérculos se estiver em um estoque. Se estiverem na presença de ar, podem desenvolver um odor desagradável devido a entrada de outros microrganismos. Se a bactéria estiver presente no solo, ela pode colonizar as raízes e se mover pelo próprio sistema vascular da planta (CZAJKOWSKI et al., 2010; 2011).

A infecção natural com bactérias necrotróficas pode ocorrer inicialmente de forma assintomática, sem causar danos significativos para a planta, até alcançar uma densidade populacional que pode disparar o "quorum sensing", promovendo a secreção de fatores de virulência, proliferação e progressão da doença (LIU et al., 2008; PÖLLUMAA et al., 2012; SOLA et al., 2012).

Visto que o sistema de secreção tipo III é o utilizado por bactérias patogênicas gram-negativas, é importante lembrar que a resposta de hipersensibilidade

gerada pelo patógeno na planta no local da infecção é uma estratégia que favorece a progressão da doença (DAVIDSSON et al., 2013).

Estes resultados, em conjunto, sugerem que ocorreu sinalização de defesa e houve a aquisição de uma resistência sistêmica naquelas plantas expressando transitoriamente o polipeptídeo quimérico p2S2-6His-DomB.

## 6. CONCLUSÕES

1. A partir da análise diferencial feita por nanoUPLC-MS<sup>E</sup> de parte do proteoma identificado, observamos que a planta transgênica de *N. benthamiana* está expressando proteínas que atuam no sistema de defesa quando submetidas ao desafio.

2. Da visualização de GFP nas folhas de *S. tuberosum* infiltradas com o gene g2S2-6His-DomB, além da expressão no "dot-blot" observamos que a expressão do plasmídeo esteja acontecendo.



## 7. PERSPECTIVAS

1. A partir das análises diferenciais prévias, o experimento de proteômica será realizado novamente com maior número de réplicas, e com uma nova metodologia para uma extração proteica otimizada.
2. A partir da expressão transiente do gene g2S26His-DomB, os próximos testes serão realizados para obtermos a expressão estável desse gene com a cultivar comercial de *S. tuberosum* Asterix, para assim desafiar contra a *P. atrosepticum*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUZUKI, K.; ARAI, S. 1988. The NH<sub>2</sub>-terminal 21 amino acid residues are not essential for the papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a member of the cystatin superfamily. *The journal of biological chemistry*, 263 (16), 7655-9.

AHMED, F. A.; ARIF, M.; ALVAREZ, A. M. 2017. Antibacterial effect of potassium tetraborate tetrahydrate against soft rot disease agent *Pectobacterium carotovorum* in tomato. *Frontiers in Microbiology*, 8.

AKSENOVA, N. P.; KONSTANTINOVA, T. N.; LOZHNIKOVA, V. N.; GOLYANOVSKAYA, S. A.; SERGEEVA, L. I. 2009. Interaction between day length and phytohormones in the control of potato tuberization in the in vitro culture. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56(4), 454–461.

ALEXANDERSSON, E.; MULUGETA, T.; LANKINEN, Å.; LILJEROTH, E.; ERIK ANDREASSON, E. 2016. Plant Resistance Inducers against Pathogens in Solanaceae Species—From Molecular Mechanisms to Field Application. *International Journal of Molecular Sciences Review*, 17, 1673.

ALIA, S.; GANAIB, B. A.; KAMILIB, A. N.; BHATC, A. A.; MIRA, Z. A.; BHATD, J. A.; TYAGIA, A.; ISLAME, S. T.; MUSHTAQD, M.; YADAVA, P.; RAWATA, S.; GROVERA, A. 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212-213, 29–37.

ASLAM, B.; BASIT, M.; NISAR, M. A.; KHURSHILD, M.; RASOOL, M. H. 2016. Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science*, 55(2): 182-196.

BALLY, J., JUNG, H., MORTIMER, C., NAIM, F., PHILIPS, J. G., HELLENS, R., BOMBARELY, A.; GOODIN, M. M.; Waterhouse, P. M. (2018). The Rise and Rise of *Nicotiana benthamiana*: A Plant for All Reasons. *Annual Review of Phytopathology*, 56(1), 405–426.

BARACAT-PEREIRA, M. C. et al. *Bioquímica de proteínas: fundamentos estruturais e funcionais*. 22. ed. Viçosa: Editora UFV. 2014.

BARI, R.; JONES, J. D. G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69:473–488.

BENCHABANE, M., SCHLÜTER, U., VORSTER, J., GOULET, M.-C., & MICHAUD, D. 2010. Plant cystatins. *Biochimie*, 92(11): 1657–1666.

BENDER, K. W.; ZIELINSKI, R. E.; HUBER, S. C. 2018. Revisiting paradigms of Ca<sup>2+</sup> signaling protein kinase regulation in plants. *Biochemical Journal*, 475(1), 207–223.

BENELLI, A.I.H.; DENARDIN, N.D.; FORCELINI, C.A.; DUARTE, V. reação de cultivares de batata à podridão mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*, por *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* e por *P. chrysanthemi*. Fitopatologia Brasileira, 29:155-159. 2004.

BERENS, M. L.; BERRY, H. M.; MINE, A.; ARGUESO, C. T.; TSUDA, K. 2017. Evolution of hormone signaling networks in plant defense. Annual Review of Phytopathology. 55:401-425.

BERGER, S.; PAPADOPOULOS, M.; SCHREIBER, U.; KAISER, W.; ROITSCH, T. 2004. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. Physiologia Plantarum 122: 419–428.

BIGEARD J., COLCOMBET J., AND HIRT H., 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (pti). Molecular Plant. 8, 521–539.

BOWDEN, S. D.; HALE, N.; CHUNG, J. C. S.; HODGKINSON, J. T.; SPRING, D. R.; WELCH, M. 2013. Surface swarming motility by *Pectobacterium atrosepticum* is a latent phenotype that requires an antigen and is regulated by quorum sensing. Microbiology, 159: 2375–2385.

BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annals of Biochemistry, 72:248.

BUCHANAN, B. B. 1991. Regulation of CO<sub>2</sub> Assimilation in Oxygenic Photosynthesis: The Ferredoxin/Thioredoxin System. Archives of Biochemistry and Biophysics, 288(1):1-9.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S, 2008. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. Química Nova, Vol. 31(3): 669-675.

CHAGAS, R. R. 2017. Reação de clones de batata tolerantes ao calor à pinta preta (*Alternaria* spp.), podridão mole (*Pectobacterium carotovorum*), PVY e PVX. Dissertação de mestrado do curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de mestre na área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

CHANDRASEKHAR, K.; DILEEP, A.; LEBONAH, D. E.; KUMARI, J. P. 2014. A short review on proteomics and its applications. International Letters of Natural Sciences, 17: 77-84.

CHANG, C.; BOWMAN, J. L.; MEYEROWITZ, E. M. 2016. Field Guide to Plant Model Systems. Cell, 167(2), 325–339.

CHISHOLM, S.T.; COAKER, G.; DAY, B.; STASKAWICZ, B.J. 2006. Host–Microbe Interactions: Shaping The Evolution Of The Plant Immune Response. Cell: 124: 803–814.

CHOI, H. W.; MANOHAR, M.; MANOSALVA, P.; TIAN, M.; MOREAU, M.; KLESSIG, D. F. 2016. Activation of plant innate immunity by extracellular high mobility group box 3 and its inhibition by salicylic acid. *Plos Pathogens*, 3: E1005518.

COIMBRA, E. S.; GONÇALVES-DA-COSTA, S. C.; COSTA, B. L. S.; GIAROLA, N. L. L.; REZENDE-SOARES, F. A.; FESSEL, M. R.; FERREIRA, A. P.; SOUZA, C. S. F.; ABREU-SILVA, A. L.; VASCONCELOS, E. G. 2008. A *Leishmania* (L.) *amazonensis* ATP diphosphohydrolase isoform and potato apyrase share epitopes: antigenicity and correlation with disease progression. *Parasitology*, 135:327-335.

CORNELIS, G. R. 2006. The type iii secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 811-825.

CZAJKOWSKI R, DE BOER WJ, VELVIS H, VAN DER WOLF J, 2010. Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. Biovar 3. *Phytopathology*, 100: 134-42.

CZAJKOWSKI, R.; PÉROMBELON, M. C. M.; VAN VEEN, J. A.; VAN DER WOLF, J. M. 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology*.

DALIO, R. J. D.; MAGALHAES, D. M.; ATILIO, L. B.; RODRIGUES, C. M.; BRETON, M. C.; PICH, S.; PASCHOLATI, S. F.; MACHADO, M. A. 2014. Efeitos nas Interações Planta-patógeno. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 22:25-68.

