



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



RAYSSA GUEDES GOMES DA SILVA

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR  
(*Saccharum* spp.) EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***

Recife

2021

RAYSSA GUEDES GOMES DA SILVA

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR  
(*Saccharum* spp.) EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

Recife

2021

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Rayssa Guedes Gomes da  
Proteômica diferencial de colmo de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em resposta à  
infecção por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* / Rayssa Guedes Gomes da Silva. - 2021.

119 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro  
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,  
Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. Cana-de-açúcar. 2. Melhoramento de cultivos agrícolas. 3.  
Biotecnologia. I. Calsa Junior, Tercilio (orientador). II. Título.

663.61

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-006

RAYSSA GUEDES GOMES DA SILVA

**PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR  
(*Saccharum* spp.) EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: 27/08/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katia Castanho Scortecci (Examinadora Externa)  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

À minha mãe, Silene, por sempre acreditar em mim e por ter abdicado tantas coisas  
da sua vida em prol das realizações e felicidade dos filhos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo privilégio da vida, pela presença nos momentos difíceis e oportunidade de realização deste sonho.

À minha mãe, Silene, pelo amor incondicional, resiliência e dedicação. Mainha, sou grata pela confiança depositada em mim e por apoiar todos os meus sonhos. Aos meus irmãos, Rayanne e Raí, pela torcida, incentivo e compreensão diante de tantas circunstâncias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), instituição na qual sempre terei orgulho, pela educação gratuita de qualidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior, pela confiança depositada em mim e aceite no grupo de pesquisa desde o início da minha graduação. Obrigada pelos seus ensinamentos, paciência e incentivos.

Aos membros da banca, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katia Castanho Scortecci e ao Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto, pela disposição e contribuições na versão final deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup>. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva pela disponibilidade, atenção e apoio em todas as etapas da minha jornada. Seu auxílio foi fundamental para a concretização desse trabalho.

Aos membros do Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP), Elton Pena, Geisenilma Rocha, José Fachine e Lucas Freitas, pela amizade, aprendizados, suporte emocional e experimental. Cada um de vocês tornaram minha escalada um pouquinho mais fácil.

À Dr<sup>a</sup>. Renata Rodrigues de Almeida, egressa do LGPP, cuja tese foi precursora desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) por ter cedido ao grupo o inóculo de *Lxx*.

Aos professores, Dr<sup>a</sup>. Andrea Chaves Fiuza Porto e Dr. Djalma Euzébio Simões Neto, da Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (EECAC/UFRPE), pelo fornecimento do material vegetal e infraestrutura para o experimento em casa-de-vegetação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada, da Universidade Católica de Brasília (UCB), pela disponibilização do espectrômetro de massas e colaboração nas análises.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Lemos de Oliveira, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo apoio financeiro nas análises de LC-MS/MS.

A equipe responsável pela Plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ-PR), especialmente ao Dr. Michel Batista, pela disponibilidade e atenção.

Ao Dr. Jimmy Eng do Centro de Pesquisas em Proteômica da Universidade de Washington (UWPR - Seattle, EUA), pela inclusão dos dados de cana-de-açúcar e disponibilização de acesso para identificação das proteínas via Mascot.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida durante o mestrado.

Ao meu amigo fiel de quatro patas, Harmoo, pela companhia, afagos e momentos de leveza proporcionados quando tudo parecia tão difícil.

Gratidão a todos vocês!

“A vida é uma corrida / que não se corre sozinho. / E vencer não é chegar, / é aproveitar o caminho / sentindo o cheiro das flores / e aprendendo com as dores / causadas por cada espinho [...]”. (BESSA, 2018).



## RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma das plantas mais cultivadas no mundo devido ao seu elevado rendimento em biomassa e concentração de sacarose nos colmos, sendo o Brasil o maior produtor. Entretanto, diversos fatores bióticos afetam sua produtividade, entre eles a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*), agente causal do raquitismo-da-soqueira (RSD). O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil proteômico caulinar diferencial de cana-de-açúcar (var. RB867515) infectada com *Lxx*. As proteínas totais dos colmos inoculados ou não com *Lxx* foram extraídas utilizando o método fenólico, quantificadas pelo método de Bradford e submetidas à eletroforese uni e bidimensional, seguindo-se a análise por espectrometria de massas. Um total de 76 proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) de ambos os tratamentos foram identificadas, presumivelmente, permitindo associá-las a diversos processos funcionais, tais como modificação de proteínas, resposta ao estresse, processamento de RNA, biossíntese, desenvolvimento, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de carboidratos, transporte e outros. Os dados proteômicos demonstraram um maior acúmulo de proteínas relacionadas à defesa nas plantas infectadas, incluindo uma proteína com domínio NB-ARC que está envolvida no reconhecimento de efetores do fitopatógeno e que desencadeia uma resposta hipersensitiva (HR) no hospedeiro. A infecção com *Lxx* promove o acúmulo de danos ao DNA, porém, algumas proteínas envolvidas na resposta a esses danos, tais como a PARP1 e a AGO10b são induzidas, e parecem integrar mecanismos de defesa ativados. Por outro lado, a indução da TPX2 e inibição da MAP3Kε1 na cana-de-açúcar em interação com *Lxx* sugerem que a presença da bactéria interfere no ciclo celular vegetal. Os resultados apresentados contribuem para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesse patossistema e podem auxiliar os programas de melhoramento genético para resistência ao RSD.

**Palavras-chave:** Raquitismo-da-soqueira; Patossistema; Proteoma; Espectrometria de massas; Melhoramento vegetal.

## ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is one of the most cultivated plants in the world due to its high biomass yield and sucrose concentration in the stalks, Brazil being the largest producer. However, several biotic factors affect its productivity, including the bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*), causal agent of ratoon stunting disease (RSD). The objective of this work was to determine the differential proteomic profile of sugarcane stalk (var. R867515) infected with *Lxx*. The total proteins of the stalks inoculated or not with *Lxx* were extracted using the phenolic method, quantified by the Bradford method and submitted to uni and bidimensional electrophoresis, followed by analysis by mass spectrometry. A total of 76 differentially accumulated proteins (DAPs) from both treatments were identified presumably, allowing them to be associated with different functional processes, such as protein modification, stress response, RNA processing, biosynthesis, development, nitrogen metabolism, carbohydrate metabolism, transport and others. Proteomic data demonstrated a greater accumulation of defense-related proteins in infected plants, including a NB-ARC domain-containing protein that is involved in the recognition of phytopathogen effectors and triggers a hypersensitive response (HR) in the host. *Lxx* infection promotes the accumulation of DNA damage, however, some proteins involved in the response to this damage, such as PARP1 and AGO10b are induced, and seem to integrate activated defense mechanisms. On the other hand, the induction of TPX2 and inhibition of MAP3K $\epsilon$ 1 in sugarcane interacting with *Lxx* suggest that the presence of the bacteria interferes with the plant cell cycle. The results presented contribute to the understanding of the molecular mechanisms involved in this pathosystem and may support genetic improvement programs for resistance to RSD.

**Keywords:** Ratoon stunting disease; Pathosystem; Proteome; Mass spectrometry; Plant breeding.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estimativa da produção de açúcar e bioetanol no Brasil e no mundo	25
Figura 2 -	Mapeamento da distribuição geográfica das áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Brasil	27
Figura 3 -	Ultraestrutura celular interna de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> corada negativamente em ácido fosfotúngstico 1% sob microscopia eletrônica de transmissão (barra = 0,5 µm)	29
Figura 4 -	Esquema simplificado da resposta imune vegetal aos microrganismos benéficos/fitopatogênicos e insetos. Após o reconhecimento dos elicitores (PAMPs, MAMPs e DAMPs/HAMPs) por meio de receptores do hospedeiro, uma cascata de sinalização é desencadeada resultando na PTI (PAMP-triggered immunity). Alguns fitopatógenos são capazes de suprimir a PTI e a planta, por sua vez, responde a essa invasão ativando a ETI (effector-triggered immunity).	40
Figura 5 -	Esquema das abordagens “ômicas” integrativas	44
Figura 6 -	Etapas de uma análise proteômica bidimensional	47
Figura 7 -	Estrutura de um espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF	49
Figura 8 -	Modelo biológico do proteoma foliar da cana-de-açúcar associada à <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx)	53