DAVIDSSON, P. R.; KARIOLA, T.; NIEMI, O.; PALVA, E. T. 2013. Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Frontiers in plant science*, 4:191.

DELEO, J. P. B.; CARDOSO, F. Especial Batata: Gestão sustentável. Custos de produção em alta nos últimos anos. *Hortifruti Brasil*. p. 8-24. Out. 2014.

DENANCÉ, N.; SÁNCHEZ-VALLET, A.; GOFFNER, D.; MOLINA, A. 2013. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science*, 4.

DETONI, M. L. 2015. Caracterização molecular e imunológica da nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (ntpdase 1) de *Leishmania amazonensis* e de seu domínio B. Tese de doutorado do curso de pós-graduação em ciências biológicas, para obtenção do título de doutor em ciências biológicas na área de concentração genética e biotecnologia.

DETONI, M. L.; FARIA-PINTO, P.; QUELLIS, L. R.; RUST, N. M.; TAVARES, L. S.; SANTOS, M. O.; ISAIAS, R. M. S.; SANTOS, J. C.; FERNANDES, G. W.; SOARES, G. L. G.; VASCONCELOS, E. G. 2012. Galls from *Calliandra brevipes* BENTH (Fabaceae: Mimosoidae): evidence of apyrase activity contribution in a plant-insect interaction. *Australian Journal of Botany*, 60:559–567.

DETONI, M. L.; FESSEL, M. R.; MAIA, A. C. R. G.; PORCINO, G. N.; QUELLIS, L. R.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E. G. 2013. An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ntpdase 1) is associated with disease progression in susceptible infected-mice. *Parasitology Research*, 112:2773-2782.

DU, J.; RIETMAN, H.; VLEESHOUWERS; V. G. A. A. 2014. Agroinfiltration and pvx agroinfection in potato and *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Visualized Experiments* (83), E50971.

EL TASSA, S. O. M.; DUARTE, V. 2004. Ocorrência de Pectobactérias em Tubérculos de Batata-Semente no Estado do Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira* 29:620-625.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019, 15 de janeiro. FAO Statistical Databases. Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M. N. L.; LENZI, H. L.; MOTA, E. M.; PENIDO, M. L. O.; COELHO, P. M. Z.; VASCONCELOS, E. G. 2004. ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* egg: characterization of a new antigen. *Parasitology*, 129:5157.

FARIA-PINTO, P.; MEIRELLES, M. N. L.; LENZI, H. L.; MOTA, E. M.; PENIDO, M. L. O.; COELHO, P. M. Z.; VASCONCELOS, E. G. 2006. Cross-immunoreactivity between anti-potato apyrase antibodies and mammalian atp diphosphohydrolases: potential use of the vegetal protein in experimental schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101:359-363.

FARIA-PINTO, P.; MENDES, R. G. P. R.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MAIA, A. C. R. G.; OLIVEIRA, A. A.; COELHO, P. M. Z.; VASCONCELOS, E. G. 2010A. Detection of igg1 and igg4 subtypes reactive against potato apyrase in schistosomiasis patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105:370-373.

FARIA-PINTO, P.; MONTESANO, M. A.; JACINTO, A. A.; SANTOS, R. S.; BORDIN, F. H. S, FERREIRA, A. P.; PENIDO, M. L. O.; COELHO, P. M. Z.; VASCONCELOS, E. G. 2010B. Antibody reactivity against potato apyrase, a protein that shares epitopes with schistosoma mansoni atp diphosphohydrolase isoforms, in acute and chronically infected mice, after chemotherapy and reinfection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105:374-379.

FARIA-PINTO, P.; REZENDE-SOARES, F. A.; MOLICA, A. M.; MONTESANO, M. A.; MARQUES, M. J.; ROCHA, M. O. C.; GOMES, J. A. S.; ENK, M. J.; CORREAOLIVEIRA, R.; COELHO, P. M. Z.; NETO, S. M.; FRANCO, O. L.; VASCONCELOS, E. G. 2008. Mapping of the conserved antigenic domains shared between potato apyrase and parasites atp diphosphohydrolases: potential application in human parasitic diseases. *Parasitology*, 135:943-953.

FISCHER, R.; STOGER, E.; SCHILLBERG, S.; CHRISTOU, P.; TWYMAN, R.M. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current opinion in plant biology*, 7: 152-158.

GARDAN, L.; GOUY, C.; CHRISTEN, R.; SAMSON, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2:381-91.

GENG, C.; CONG, Q.; LI, X.; MOU, A.; GAO, R.; LIU, J.; TIAN, Y. 2015. DEVELOPMENTALLY REGULATED PLASMA MEMBRANE PROTEIN of *Nicotiana benthamiana* contributes to Potyvirus movement and transports to plasmodesmata via the early secretory pathway and the actomyosin system. *Plant Physiology*, 167: 394–410.

GEROMANOS, S. J.; VISSERS, J. P. C.; SILVA, J.C.; DORSCHER, C. A.; LI, G-Z.; GORENSTEIN, M. V.; BATEMAN, R. H.; LANGRIDGE, J. I. 2009. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics*, 9: 1683–95.

GOMEZ-GOMEZ, L.; BOLLER, T. 2000. FLS2: An Irr receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 5: 1003–1011.

GOMEZ-ROLDAN, V.; FERMAS, S.; BREWER, P. B.; PUECH-PAGE'S, V.; DUN, E. A.; PILLOT, J.; LETISSE, F.; MATUSOVA, R.; DANOUN, S.; PORTAIS, J.; BOUWMEESTER, H.; BÉCARD, G.; BEVERIDGE, C. A.; RAMEAU, C.; ROCHANGE, S. F. 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455(7210), 189–194.

GOODIN, M. M., ZAITLIN, D., NAIDU, R. A.; LOMMEL, S. A. 2008. *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 21:1015-1026.

GRANT, M.; LAMB, C. 2006. Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 414–420.

HANDA, M.; GUIDOTTI, G. 1996. Purification and cloning of soluble atp diphosphohydrolase (apyrase) from potato tuber (*Solanum tuberosum*). *Biochemical and biophysical research communication*, 218:916-923.

HAVERKORT, A. J.; VERHAGEN, A. 2008. Climate change and its repercussions for the potato supply chain. *Potato Research*. v. 51. n. 3-4. p. 223-237.

HERBERS, K.; TAKAHATA, Y.; MELZER, M.; MOCK, H. P. HAJIREZAEI, M.; SONNEWALD, U. 2000. Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Molecular Plant Pathology*, 1: 51-59.

HOU, S.; JAMIESON, P.; HE, P. 2018. The cloak, dagger, and shield: proteases in plant–pathogen interactions. *Biochemical Journal*, 475(15), 2491–2509.

JIANG, L.; MOUSAWI, F.; YANG, X.; ROGER, S. ATP-induced Ca<sup>2+</sup>-signalling mechanisms in the regulation of mesenchymal stem cell migration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74:3697–3710, 2017.

JONES, A.M. E.; THOMAS, V.; BENNETT, M. H.; MANSFIELD, J.; GRANT, M. 2006. Modifications to the Arabidopsis Defense Proteome Occur Prior to Significant Transcriptional Change in Response to Inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology*, Vol. 142: 1603–1620.

JONES, J. D. G; DANGL, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature Reviews*, 444: 323-329.

KISSOUDIS, C.; deWIEL C., V.; VISSER, R., G., F.; LINDEN, G. V. D. 2014. Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Frontiers in Plant Science*, 5: 1-20.

KRENEK, P.; SAMAJOVA, O.; LUPTOVCIK, I.; DOSKOCILOVA, A.; KOMIS, G.; SAMAJ, J. 2015. Transient Plant Transformation Mediated By *Agrobacterium Tumefaciens*: Principles, Methods And Applications. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1024–1042.

LAI, H.; HE, J.; ENGLE, M.; DIAMOND, M. S.; CHEN, Q. 2011. Robust production of virus-like particles and monoclonal antibodies with geminiviral replicon vectors in lettuce. *Plant Biotechnology Journal*, 10(1), 95–104.

LECKIE, B. M; STEWART, C. N. 2011. Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating candidate insect resistance transgenes in plants. *Plant Cell Reports*, 30:325–334.

LEUZINGER, K.; DENT, M.; HURTADO, J.; STAHNKE, J.; LAI, H.; ZHOU, X.; CHEN, Q. 2013. Efficient Agroinfiltration of Plants for High-level Transient Expression of Recombinant Proteins. *Journal of Visualized Experiments*, 77: e 50521.

LI, S.; TANG, H. 2016. Computational Methods in Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Translational Biomedical Informatics*, 939: 63–89.

LI, Y.-B.; HAN, L.-B.; WANG, H.-Y.; ZHANG, J.; SUN, S.-T.; FENG, D.-Q.; YANG, X.-L.; SUN, Y.-D.; ZHONG, N.Q.; XIA, G.-X. 2016. The Thioredoxin GbNRX1 Plays a Crucial Role in Homeostasis of Apoplastic Reactive Oxygen Species in Response to *Verticillium dahliae* Infection in Cotton. *Plant Physiology*, 170(4): 2392–2406.

LIU, H.; COULTHURST, S. J.; PRITCHARD, L.; HEDLEY, P. E.; RAVENSDALE, M.; HUMPHRIS, S.; BURR, T.; TAKLE, G.; BRURBERG, M. B.; BIRCH, P. R. J.;

SALMOND, G. P. C.; TOTH, I. K. 2008. Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLOS Pathogens*, 4: e1000093.

LUNA, E.; PASTOR V.; ROBERT J.; FLORS V.; MAUCH-MANI B.; TON J. 2011. Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular Plant Microbe Interactions Journal*, 24:183–193.

MAIA, A. C. R. G., DETONI, M. L., PORCINO G. N., SOARES, T. V., GUSMÃO, M. A. N., FESSEL, M. R., MARQUES M. J., SOUZA. M. A., COELHO, P. M. Z., ESTANISLAU, J. A. S. G., ROCHA M. O. C., SANTOS, M. O., PINTO P. F., VASCONCELOS, E. G. 2011. Occurrence of a conserved domain in ATP 169 diphosphohydrolases from pathogenic organisms associated to antigenicity in human parasitic diseases. *Developmental & Comparative Immunology*, 35:1057–1065.

MAIA, A. C. R. G.; PORCINO, G. N.; DETONI, M. D.; EMIDIO, N. B, MARCONATO D. G.; FARIA-PINTO, P.; FESSEL, M. R.; REIS, A. B.; JULIANO, L. J.; JULIANO, M. A.; MARQUES, M. J.; VASCONCELOS, E. G. 2013. An antigenic domain within a catalytically active *Leishmania infantum* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ntpdase 1) is a target of inhibitory antibodies. *Parasitology International*, 62:4452.

MANSFIELD, J.; GENIN, S.; MAGORI, S.; CITOVSKY, V.; SRIARIYANUM, M.; RONALD, P.; DOW, M.; VERDIER, V.; BEER, S. V.; MACHADO, M. A.; TOTH, I.; SALMOND, G.; FOSTER, G. D. 2012. Top 10 Plant Pathogenic Bacteria in *Molecular Plant Pathology*. *Molecular Plant Pathology*, 13:614–629.

MATTINEN, L.; SOMERVUO, P.; NYKYRI, J.; NISSINEN, R.; KOUVONEN, P.; CORTHALS, G.; AUVINEN, P.; AITTAMAA, M.; VALKONEN, J.P.T.; PIHONEN, M. 2008. Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type vi secretion cluster in the potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbiology*, 154: 2387–2396.

MBENGUEA, M.; BOURDAISA, G.; GERVASIA, F.; BECKA, M.; ZHOU, J.; SPALLEKA, T.; BARTELSC, S.; BOLLERC, T.; UEDADE, T.; KUHNA, H.; ROBATZEK, S. 2016. Clathrin-dependent endocytosis is required for immunity mediated by pattern recognition receptor kinases. *PNAS*, 113: 11034–11039.

MENDES, R. G. P. R.; GUSMÃO, M. A. N. G.; MAIA. A. C. R. G.; DETONI, M. L.; PORCINO, G. N.; SOARES, T. V.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. J.; COELHO, P. M.; LENZI, H. L.; FARIA-PINTO, P.; VASCONCELOS, E. G. 2011. Immunostimulatory property of a synthetic peptide belonging to the soluble ATP diphosphohydrolase isoform (SmATPDase 2) and immunolocalization of this protein in the *Schistosoma mansoni* egg. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106:808-813.

MENG, F.; XIAO, Y.; GUO, L.; ZENG, H.; YANG, X.; QIU, D. 2018. A DREPP protein interacted with PeaT1 from *Alternaria tenuissima* and is involved



in elicitor-induced disease resistance in *Nicotiana* plants. *Journal of Plant Research*, 131(5): 827–837.

MILLER, R. N. G.; COSTA ALVES, G. S.; VAN SLUYS, M.-A. 2017. Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of Botany*, 119(5), 681–687.

MINE, A.; SATO, M.; TSUDA, K. 2014. Toward a systems understanding of plant–microbe interactions. *Frontier in Plant Science*, 5.

NAGARAJ, S.; KUMAR, M. S.; RAMU, V. S.; WANG, K.; MYSORE, K. S. 2016. Plant ribosomal proteins, RPL12 and RPL19, play a role in nonhost disease resistance against bacterial pathogens. *Frontier in Plant Science*, 6: 1192.

NAKAYASU, E. S.; NICORA, C. D.; SIMS, A. C.; BURNUM-JOHNSON, K. E.; KIM, Y.-M.; KYLE, J. E.; MATZKE, M. M.; SHUKLA, A. K.; CHU, R. K.; SCHEPMOES, A. A.; JACOBS, J. M.; BARIC, R. S.; WEBB-ROBERTSON, B.-J.; SMITH, R. D.; METZ, T. O. 2016. MPLEX: A robust and universal protocol for single-sample integrative proteomic, metabolomic, and lipidomic analyses. *Msystems* 1(3): E00043-16.

NANS, A.; KUDRYASHEV, M.; SAIBIL, H. R.; HAYWARD, R. D. 2015. Structure of a Bacterial Type III Secretion System in Contact With a Host Membrane In Situ. *Nature Communications*, 6(1).

NDAMUKONG, I.; ABDALLAT, A. A.; THUROW, C.; FODE, B.; ZANDER, M.; WEIGEL, R.; GATEZ, C. 2007. SA-inducible *Arabidopsis* glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive *PDF1.2* transcription. *The Plant Journal*, 50:128–39.

NOTTI, R. Q.; STEBBINS, C. E. 2016. The structure and function of type iii secretion systems. *Microbiology Spectrum*, 4(1): VMBF-0004-2015.

OH, H. S.; COLLMER, A. 2005. Basal resistance against bacteria in *Nicotiana benthamiana* leaves is accompanied by reduced vascular staining and suppressed by multiple *Pseudomonas syringae* type iii secretion system effector proteins. *The Plant Journal*, 44:348-359.

OLIVEIRA, B. M.; COORSEN, J. R.; MARTINS-DE-SOUZA, D. 2014. 2DE: The Phoenix of Proteomics. *Journal of Proteomics*, 104, 140–150.

OSBOURN, A. E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8, 1821–1831.

PANDA, P.; VANGA, B. R.; LU, A.; FIERS, M.; FINERAN, P. C.; BUTLER, R.; ARMSTRONG, K.; RONSON, C. W.; PITMAN, A.R. 2016. *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* Harbor Distinct, Independently Acquired Integrative and Conjugative Elements Encoding Coronafacic Acid that Enhance Virulence on Potato Stems. *Frontiers in Microbiology*, 7:397.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. 2003. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics*, 33: 311-323.

PEREIRA, A. S. 2011. A evolução da batata no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA. 51. Horticultura Brasileira 29. Viçosa: ABH. p. 5701-5710. 2011.

PÉROMBELON, M. C. M. 2002. Potato Diseases Caused by Soft Rot Erwinias: an Overview of Pathogenesis. *Plant Pathology*, 51, 1–12.

PÖLLUMAA, L.; ALAMÄE, T.; MÄE, A. 2012. Quorum sensing and expression of virulence in pectobacteria. *Sensors Journal*, 12:3327-3349.

PORCINO, G. N.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MAIA, A. C. R. G.; DETONI, M. L.; FARIA-PINTO, P.; COIMBRA, E. S.; MARQUES, M. J.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; DINIZ, V. A.; CORTE-REAL, S.; VASCONCELOS, E. G. 2012. *Leishmania* (viannia) *braziliensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (ntpdase 1): localization and in vitro inhibition of promastigotes growth by polyclonal antibodies. *Experimental Parasitology*, 132:293-299.