### Artigo 1

Figura 1 -	Esquema do delineamento experimental realizado em casa de vegetação a partir de colmos de cana-de-açúcar (RB867515) inoculados ou não com a bactéria <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx)	58
Figura 2 -	Perfil proteico do colmo da cana-de-açúcar (RB867515) não-inoculado e inoculado com <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx) visualizado em gel SDS-PAGE 12,5%. 1. Marcador molecular (MW) medido em kDa; 2-4. Controle (não-inoculado); 5-7. Estresse (não-inoculado)	64
Figura 3 -	Mapas comparativos em 2-DE de colmo da cana-de-açúcar (RB867515) não-inoculado (A) e inoculado com <i>Leifsonia xyli</i>	65

subsp. *xyli* (B). O marcador molecular é medido em kDa e o ponto isoelétrico (pI) varia entre 3 e 10

Diagramas de Venn exibindo a distribuição das DAPs de colmo de cana-de-açúcar (RB867515) nos tratamentos não-inoculado (controle) e inoculado com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (estresse) submetidas à espectrometria de massas (A) e, posteriormente,

Figura 4 - identificadas pelo programa Mascot (B) 66

Ontologia gênica (GO) por processo biológico (BP) das proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) em colmo de cana-de-açúcar nos tratamentos não-inoculado (controle) e inoculado com

Figura 5 - *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (estresse) 73

Ontologia gênica (GO) por componente celular (CC) das DAPs em colmo de cana-de-açúcar nos tratamentos não- inoculado

Figura 6 - (controle) e inoculado com *Lxx* (estresse) 74

Esquema do provável modelo biológico do proteoma caulinar de cana-de-açúcar infectada por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*). As proteínas representadas com setas em vermelho e verde indicam aquelas com menor acúmulo e maior acúmulo, respectivamente. A figura também mostra a localização celular das DAPs segundo o banco de dados do UniProt. As informações detalhadas sobre

Figura 7 - as DAPs são apresentadas na Tabela 1 86

## LISTA DE TABELAS

### Artigo 1

Identificação presumível das DAPs de colmo da cana-de-açúcar (RB867515), de acordo com a maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) alcançada por meio do programa Mascot. *Ratio* é referente à razão de variação entre as porcentagens de volume dos *spots* nos tratamentos não-inoculado (controle) e inoculado com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (estresse). ANOVA relaciona-se ao valor  $p$  calculado para significância estatística da diferença na porcentagem de volume do spot entre os tratamentos, em que é significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada spot são exibidos o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MW, em Da) calculados do

Tabela 1 - acesso similar e observados nos géis 2D-PAGE

67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%vol	Porcentagem de volume do <i>spot</i> normalizado em gel
1-DE	Eletroforese unidimensional
2-DE	Eletroforese bidimensional
2D-PAGE	<i>Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</i> (eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida)
Aaa	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
ABA	Abscisic acid (ácido abscísico)
AIA	<i>Indoleacetic acid</i> (ácido indolacético)
APS	<i>Ammonium persulfate</i> (persulfato de amônio)
AUX	<i>Auxin</i> (auxina)
BP	<i>Biological process</i> (processo biológico)
BRs	<i>Brassinosteroids</i> (brassinosteróides)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina sérica bovina)
BSD	<i>Bermuda-grass stunting disease</i> (raquitismo da grama-bermuda)
CAT	Catalase
CC	<i>Cellular componente</i> (componente celular)
CDPKs	<i>Calcium-dependent protein kinases</i> (proteínas quinases dependentes de cálcio)
CHAPS	Cloroamidopropil dimetilamônio propano sulfonato
CHCA	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamínico
CID	<i>Collision-induced dissociation</i> (dissociação induzida por colisão)
CK	<i>Cytokine</i> (citocinina)
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Cq	Ciclo de quantificação
CRKs	<i>Cysteine-rich receptor-like kinase</i> (receptores do tipo quinase ricos em cisteína)
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
DAI	<i>Days after inoculation</i> (dias após a inoculação)
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados ao dano celular)
DAPs	<i>Differentially accumulated proteins</i> (proteínas diferencialmente acumuladas)