PORTALIOU, A.G.; TSOLIS, K. C.; LOOS, M. S.; ZORZINI, V.; ECONOMOU, A. 2016. Type iii secretion: building and operating a remarkable nanomachine. *Trends in Biochemical Sciences*, 41: P175-189.

PRUSS, G. J.; NESTER, E. W.; VANCE, V. 2008. Infiltration with *Agrobacterium tumefaciens* Induces Host Defense and Development-Dependent Responses in the Infiltrated Zone. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(12) 1528–1538.

QUELLIS, L. 2013. Isolamento e localização imunohistoquímica de apirase de galha globosa de *Calliandra brevipes* BENTH (fabaceae: mimosoidae) usando anticorpos contra ntpdases e seu domínio B conservado. Dissertação de mestrado do curso de pós-graduação em ciências biológicas, para obtenção do título de mestre em ciências biológicas na área de concentração genética e biotecnologia.

QUELLIS, L. 2017. Caracterização molecular de um domínio da proteína apirase nos mecanismos de defesa de planta. Tese de doutorado do curso de pós-graduação em ciências biológicas, para obtenção do título de doutor em ciências biológicas na área de concentração genética e biotecnologia.

RAJA, K.; PATRICK, M.; GAO, Y.; MADU, D.; YANG, Y.; TSOI, L. C. 2017. A Review of Recent Advancement in Integrating Omics Data with Literature Mining towards Biomedical Discoveries. *International Journal of Genomics*, 2017: 1–10.

REZENDE-SOARES, F. A.; CARVALHO-CAMPOS, C.; MARQUES, M. J.; PORCINO, G. N.; GIAROLA, N. L.; COSTA, B. L.; TAUNAY-RODRIGUES, A.; FARIA-PINTO, P.; SOUZA, M. A.; DINIZ, V. A.; CORTE-REAL, S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; VASCONCELOS, E. G. 2010. Cytochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigotes and

identification of an antigenic and catalytically active isoform. *Parasitology*, 137:773- 783.

RIEWE, D.; GROSMAN, L.; FERNIE, A. R.; WUCKE, C.; GEIGENBERGER, P. The potato-specific apyrase is apoplastically localized and has influence on gene expression, growth, and development. *Plant Physiology*, 147: 1092–1109, 2008.  
ROJAS, C. M.; KUMAR, M. S.; TIZIN V.; MYSORE, K. S. 2014. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science*, v. 5: 1-12.

ROUHIER, N.; LEMAIRE, S. D.; JACQUOT, J. 2008. The Role of Glutathione in Photosynthetic Organisms: Emerging Functions for Glutaredoxins and Glutathionylation. *The Annual Review of Plant Biology*, 59:143–66.

SAIJO, Y.; LOO, E. P.; YASUDA, S. 2018. Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. *The Plant Journal*, 93(4), 592–613.

SANSOM, F. M. 2012. The role of the NTPDase enzyme family in parasites: what do we know, and where to from here? *Parasitology*, 139:963–980.

SCHILLBERG, S.; TWYMAN, R. M.; FISCHER, R. 2005. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants technology assessment. *Vaccine*, 23(15): 1764–1769.

SHOJI, T.; HASHIMOTO, T. 2011. Tobacco *myc2* regulates jasmonate-inducible nicotine biosynthesis genes directly and by way of the *nic2*-locus *erf* genes. *Plant and Cell Physiology*, 52(6), 1117–1130.

SILVA, M. S.; ARRAES, F. B. M.; CAMPOS, M. A.; GROSSI-DE-SA, M.; FERNANDEZ, D.; CÂNDIDO, E. S.; CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L.; GROSSI-DE-SA, M. F. 2018. Potential biotechnological assets related to plant immunity modulation applicable in engineering disease-resistant crops. *Review Plant Science*, 270: 72-84.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; MENDONÇA, E. G.; GOMES, A. P.; VITORINO, R. R.; MIYADAHIRA, R.; ALVAREZ-PEREZ, M. C.; OLIVEIRA, M. G. A. 2011. Atualidades proteômicas na sepse. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 58(3):376-382.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. 2012. Mecanismos de quorum sensing e sua relevância na microbiologia de alimentos. *Enciclopédia Biosfera*, 8(14):1419-1441.

SOURROUILLE, C.; BLOUIN, E. M.; D'AOUST, M. A.; MEYER, M. C. K.; SEVENO, M.; SALEHABADI, S. P.; BARDOR, M.; DURAMBUR, G.; LEROUGE, P.; VEZINA, L.; GOMORD, V. 2008. Down-regulated expression of plant-specific glycoepitopes in alfalfa. *Plant Biotechnology Journal*, 6: 702-721.

STOGER, E.; SACK, M.; PERRIN, Y.; VAQUERO, C.; TORRES, E.; TWYMAN, R. M.; CHRISTOU, P.; FISCHER, R. 2000. Practical considerations for

pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Molecular Breeding*, 9:149-158.

SWEAT, T. A.; WOLPERT, T. J. 2007. Thioredoxin h5 is Required for Victorin Sensitivity Mediated by a CC-NBS-LRR gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 673–687.

TAKÁČ, T., VADOVIČ, P., PECHAN, T., LUPTOVČIAK, I., ŠAMAJOVÁ, O., & ŠAMAJ, J. 2016. Comparative proteomic study of *Arabidopsis* mutants *mpk4* and *mpk6*. *Scientific Reports*, 6(1).

TANG, W., BRADY, S.R., SUN, Y., MUDAY, G., ROUX, S.J., 2003. Extracellular atp inhibits root gravitropism at concentration that inhibit polar auxin transport. *Plant Physiology*. 131, 147–154.

TIWARI, S.; VERMA, P. C.; SINGH, P.K.; TULI, R. Plants as Bioreactors for the Production of Vaccine Antigens. *Biotechnology Advances*, 27: 449–467, 2009.  
TODESCO, M.; DE FELIPPES, F. F. 2016. Why Benthamiana Went Viral. *Trends in Plant Science*, 21(1), 4–6.

TRUMAN, W.; DE ZABALA, M. T.; GRANT, M. 2006. Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *The Plant Journal*, 46:14-33.

TRUONG, D-H.; NGUYEN, H. C.; BAUWENS, J.; MAZZUCHELLI, G.; LOGNAY, G.; FRANCIS, F. 2018. Plant defense in response to chewing insects: proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* damaged by *Plutella xylostella*. *Journal of Plant Interactions*, 13:1, 30-36.

TULI, L.; RESSOM, H. W. 2009. LC–MS Based Detection of Differential Protein Expression. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 2:416-438.

UMEHARA, M.; HANADA, A.; YOSHIDA, S.; AKIYAMA, K.; ARITE, T.; TAKEDAKAMIYA, N.; MAGOME H.; KAMIYA, Y.; SHIRASU, K.; YONEYAMA, K.; KYOZUKA, J.; YAMAGUCHI, S. 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455(7210), 195–200.

VANETTEN, H.D.; MANSFIELD, J.W.; BAILEY, J.A.; FARMER, E.E. 1994. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoanticipins. *Plant Cell* 6, 1191–1192.

VASCONCELOS, E. G.; FERREIRA, S. T.; CARVALHO, T. M.; SOUZA, W.; KETTLUN, A. M.; MANCILLA, M.; VALENZUELA, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. 1996. Partial purification and immunohistochemical localization of atp diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *Journal of Biological Chemistry*, 271:22139–22145.

VASCONCELOS, E. G. ; SANTOS, M. O. ; QUELLIS, L. R. ; MAIA, ANA CAROLINA RIBEIRO GOMES ; FARIA-PINTO, PRISCILA ; PORCINO, GABRIANE NASCIMENTO ; DETONI, MICHELLE LIMA . GENE E POLIPEPTÍDEO QUIMÉRICOS PARA DEFESA DE PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS. 2017, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201700439, título: "GENE E POLIPEPTÍDEO QUIMÉRICOS PARA DEFESA DE PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 06/03/2017.

VITALE, S.; ALBERINO, S.; ZOINA, A.; PARISI, B.; CORAZZA, L. 2004. Evaluation of resistance to dry and soft rot of potato clones adapted to Mediterranean regions. *Phytopathology Polish* 34: 13-20.

WINDSOR, B., ROUX, S.J., LLOYD, A., 2003. Multiherbicide tolerance conferred by atpgp1 and apyrase overexpression in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*. 21, 428–433.

WUJAK, M.; BANACH, M.; POROWINSKA, D.; PISLULAK, K.; KOMOSZYNSKI, M. 2013. Isolation and bioinformatic analysis of seven genes encoding potato apyrase. Bacterial overexpresssion, refolding and initial kinetic studies on some recombinant potato apyrases. *Phytochemistry*, 93: 8–17.

ZALUZEC, E. J.; GAGE, D. A.; WATSON, J. T. 1995. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry: Applications in Peptide and Protein Characterization *Protein Expression and Purification*, (2): 109-123.

ZANG, L.; ZHENG, T.; SU, X. 2015. Advances in research of fasciclin-like arabinogalactan proteins (FLAs) in plants. *Plant Omics Journal*, 8(2):190-194.

ZHOU, X.; TEPER, D.; ANDRADE, M.O.; ZHANG, T.; CHEN, S.; SONG, W-Y.; WANG, N. 2018. A phosphorylation switch on lon protease regulates bacterial type iii secretion system in host. *MBio* 9: E02146-17.

ZIMARO, T.; GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; GEHRING, C.; OTTADO, J. 2011. Unraveling Plant Responses to Bacterial Pathogens through Proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

## APÊNDICE A - PROTEÍNAS DA GRUPO SUSCEPTÍVEL (GS)

Acesso	Descrição	Score	Massa (kDa)	Tamanho (aa)
<b>METABOLISMO CLOROPLÁSTICO</b>				
NbS00002520g0008.1	Precursor do cloroplasto PsbP2 GN=PSBP2	4233,342	37,737	340
NbS00010454g0009.1	Proteína potenciadora 1 GN=PSBO	9111,219	35,679	333
NbS00032545g0003.1	Precursor de cloroplasto PsbO1 GN=PSBO	8906,503	35,484	332
NbS00019085g0006.1	Subunidade do centro de reação IV B do fotossistema I GN=PSAEB	7088,749	15,272	143
NbC23666742g0001.1	Subunidade de 33 kDa de proteína fotossintética GN=PSBO	6559,297	9,081	83
NbS00003075g0011.1	Subunidade do centro de reação IV B do fotossistema I GN=PSAEB	4475,415	15,254	143
NbS00028820g0007.1	Precursor de cloroplasto PsbP1 GN=PSBP2	4214,928	27,584	251
NbS00013563g0003.1	Precursor de cloroplasto PsbQ1 GN=PSBQ2	4193,737	22,309	212
NbS00023265g0002.1	Plastocianina GN=PETE	1041,012	17,08	169
NbS00007132g0019.1	Precursor de cloroplasto PsbP3 GN=PSBP1	794,2766	28,791	268
NbS00012460g0007.1	Proteína PSB28 do centro de reação do Fotossistema II GN=PSB28	754,2607	13,013	115
NbS00012843g0001.1	Plastocianina GN=PETE	694,7875	17,069	167
NbS00007371g0002.1	Proteína 19 kDa do lúmen do tilacoide GN=At3g63540	514,1743	26,737	245
NbS00008180g0001.1	Proteína do lúmen do tilacoide GN=At1g03600	501,2461	18,789	171
NbS00011475g0119.1	Proteína 15 kDa do lúmen do tilacoide	463,799	22,053	207
NbS00004085g0015.1	Proteína de ligação CP26 à pigmentos do cloroplasto GN=LHCB5	456,5195	23,609	225
NbS00038432g0004.1	Subunidade IV A do centro de reação do Fotossistema I GN=PSAEA	373,8653	15,167	141

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
NbS00000987g0004.1	Proteína de ligação clorofila a/b GN=CAB16	307,3651	28,381	266
NbS00024617g0001.1	Fosfoproteína do tilacoide	7686,919	12,072	115
NbS00010560g0001.1	Plastocianina GN=PETE1	760,2091	17	167
NbS00014580g0005.1	Proteína de ligação clorofila a/b GN=CAB21	381,2267	24,949	231
NbC23760399g0001.1	Subunidade envolvida no fotossistema II GN=PSBP3	2502,08	7,587	67
NbS00008079g0001.1	Proteína PSB28 do centro de reação do fotossistema II GN=PSB28	768,3552	13,013	115
NbS00030369g0003.1	Precursor da plastocianina GN=PETE	517,9934	17,212	167
NbS00010452g0020.1	Precursor de cloroplasto PsbP4 GN=PSBP1	210,4724	28,723	268
NbS00007503g0101.1	Proteína CP12 do ciclo de Calvin	4701,576	14,518	132
NbS00009714g0011.1	Ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase ativase 2 GN=RCA	1679,927	45,511	410
NbS00029393g0012.1	Ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase ativase 1	1583,386	49,26	444
NbS00047753g0001.1	Subunidade maior de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase GN=rbcL	1444,127	13340	115
NbS00041372g0009.1	Cadeia menor 8B da ribulose bifosfato carboxilase GN=RBCS	602,4002	15,419	137
NbS00039233g0002.1	Proteína CP12-2 do ciclo de Calvin GN=CP12-2	5922,763	14,576	132
<b>BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS/MONTAGEM/DOBRADURA/ DEGRADAÇÃO</b>				
NbS00060544g0003.1	Chaperonina GN=CPN10	6203,803	10,46	97
NbS00034791g0001.1	Chaperonina-60 subunidade beta GN=CPN60B2	3687,163	64,629	608

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
NbS00022563g0002.1	Chaperonina 60 Subunidade beta 3 GN=CPN60B3	2939,746	16,002	151
NbS00020081g0001.1	Proteína ribossomal R12	2374,204	19,713	186
NbS00016026g0011.1	Fator de reciclagem de ribossomo GN=RRF	1154,54	32,747	289
NbS00033212g0005.1	Fator de reciclagem de ribossomo GN=RRF	1144,163	32,799	287
NbS00008178g0018.1	Histona H2A	749,9692	15,533	148
NbS00036543g0002.1	Precursor chaperonina 21 GN=CPN21	392,9118	26,53	252
NbS00023692g0003.1	Proteína ribossomal 30S GN=PSRP2	242,0827	27,752	253
NbS00012273g0005.1	Precursor chaperonina 21 GN=CPN21	237,5489	26,223	249
NbS00013225g0002.1	Fator Ts de alongamento factor Ts GN=tsf	215,6903	115,484	1054
NbS00045137g0002.1	Histona H2A variante 1 GN=H2AV	202,2041	12,217	113
NbS00027048g0006.1	Fator 5A-1/2 de iniciação da tradução GN=EIF5A1	182,1763	17,654	160
NbS00000215g0010.1	Chaperonina Cpn60 GN=CPN60B1	5,639	64,889	605
NbS00007027g0009.1	Chaperonina Cpn60	29,4129	64,72	605
NbS00025848g0007.1	Fator Ts de alongamento GN=tsf	35,0708	120,944	1101
NbS00020235g0008.1	Histona H2A	587,3674	15,48	148
NbS00011019g0013.1	Fator 4G de iniciação da tradução GN=EIF4G	165,8616	190,484	1723
NbS00005183g0002.1	Subunidade beta chaperonina 60	2393,328	64,797	607
NbS00003380g0001.1	Proteína ribossomal L12-1A GN=RPL12	1496,879	19,688	187



<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
NbS00019153g0015.1	Cadeia pesada clatrina GN=CHC2	335,6384	157,262	1387
NbC23375122g0001.1	Cadeia pesada clatrina GN=CHC2	311,1047	8,222	72
<b>HOMEOSTASE CELULAR E ORGANIZAÇÃO</b>				
NbS00032966g0002.1	Proteína 9 arabinogalactano do tipo fasciclina GN=FLA9	243,6443	27,007	251
NbS00000109g0019.1	Remorina	203,2902	23,231	210
NbS00006907g0117.1	Tipo 1 ubinucleína	150,6587	102,462	927
NbS00000459g0004.1	Subunidade 4 do proteossoma regulatório não-ATPase GN=MBP1	333,356	42,565	400
NbS00000328g0015.1	Subunidade 4 do proteossoma regulatório não-ATPase GN=MBP1	241,4168	42,707	400
NbS00017079g0006.1	PREDICTED: fruit protein pKIWI501-like [Nicotiana tomentosiformis].	6903,604	8,756	87
NbS00013211g0008.1	PREDICTED: major latex allergen Hev b 5-like [Nicotiana tabacum].	3639,835	16,272	157
NbS00035818g0017.1	PREDICTED: induced stolen tip protein TUB8-like [Nicotiana tabacum]	3761,24	14,503	142
NbS00045664g0003.1	PREDICTED: fruit protein pKIWI501-like [Nicotiana tomentosiformis].	1646,976	8,406	85
NbC26053601g0004.1	Superoxido dismutase GN=SODCC	3363,176	13,047	128
NbS00046406g0006.1	Superoxido dismutase GN=SODCP	1044,119	22,691	220
NbS00034633g0005.1	Superoxido dismutase GN=SODCP	1248,847	22,373	215
NbS00026008g0003.1	Receptor extracelular sensível ao cálcio GN=CAS	346,2576	41,983	394
NbS00008191g0001.1	Cistatina - Inibidor de proteinase	592,9184	4,096	38
NbS00022632g0015.1	Remorina	212,7251	22,904	207
<b>METABOLISMO ENERGÉTICO</b>				