DB-EIA	<i>Dot-blot enzyme immunoassays</i> (ensaios imunoenzimáticos <i>dot-blot</i> )
DEGs	<i>Differentially expressed genes</i> (genes diferencialmente expressos)
DIGE	<i>Difference gel electrophoresis</i> (eletroforese diferencial em gel)
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EB-EIA	<i>Evaporative-binding enzyme immunoassays</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EECAC	Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina
EIA	<i>Evaporative-binding enzyme immunoassays</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (ionização por eletrodispersão)
ET	<i>Ethylene</i> (etileno)
ETI	<i>Effector-triggered immunity</i> (imunidade desencadeada por efetores)
ETS	<i>Effector-triggered susceptibility</i> (suscetibilidade desencadeada por efetores)
FAO	<i>Food and Agricultural Organization of the United Nations</i>
FT-ICR	<i>Fourier-transform ion-cyclotron-resonance</i> (ressonância ciclotônica de íons com transformação de Fourier)
GA	<i>Gibberellin</i> (giberelina)
GA <sub>3</sub>	<i>Gibberellic acid</i> (ácido giberélico)
GC	Guanina-Citosina
GO	<i>Gene ontology</i> (ontologia gênica)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)
HR	<i>Hypersensitive response</i> (resposta hipersensitiva)
IAA	Iodoacetamida
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IEF	<i>Isoelectric focusing</i> (focalização isoelétrica)
INDELS	Inserções e Deleções
IPG	<i>Immobilized pH gradient</i> (gradiente de pH imobilizado)
ISR	<i>Induced systemic resistance</i> (resistência sistêmica induzida)

IT	<i>Ion trap</i> (aprisionamento de íons)
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (espaçador interno transcrito)
JA	<i>Jasmonic acid</i> (ácido jasmônico)
KCl	Cloreto de potássio
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i> (amplificação isotérmica mediada por <i>loop</i> )
LC	<i>Liquid chromatography</i> (cromatografia líquida)
LRRs	<i>Leucine-rich repeats</i> (repetições ricas em leucina)
LSB	<i>Leaf sheath biopsies</i> (análises da bainha foliar)
<i>Lxc</i>	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i>
<i>Lxx</i>	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>
LysM	<i>Lysin motif</i> (motivo de lisina)
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> (dissorção/ionização a laser assistida por matriz)
MAMPs	<i>Microbe-associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados a microrganismos)
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinases</i> (proteínas quinases ativadas por mitógenos)
Mpb	Milhões de pares de base
MS	<i>Mass spectrometry</i> (espectrometria de massas)
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> (espectrometria de massas em tandem)
MW	<i>Molecular weight</i> (massa molecular)
NADP-ME	<i>NADP-dependent malic enzyme</i> (enzima málica dependente de NADP)
NLRs	<i>NOD-like receptors</i> (receptores tipo NOD)
NO	<i>Nitric oxide</i> (óxido nítrico)
nUPLC	<i>Nanoflow ultra-performance liquid chromatography</i> (nanocromatografia líquida de ultra eficiência)
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida



PAL	<i>Phenylalanine ammonia lyase</i> (fenilalanina amônia-liase)
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados a patógenos)
PCD	<i>Programmed cell death</i> (morte celular programada)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PEPC	<i>Phosphoenolpyruvate carboxylase</i> (fosfoenolpiruvato carboxilase)
PMF	<i>Peptide mass fingerprinting</i> (tipagem por massa de peptídeos)
PMSF	Fluoreto de fenil-metano-sulfonil
POD	Peroxidase
PPDK	<i>Pyruvate phosphate dikinase</i> (piruvato fosfato diquinase)
PRs	<i>Pathogenesis-related proteins</i> (proteínas relacionadas à patogênese)
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i> (receptores de reconhecimento de padrão)
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i> (resposta imune desencadeada por PAMPs)
PTMs	<i>Post-translational modifications</i> (modificações pós-traducionais)
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
Q	<i>Quadrupole</i> (quadrupolo)
qPCR	<i>Real time quantitative PCR</i> (PCR em tempo real)
<i>Ratio</i>	Razão de variação na %vol do spot na amostra em condições contrastantes
RIDESA	Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucreenergético
RLKs	<i>Receptors-like kinase</i> (receptores do tipo quinase)
RLPs	<i>Receptors-like protein</i> (receptores do tipo proteína)
rpm	Rotações por minuto
RSD	<i>Ratoon stunting disease</i> (raquitismo-da-soqueira)
SA	<i>Salicylic acid</i> (ácido salicílico)
SAR	<i>Systemic acquired resistance</i> (resistência sistêmica adquirida)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)
SLs	<i>Strigolactones</i> (estrigolactonas)
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de nucleotídeo único)