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
NbS00006821g0002.1	Fosfoglicerato quinase	935,819	53,512	508
NbC23615037g0001.1	PREDICTED: quinesina tipo 1	222,5191	7,209	62
NbS00001859g0006.1	Fosfoglicerato quinase	477,2226	58,838	558
NbS00016746g0013.1	Hidrolase	207,1185	82,85	761
NbS00001332g0003.1	Subunidade 1 da ATP-sintase GN=ATPA	206,6272	11,563	112
NbS00003092g0009.1	RNA helicase ATP dependente GN=MTR4	204,2348	8,589	74
<b>TRANSPORTE/ RESPOSTA À ESTÍMULO/DEFESA</b>				
NbS00005988g0006.1	Proteína de transferência de lipídeo GN=LTP1	5782,017	12,433	118
NbS00037024g0001.1	Proteína de transferência de lipídeo	17213,3	12,789	122
NbS00004414g0010.1	Proteína secretora	14287,94	23,714	235
NbS00006011g0201.1	Fosfoproteína TSP9 do tilacoide	8788,181	12,168	115
NbS00039041g0001.1	Fosfoproteína TSP9 do tilacoide	659,027	10,76	102
NbS00009938g0003.1	Proteína da família glutarredoxina GN=At5g39865	203,701	18,764	162
<b>NÃO IDENTIFICADAS</b>				
NbS00000966g0002.1		236,1519	12,701	111
NbS00019210g0004.1		182,1784	12,846	115
NbS00010679g0002.1		335,8828	43,972	386

## APÊNDICE B - PROTEÍNAS DO GRUPO SUSCEPTÍVEL DESAFIADO (GSD)

Acesso	Descrição	Score	Massa (kDa)	Tamanho (aa)
<b>METABOLISMO CLOROPLÁSTICO</b>				
NbC23666742g0001.1	Subunidade de 33 kDa de proteína fotossintética GN=PSBO	6559,297	9,081	83
NbS00028820g0007.1	Precursor de cloroplasto PsbP1 GN=PSBP2	4214,928	27,584	251
NbS00008702g0001.1	Precursor de cloroplasto Psbo4 GN=PSBO	1316,781	14,643	331
NbC23760399g0001.1	Subunidade envolvida no fotossistema II GN=PSBP3	2502,08	7,587	67
NbS00019085g0006.1	Subunidade do centro de reação IV B do fotossistema I GN=PSAEB	7088,749	15,272	143
NbS00003075g0011.1	Subunidade do centro de reação IV B do fotossistema I GN=PSAEB	4475,415	15,254	143
NbS00013563g0003.1	Precursor de cloroplasto PsbQ1 GN=PSBQ2	4193,737	22,309	212
NbS00011475g0119.1	Proteína 15 kDa do lúmen do tilacoide	463,799	22,053	207
NbS00007132g0019.1	Precursor de cloroplasto PsbP3 GN=PSBP1	794,2766	28,791	268
NbS00024617g0001.1	Fosfoproteína do tilacoide	7686,919	12,072	115
NbS00019818g0001.1	Precursor de cloroplasto PsbO2 GN=PSBO	1190,11	35,425	332
NbS00010452g0020.1	Precursor de cloroplasto PsbP4 GN=PSBP1	210,4724	28,723	268
NbS00061093g0007.1	Subunidade III do centro de reação do fotossistema I GN=PSAF	121,5513	22,618	206
NbS00039233g0002.1	Proteína CP12-2 do ciclo de Calvin GN=CP12-2	5922,763	14,576	132
NbS00004956g0015.1	Subunidade maior de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase GN=rbcL	365,8455	9,831	84
NbS00041372g0009.1	Cadeia menor 8B da ribulose bifosfato carboxilase GN=RBCS	279,9067	15,419	137
NbS00029393g0012.1	Ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase ativase 1	188,0274	49,26	444
NbS00007503g0101.1	Proteína CP12 do ciclo de Calvin	3482,971	14,518	132
NbS00009714g0011.1	Ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase ativase 2 GN=RCA	175,8978	45,511	410

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
NbC25292626g0004.1	Cadeia menor 8B da ribulose bifosfato carboxilase GN=RBCS	117,9034	18,458	159
<b>BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS, MONTAGEM, DOBRADURA E DEGRADAÇÃO</b>				
NbS00026817g0017.1	Chaperonina GN=CPN10	521,6987	10,428	97
NbS00005183g0002.1	Subunidade beta chaperonina 60	2393,328	64,797	607
NbS00013225g0002.1	Fator Ts de alongamento factor Ts GN=tsf	215,6903	115,484	1054
NbS00060544g0003.1	Chaperonina GN=CPN10	6203,803	10,46	97
NbS00022186g0018.1	PREDICTED: Histona-lisina N-metiltransferase SUVR2 GN=SUVR2	201,7354	35,294	320
NbS00034791g0001.1	Chaperonina-60 subunidade beta GN=CPN60B2	3687,163	64,629	608
<b>HOMEOSTASE CELULAR E ORGANIZAÇÃO</b>				
NbS00017079g0006.1	PREDICTED: fruit protein pKIWI501-like [Nicotiana tomentosiformis].	6903,604	8,756	87
NbS00035818g0017.1	PREDICTED: induced stolen tip protein TUB8-like [Nicotiana tabacum]	3761,24	14,503	142
NbS00013211g0008.1	PREDICTED: major latex allergen Hev b 5-like [Nicotiana tabacum].	3639,835	16,272	157
NbC26053601g0004.1	Superoxido dismutase GN=SODCC	3363,176	13,047	128
NbS00034633g0005.1	Superoxido dismutase GN=SODCP	1248,847	22,373	215
NbC25716275g0002.1	Alfa/beta hidrolase	276,5839	9,8	89
NbS00000109g0019.1	Remorina	203,2902	23,231	210
NbS00022632g0015.1	Remorina	212,7251	22,904	207
<b>METABOLISMO ENERGÉTICO</b>				
NbS00006821g0002.1	Fosfoglicerato quinase	935,819	53,512	508
NbS00009456g0115.1	Predicted: Citocromo c oxidase	177,8742	18,235	165
NbS00016746g0013.1	Hidrolase	207,1185	82,85	761

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
<b>TRANSPORTE/ RESPOSTA À ESTÍMULO/DEFESA</b>				
NbS00004414g0010.1	Proteína secretora	14287,94	23,714	235
NbS00006011g0201.1	Fosfoproteína TSP9 do tilacoide	8788,181	12,168	115
NbS00005988g0006.1	Proteína de transferência de lipídeo GN=LTP1	5782,017	12,433	118
NbS00039041g0001.1	Fosfoproteína TSP9 do tilacoide	659,027	10,76	102
<b>NÃO IDENTIFICADAS</b>				
NbS00014805g0103.1		176,3836	29,135	258
NbS00010679g0002.1		335,8828	43,972	386

## APÊNDICE C - PROTEÍNAS DO GRUPO RESISTENTE (GR)

Acesso	Descrição	Score	Massa	Tamanho (aa)
<b>METABOLISMO CLOROPLÁSTICO</b>				
NbS00032545g0003.1	Precursor de cloroplasto PsbO1 GN=PSBO	8906,503	35,484	332
NbS00010454g0009.1	Proteína potenciadora 1 GN=PSBO	9111,219	35,679	333
NbC23666742g0001.1	Subunidade de 33 kDa de proteína fotossintética GN=PSBO	6559,297	9,081	83
NbS00019085g0006.1	Subunidade do centro de reação IV B do fotossistema I GN=PSAEB	7088,749	15,272	143
NbS00003075g0011.1	Subunidade do centro de reação IV B do fotossistema I GN=PSAEB	4475,415	15,254	143
NbS00028820g0007.1	Precursor de cloroplasto PsbP1 GN=PSBP2	4214,928	27,584	251
NbC23760399g0001.1	Subunidade envolvida no fotossistema II GN=PSBP3	2502,08	7,587	67
NbS00013563g0003.1	Precursor de cloroplasto PsbQ1 GN=PSBQ2	4193,737	22,309	212
NbS00023400g0001.1	Proteína 5kDa do fotossistema II GN=PSBT			106
NbS00024617g0001.1	Fosfoproteína do tilacoide	7686,919	12,072	115
NbS00008702g0001.1	Precursor de cloroplasto Psbo4 GN=PSBO	1316,781	14,643	331
NbS00010560g0001.1	Plastocianina GN=PETE1	760,2091	17	167
NbS00007503g0101.1	Proteína CP12 do ciclo de Calvin	3482,971	14,518	132
NbS00047753g0001.1	Subunidade maior de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase GN=rbcL	1444,127	13340	115
NbS00041372g0009.1	Cadeia menor 8B da ribulose bifosfato carboxilase GN=RBCS	602,4002	15,419	137
NbS00004956g0015.1	Subunidade maior de ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase GN=rbcL	365,8455	9,831	84
NbS00028438g0001.1	Precursor tioredoxina	260,7849	13,064	116
NbS00003231g0004.1	Proteína precursora do fotossistema II GN=PSBT	232,6221	11,696	110

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
NbS00009714g0011.1	Ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase ativase 2 GN=RCA	1679,927	45,511	410
NbS00039233g0002.1	Proteína CP12-2 do ciclo de Calvin GN=CP12-2	5922,763	14,576	132
NbS00059984g0001.1	Cadeia maior da ribulose bifosfato carboxilase GN=rbcl	213,907	8,073	75
<b>BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS, MONTAGEM, DOBRADURA E DEGRADAÇÃO</b>				
NbS00060544g0003.1	Chaperonina GN=CPN10	6203,803	10,46	97
NbS00036543g0002.1	Precursor chaperonina 21 GN=CPN21	712,3722	26,53	252
NbC24219583g0001.1	Histona H2B	370,738	11,809	107
NbS00020081g0001.1	Proteína ribossomal R12	2374,204	19,713	186
NbS00011385g0004.1	Subunidade alfa da RNA polimerase GN=rpoA	257,6255	8,883	80
NbS00026544g0001.1	Proteína ribossomal L12	73,0572	19,658	186
NbS00003380g0001.1	Proteína ribossomal L12-1A GN=RPL12	1496,879	19,688	187
<b>HOMEOSTASE CELULAR E ORGANIZAÇÃO</b>				
NbS00017079g0006.1	PREDICTED: fruit protein pKIWI501-like [Nicotiana tomentosiformis].	6903,604	8,756	87
NbS00045664g0003.1	PREDICTED: fruit protein pKIWI501-like [Nicotiana tomentosiformis].	1646,976	8,406	85
NbS00013211g0008.1	PREDICTED: major latex allergen Hev b 5-like [Nicotiana tabacum].	3639,835	16,272	157
NbS00035818g0017.1	PREDICTED: induced stolen tip protein TUB8-like [Nicotiana tabacum]	3761,24	14,503	142
NbC26053601g0004.1	Superoxido dismutase GN=SODCC	3363,176	13,047	128
NbS00046406g0006.1	Superoxido dismutase GN=SODCP	1044,119	22,691	220
NbS00022632g0015.1	Remorina	212,7251	22,904	207

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
NbS00034633g0005.1	Superoxido dismutase GN=SODCP	1248,847	22,373	215
<b>METABOLISMO ENERGÉTICO</b>				
NbS00009456g0115.1	Predicted: Citocromo c oxidase	177,8742	18,235	165
NbS00006821g0002.1	Fosfoglicerato quinase	935,819	53,512	508
NbC23615037g0001.1	PREDICTED: quinesina tipo 1			793
NbS00016746g0013.1	Hidrolase	207,1185	82,85	761
<b>TRANSPORTE/ RESPOSTA À ESTÍMULO/DEFESA</b>				
NbS00004414g0010.1	Proteína secretora	14287,94	23,714	235
NbS00005988g0006.1	Proteína de transferência de lipídeo GN=LTP1	5782,017	12,433	118
NbS00037024g0001.1	Proteína de transferência de lipídeo	17213,3	12,789	122
NbS00051838g0005.1	Proteína de membrana DREPP2 GN=Os01g0233000	222,4478	23,278	220
NbS00006011g0201.1	Fosfoproteína TSP9 do tilacoide	8788,181	12,168	115
NbS00039041g0001.1	Fosfoproteína TSP9 do tilacoide	659,027	10,76	102
<b>NÃO IDENTIFICADAS</b>				
NbS00058694g0002.1		222,9478	14,605	130



## APÊNDICE D - PROTEÍNAS DO GRUPO RESISTENTE E DESAFIADO (GRD)

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
<b>METABOLISMO CLOROPLÁSTICO</b>				
NbS00013563g0003.1	Precursor de cloroplasto PsbQ1 GN=PSBQ2	4193,737	22,309	212
NbS00019085g0006.1	Subunidade do centro de reação IV B do fotossistema I GN=PSAEB	7088,749	15,272	143
NbS00028820g0007.1	Precursor de cloroplasto PsbP1 GN=PSBP2	4214,928	27,584	251
NbS00003075g0011.1	Subunidade do centro de reação IV B do fotossistema I GN=PSAEB	4475,415	15,254	143
NbC23760399g0001.1	Subunidade envolvida no fotossistema II GN=PSBP3	2502,08	7,587	67
NbS00010454g0009.1	Proteína potenciadora 1 GN=PSBO	9111,219	35,679	333
NbS00032545g0003.1	Precursor de cloroplasto PsbO1 GN=PSBO	8906,503	35,484	332
NbS00008702g0001.1	Precursor de cloroplasto Psbo4 GN=PSBO	1316,781	14,643	331
NbS00024617g0001.1	Fosfoproteína do tilacoide	7686,919	12,072	115
NbS00038432g0004.1	Subunidade IV A do centro de reação do Fotossistema I GN=PSAEA	373,8653	15,167	141
NbS00043961g0001.1	Proteína At1g12250 do lúmen do tilacoide GN=At1g12250	448,0477	11,715	110
NbS00030369g0003.1	Precursor da plastocianina GN=PETE	517,9934	17,212	167
NbS00010452g0020.1	Precursor de cloroplasto PsbP4 GN=PSBP1	210,4724	28,723	268
NbC23666742g0001.1	Subunidade de 33 kDa de proteína fotossintética GN=PSBO	6559,297	9,081	83
NbS00012843g0001.1	Plastocianina GN=PETE	694,7875	17,069	167
NbS00004085g0015.1	Proteína de ligação CP26 à pigmentos do cloroplasto GN=LHCB5	456,5195	23,609	225
NbS00011475g0119.1	Proteína 15 kDa do lúmen do tilacoide	463,799	22,053	207

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
NbS00008180g0001.1	Proteína do lúmen do tilacoide GN=At1g03600	501,2461	18,789	171
NbS00002520g0008.1	Precursor do cloroplasto PsbP2 GN=PSBP2	4233,342	37,737	340
NbS00010560g0001.1	Plastocianina GN=PETE1	760,2091	17	167
NbS00023937g0001.1	Subunidade II do centro de reação do fotossistema I GN=psaD	381,7726	22,687	207
NbS00010560g0001.2	Plastocianina GN=PETE1	760,2091	17	167
NbS00023937g0001.2	Subunidade II do centro de reação do fotossistema I GN=psaD	381,7726	22,687	270
NbS00010560g0001.3	Plastocianina GN=PETE3	882,3922	17,071	303
NbS00041372g0009.1	Cadeia menor 8B da ribulose bifosfato carboxilase GN=RBCS	602,4002	15,419	137
NbS00007503g0101.1	Proteína CP12 do ciclo de Calvin	4701,576	14,518	132
<b>BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS, MONTAGEM, DOBRADURA E DEGRADAÇÃO</b>				
NbS00026817g0017.1	Chaperonina GN=CPN10	521,6987	10,428	97
NbS00017357g0001.1	Proteína ribossomal L12 GN=RPL12	383,303	17,932	166
NbS00033212g0005.1	Fator de reciclagem de ribossomo GN=RRF	1144,163	32,799	287
NbS00060544g0003.1	Chaperonina GN=CPN10	6203,803	10,46	97
NbC24219583g0001.1	Histona H2B	370,738	11,809	107
NbS00016026g0011.1	Fator de reciclagem de ribossomo GN=RRF	1154,54	32,747	289
NbS00036543g0002.1	Precursor chaperonina 21 GN=CPN21	392,9118	26,53	252
NbS00020081g0001.1	Proteína ribossomal R12	2374,204	19,713	186
<b>HOMEOSTASE CELULAR E ORGANIZAÇÃO</b>				
NbS00035818g0017.1	PREDICTED: induced stolen tip protein TUB8-like [Nicotiana tabacum]	3761,24	14,503	142