SOD	Superóxido dismutase
TB-EIA	<i>Tissue-blot enzyme immunoassays</i>
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
ToF	<i>Time-of-Flight</i> (tempo de voo)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UCB	Universidade Católica de Brasília
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UPLC	<i>Ultra-performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de ultra eficiência)
USP	Universidade de São Paulo
UV	Luz ultravioleta
UWPR	University of Washington's Proteomics Resource
WAKs	<i>Cell wall-associated kinases</i> (proteínas quinases associadas à parede celular)
ZFP	<i>Zinc finger protein</i> (proteína dedo de zinco)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
2.1	GERAL	22
2.2	ESPECÍFICOS	22
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>23</b>
3.1	CANA-DE-AÇÚCAR	23
<b>3.1.1</b>	<b>Aspectos econômicos</b>	24
<b>3.1.2</b>	<b>Cana-de-açúcar no Brasil</b>	26
3.2	RAQUITISMO-DA-SOQUEIRA (RSD)	27
<b>3.2.1</b>	<b><i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx)</b>	28
<b>3.2.2</b>	<b>Sintomas</b>	31
<b>3.2.3</b>	<b>Controle</b>	32
<b>3.2.4</b>	<b>Diagnóstico</b>	32
<b>3.2.5</b>	<b>Importância econômica</b>	34
3.3	INTERAÇÃO PLANTA-MICROORGANISMO	35
<b>3.3.1</b>	<b>Resposta imune das plantas aos microrganismos</b>	36
<b>3.3.2</b>	<b>Mecanismos de defesa da cana-de-açúcar contra bactérias fitopatogênicas</b>	40
3.4	PROTEÔMICA	43
<b>3.4.1</b>	<b>Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)</b>	46
<b>3.4.2</b>	<b>Espectrometria de massas (MS)</b>	48
<b>3.4.3</b>	<b>Proteômica da cana-de-açúcar em resposta aos estresses bióticos</b>	51
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
4.1	ARTIGO 1	54
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>SÚMULA CURRICULAR</b>	<b>98</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>99</b>
	<b>APÊNDICE A – LC-MS/MS</b>	<b>117</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), pertencente a família Poaceae, é uma planta perene que apresenta metabolismo C<sub>4</sub>, sendo cultivada nas regiões tropicais e subtropicais. Devido à capacidade de síntese e acúmulo de altas concentrações de sacarose nos colmos, essa cultura apresenta um dos maiores rendimentos sendo a principal matéria-prima para a produção de açúcar, etanol, bioeletricidade e outros compostos com alto valor agregado (CALDERAN-RODRIGUES *et al.*, 2021; MIRAJKAR *et al.*, 2019). O cultivo dessa gramínea é realizado em mais de cem países, sendo o Brasil considerado líder mundial com uma produtividade estimada para a safra 2021/2022 de 74.576 kg.ha<sup>-1</sup> de cana-de-açúcar (CONAB, 2021; OECD/FAO, 2019).

Constantemente, a cana-de-açúcar é desafiada por diversos fatores abióticos (seca, alagamento, frio, salinidade, radiação UVB) e bióticos (bactérias, fungos, vírus e insetos). Apesar da capacidade das plantas em responder rapidamente às situações adversas por meio de uma rede regulatória complexa, muitas vezes tais mecanismos não são suficientes para evitar os prejuízos na produtividade gerando grandes impactos para o agronegócio (PARAMESWARI *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2020). Entre dezenas de doenças que acometem a cana-de-açúcar, o raquitismo-da-soqueira (RSD - “*Ratoon Stunting Disease*”), descrito pela primeira vez no ano de 1944 na Austrália, está presente no mundo inteiro (TEAKLE; SMITH; STEINDL, 1973; YOUNG, 2016).

*Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), agente causal da RSD, é uma bactéria gram-positiva, fastidiosa e endofítica obrigatória sendo considerada um patógeno oculto, visto que os sintomas observados na planta são discretos (GILLASPIE; TEAKLE, 1989; MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2009; DAVIS *et al.*, 1984). A Lxx pode ser encontrada no interior dos vasos xilemáticos, floema caulinar e parênquima foliar da cana-de-açúcar (QUECINE *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2019). A patogenicidade e a severidade da doença são dependentes de vários fatores ainda não compreendidos, mas responsáveis por grandes perdas em termos econômicos no setor sucroalcooleiro (CIA *et al.*, 2018; ZAVAGLIA *et al.*, 2016).

Os sintomas da RSD incluem o encurtamento dos entrenós, redução no diâmetro e no comprimento dos colmos, além de manchas próximas aos meristemas laterais e apical dos nós de plantas jovens associadas à produção de uma

substância eletrondensa por *Lxx* nos elementos de vaso obstruindo o transporte de água e nutrientes no hospedeiro (METZLER; LAINE; BOER, 1997; YOUNG, 2018). Esses sintomas são frequentemente confundidos com os estresses ambientais que, inclusive, podem potencializar a infecção por *Lxx*, dificultando o diagnóstico e, conseqüentemente, o controle da doença (ZHU *et al.*, 2021). Ao longo de safras consecutivas, há uma tendência de aumento na quantidade de plantas de cana-de-açúcar infectadas, visto que *Lxx* é transmitida mecanicamente às plantas saudias pelo uso de instrumentos contaminados (COMSTOCK, 2002; HOY; GRISHAM; DAMANN, 1999).

O controle da RSD, geralmente, é realizado com a adoção de medidas fitossanitárias, tais como a desinfecção dos instrumentos de corte, quarentena e plantio de mudas saudias (COMSTOCK, 2002; HOY; GRISHAM; DAMANN, 1999). O tratamento térmico é um dos métodos mais comuns no manejo dessa doença, em que os colmos de cana-de-açúcar são mantidos submersos em água a 50°C por 2 h, reduzindo a população bacteriana nas plantas propagadas (CARVALHO *et al.*, 2016; URASHIMA; GRACHET, 2012). Contudo, assim como nas demais estratégias de controle da RSD, a termoterapia não é capaz de eliminar totalmente o patógeno e, por isso, *Lxx* pode persistir no canavial (URASHIMA *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2019).

No Brasil, um estudo da incidência temporal de *Lxx* na região Centro-Sul demonstrou que essa bactéria chegou a infectar mais de 40% dos canaviais, entre os anos de 2013 e 2018 (URASHIMA *et al.*, 2020). A variedade mais cultivada no país, RB867515, teve uma incidência de infecção de 88% apenas no estado de São Paulo causando um prejuízo econômico anual de aproximadamente US\$ 1 milhão (URASHIMA *et al.*, 2017). Embora esses impactos sejam relevantes, muitos programas de melhoramento não têm considerado a RSD uma prioridade (ZHU *et al.*, 2021). Diante disso tudo, a busca por variedades tolerantes e/ou resistentes a essa doença torna-se fundamental para o controle dessa doença (LU *et al.*, 2021).

Apesar da disponibilidade do genoma da cana-de-açúcar e *Lxx* (MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2019), poucos avanços têm sido feitos na tentativa de compreender os mecanismos moleculares relacionados à interação planta-patógeno. O estudo do transcriptoma da cana-de-açúcar infectada com *Lxx* revelou genes diferencialmente expressos (DEGs) envolvidos no metabolismo fotossintético, transdução de sinais por fitormônios e interação planta-patógeno (ZHU *et al.*, 2021). O perfil do metaboloma de cana-de-açúcar em resposta à

inoculação com *Lxx* apresentou metabólitos diferenciais com maior acúmulo de aminoácidos na variedade susceptível e de compostos fenólicos, flavonoides e ácido salicílico na variedade resistente ao RSD (CASTRO-MORETTI et al., 2021).

Além disso, a análise proteômica foliar de cana-de-açúcar infectada com *Lxx* exibiu 150 DAPs relacionadas ao metabolismo de carboidratos, metabolismo de proteínas, regulação da transcrição, defesa e ciclo celular (CIA et al., 2018). Embora os colmos sejam diretamente afetados pela RSD, estudos do proteoma caulinar da cana-de-açúcar em interação com *Lxx* ainda não foram realizados. Assim, a identificação de proteínas caulinares envolvidas nesse patossistema e sua aplicação como biomarcadores úteis ao melhoramento da cultura canavieira, são primordiais para a seleção e o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar mais tolerantes e/ou resistentes a RSD. Neste sentido, o presente trabalho objetivou analisar o proteoma do colmo da cana-de-açúcar em resposta à infecção por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Analisar o proteoma de colmo de cana-de-açúcar (variedade RB867515) inoculado ou não com a bactéria fitopatogênica *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) e identificar proteínas diferenciais potencialmente associadas à interação planta-microrganismo.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) nas plantas com ou sem o fitopatógeno *Lxx* por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) associada à espectrometria de massas (MS) e/ou, alternativamente, por nano-cromatografia líquida de ultra eficiência (nUPLC) acoplada a MS/MS.
- Determinar, através de anotação presumível, a função das DAPs, potencialmente associadas ao processo de interação planta-microrganismo.
- Correlacionar as DAPs identificadas com processos biológicos relevantes utilizando ferramentas de bioinformática.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 CANA-DE-AÇÚCAR

Taxonomicamente, a cana de açúcar é classificada como pertencente ao gênero *Saccharum*, membro da subtribo Saccharinae, tribo Andropogoneae e família Poaceae incluindo seis espécies: *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, *S. sinensis* e *S. edule* (DANIELS; ROACH, 1987; MANNERS, 2011; MOORE; BOTHA, 2014). A cana-de-açúcar é uma planta tropical ou subtropical, perene que se desenvolve sob condições de altas temperaturas, luminosidade e disponibilidade de água (MOORE; BOTHA, 2014). O metabolismo da cana-de-açúcar, assim como outras gramíneas tropicais, é do tipo C<sub>4</sub> promovendo maior tolerância às temperaturas elevadas, às altas taxas de intensidade luminosa e à insuficiência hídrica (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015; MOORE; BOTHA, 2014).

A reprodução dessa cultura pode ocorrer tanto de forma sexuada quanto assexuada, porém, acreditou-se durante muitos anos que a propagação vegetativa era a única maneira de disseminar a cana-de-açúcar (MOORE; BOTHA, 2014; PIERRE; RAE; BONNETT, 2014). Esta, entretanto, com o passar do tempo pode levar ao acúmulo de infecções sistêmicas por patógenos e, conseqüentemente, resultar no declínio varietal (MOORE; BOTHA, 2014; PIERRE; RAE; BONNETT, 2014). Nesse sentido, a utilização controlada da reprodução sexuada na cana-de-açúcar permitiu o desenvolvimento de novas variedades através dos programas de melhoramento genético (PIERRE; RAE; BONNETT, 2014).

Presume-se que a cana-de-açúcar foi domesticada por nativos da Nova Guiné há aproximadamente 10.000 anos e, em seguida, introduzida na Indonésia, China, Índia, Micronésia e Polinésia. Posteriormente, essa cultura foi difundida para outros locais, tais como: Caribe, América do Sul, Oceano Índico e ilhas do Pacífico (DANIELS; ROACH, 1987; ZHANG *et al.*, 2018). As cultivares modernas de cana-de-açúcar, por sua vez, são híbridos interespecíficos caracterizados pelo alto nível de poliploidia e aneuploidia e, assim, apresentam genoma bastante complexo, o que torna a cana-de-açúcar diferente das principais culturas e impõe vários desafios para o seu melhoramento (GARSMEUR *et al.*, 2018; RODY *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2018).