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
NbC26053601g0004.1	Superoxido dismutase GN=SODCC	3363,176	13,047	128
NbS00013211g0008.1	PREDICTED: major latex allergen Hev b 5-like [Nicotiana tabacum].	3639,835	16,272	157
NbS00045664g0003.1	PREDICTED: fruit protein pKIWI501-like [Nicotiana tomentosiformis].	1646,976	8,406	85
NbS00034633g0005.1	Superoxido dismutase GN=SODCP	1248,847	22,373	215
NbS00000109g0019.1	Remorina	203,2902	23,231	210
NbS00005510g0004.1	Subunidade beta geranilgeraniltransferase	234,3118	13,661	121
NbS00017079g0006.1	PREDICTED: fruit protein pKIWI501-like [Nicotiana tomentosiformis].	2722,501	8,756	87
NbS00011146g0015.1	Proteína quinase dependente de cálcio GN=CPK30	99,8137	36,869	320
<b>METABOLISMO ENERGÉTICO</b>				
NbS00016746g0013.1	Hidrolase	335,938	82,85	761
NbS00006821g0002.1	Fosfoglicerato quinase	213,2298	53,512	478
NbS00009456g0115.1	Predicted: Citocromo c oxidase			165
<b>TRANSPORTE/ RESPOSTA À ESTÍMULO/DEFESA</b>				
NbS00005988g0006.1	Proteína de transferência de lipídeo GN=LTP1	6109,438	12,433	119
NbS00004414g0010.1	Proteína secretora da epiderme	8367,983	23,714	235
NbS00039041g0001.1	Fosfoproteína TSP9 do tilacoide	408,7661	10,76	102
NbS00018964g0003.1	Deidrina	294,0757	23,605	208
NbS00010595g0010.1	Proteína de ligação do fator choque térmico	300,5969	12,437	111
NbS00037024g0001.1	Proteína de transferência de lipídeo	570,0695	12,789	112
NbS00006011g0201.1	Fosfoproteína TSP9 do tilacoide	5949,994	12,168	115

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
<b>NÃO IDENTIFICADAS</b>				
NbS00001797g0001.1		266,1937	14,372	119
NbS00010679g0002.1		162,1994	43,972	386
NbS00017494g0010.1		254,2262	9,336	80
NbS00008738g0002.1	PREDICTED: putative protein TPRXL	228,7815	14,99	136

## APÊNDICE E - PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DO GRUPO SUSCEPTÍVEL (GS)

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
<b>METABOLISMO CLOROPLÁSTICO</b>				
NbS00023265g0002.1	Plastocianina	1041,012	17,08	169
NbS00012460g0007.1	Proteína PSB28 do centro de reação do fotossistema II	754,2607	13,013	115
NbS00007371g0002.1	Proteína do lúmen do tilacoide	514,1743	26,737	245
NbS00008180g0001.1	Proteína do lúmen do tilacoide	501,2461	18,789	171
NbS00000987g0004.1	Proteína de ligação de clorofila	307,3651	28,381	266
NbS00014580g0005.1	Proteína de ligação de clorofila	381,2267	24,949	231
NbS00008079g0001.1	Proteína PSB28 do centro de reação do fotossistema II	768,3552	13,013	115
<b>BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS</b>				
NbS00022563g0002.1	Chaperonina Cpn60	2939,746	16,002	151
NbS00008178g0018.1	Histona H2A	749,9692	15,533	148
NbS00023692g0003.1	Proteína ribossomal 30S	242,0827	27,752	253
NbS00012273g0005.1	Precursor de chaperonina	237,5489	26,223	249
NbS00045137g0002.1	Histona H2A	202,2041	12,217	113
NbS00027048g0006.1	Fator inicial de tradução	182,1763	17,654	160
NbS00000215g0010.1	Proteína de ligação da RuBisCO	5,639	64,889	605
NbS00007027g0009.1	Proteína de ligação da RuBisCO	29,4129	64,72	605
NbS00025848g0007.1	Fator de alongação Ts	35,0708	120,944	1101
NbS00020235g0008.1	Histona H2A	587,3674	15,48	148
NbS00011019g0013.1	Fator inicial de tradução	165,8616	190,484	1723
NbS00019153g0015.1	Cadeia pesada da clatrina	335,6384	157,262	1387
NbC23375122g0001.1	Cadeia pesada da clatrina	311,1047	8,222	72
<b>HOMEOSTASE CELULAR E ORGANIZAÇÃO</b>				

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
NbS00032966g0002.1	Arabinogalactano tipo fasciclina	243,6443	27,007	251
NbS00006907g0117.1	Tipo 1 ubinucleína	150,6587	102,46	927
NbS00000459g0004.1	Subunidade regulatória do proteosoma	333,356	42,565	400
NbS00000328g0015.1	Subunidade regulatória do proteosoma	241,4168	42,707	400
NbS00026008g0003.1	Receptor extracelular sensível ao cálcio	346,2576	41,983	394
NbS00008191g0001.1	Cistatina	592,9184	4,096	38
<b>METABOLISMO ENERGÉTICO</b>				
NbS00001859g0006.1	Fosfoglicerato quinase	477,2226	58,838	558
NbS00001332g0003.1	Subunidade da ATP sintase	206,6272	11,563	112
NbS00003092g0009.1	RNA helicase	204,2348	8,589	74
<b>TRANSPORTE/ DEFESA</b>				
NbS00009938g0003.1	Proteína da família glutarredoxina GN=At5g39865	203,701	18,764	162

APÊNDICE F - PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DO GRUPO SUSCEPTÍVEL  
DESAFIADO (GSD)

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
<b>METABOLISMO CLOROPLÁSTICO</b>				
NbS00061093g0007.1	Subunidade do centro de reação do fotossistema I	121,5513	22,618	206
NbC25292626g0004.1	Cadeia pequena da RuBisCO	117,9034	18,458	159
<b>HOMEOSTASE CELULAR E ORGANIZAÇÃO</b>				
NbC25716275g0002.1	Hidrolase	276,5839	9,8	89

## APÊNDICE G - PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DO GRUPO RESISTENTE (GR)

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
<b>METABOLISMO CLOROPLÁSTICO</b>				
NbS00023400g0001.1	Proteína do fotossistema II	1036,055	11,758	111
NbS00003231g0004.1	Proteína precursora do fotossistema II	232,6221	11,696	110
NbS00059984g0001.1	Cadeia maior da RuBisCO	213,907	8,073	75
<b>BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS</b>				
NbS00011385g0004.1	Subunidade alfa da RNA polimerase	257,6255	8,883	80
NbS00026544g0001.1	Proteína ribossomal L12	73,0572	19,658	186
<b>TRANSPORTE/ ESTÍMULO À DEFESA</b>				
NbS00051838g0005.1	Proteína DREPP2	222,4478	23,278	220
NbS00028438g0001.1	Precursor de tiorredoxina	260,7849	13,064	116



APÊNDICE H - PROTEÍNAS EXCLUSIVAS DO GRUPO RESISTENTE  
DESAFIADO (GRD)

<b>Acesso</b>	<b>Descrição</b>	<b>Score</b>	<b>Massa (kDa)</b>	<b>Tamanho (aa)</b>
<b>METABOLISMO CLOROPLÁSTICO</b>				
NbS00043961g0001.1	Proteína com uma repetição de um pentapeptídeo de função desconhecida	621,83	11,715	110
NbS00023937g0001.1	Subunidade II do centro de reação do fotossistema I	381,77	22,687	207
<b>BIOSSÍNTESE DE PROTEÍNAS</b>				
NbS00017357g0001.1	Proteína ribossomal L12 GN=RPL12	383,3	17,932	166
<b>HOMEOSTASE CELULAR E ORGANIZAÇÃO</b>				
NbS00005510g0004.1	Subunidade beta da geranylgeranyltransferase	234,31	13,661	121
NbS00017079g0006.1	fruit protein pKIWI501-like	2722,5	8,756	87
NbS00011146g0015.1	Proteína quinase dependente de cálcio	99,814	36,869	320
<b>TRANSPORTE/ ESTÍMULO À DEFESA</b>				
NbS00018964g0003.1	Deidrina	335,76	23,605	208
NbS00010595g0010.1	Fator de ligação da proteína choque térmico	300,6	12,437	111