A presença de várias cópias funcionais de determinados genes da cana-de-açúcar é resultado de eventos independentes de poliploidização dentro do gênero *Saccharum*, após divergir do último ancestral comum com o gênero *Sorghum*, ou seja, desde a diversificação das gramíneas C<sub>4</sub> houve duplicação extra no genoma dessas plantas (VILELA *et al.*, 2017). Os genomas das cultivares modernas, por outro lado, são originados de hibridizações interespecíficas entre os sub-genomas de *S. officinarum* ( $2n=8x=80$ ) e *S. spontaneum* ( $2n=5x=40$  a  $16x=128$ ) (DANIELS; ROACH, 1987; GARSMEUR *et al.*, 2018; MORAIS *et al.*, 2015). A diferença no tamanho do genoma e no número básico de cromossomos entre essas duas espécies pode ser explicada pela presença de elementos transponíveis, além de alguns grandes rearranjos cromossômicos (GARSMEUR *et al.*, 2018).

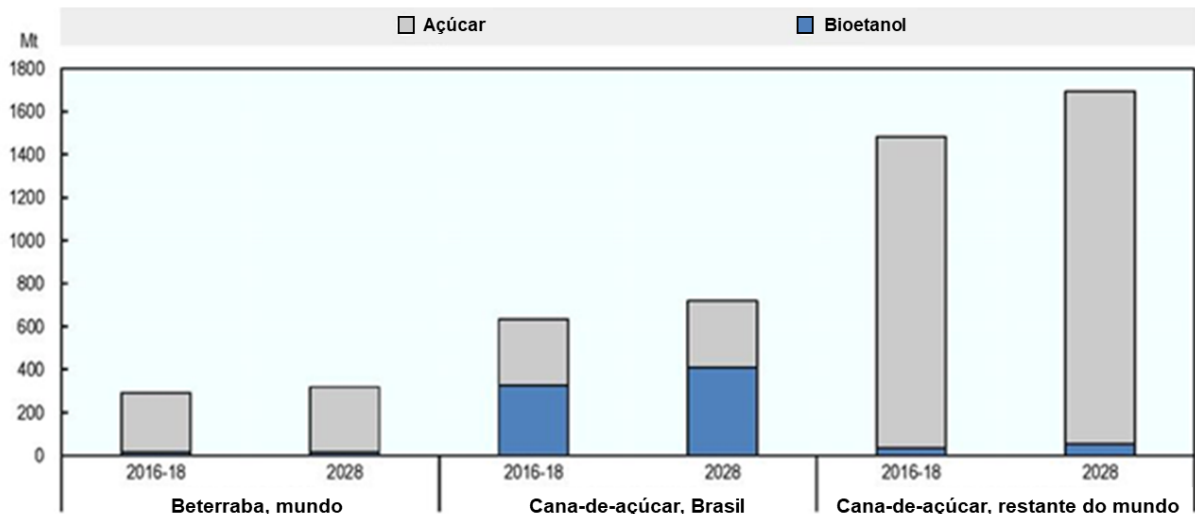
Apesar dos desafios, esforços têm sido feitos na busca pelo sequenciamento do genoma da cana-de-açúcar, como a montagem das sequências monoploides da cultivar R570 com 382 Mb e a montagem de 32 pseudo-cromossomos haploides de *S. spontaneum* (AP85-441) com 3,13 Gb (GARSMEUR *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018). Recentemente, foi publicado um estudo com o sequenciamento de 99,1% do genoma da cultivar SP80-3280, totalizando 373.869 genes preditos (SOUZA *et al.*, 2019). Assim, a disponibilidade do genoma da cana-de-açúcar possibilita a realização de novas pesquisas que favorecem o uso eficiente das ferramentas biotecnológicas pelos melhoristas para criação de cultivares superiores atendendo às necessidades dos produtores, da indústria e dos consumidores (ALI *et al.*, 2019; MOHAN, 2016).

### **3.1.1 Aspectos econômicos**

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importante do mundo, especialmente, em virtude da sua capacidade de síntese e armazenamento de elevadas concentrações de sacarose nos colmos sendo seus principais produtos o açúcar e o etanol (MIRAJKAR *et al.*, 2019). Essa cultura é responsável por 86% da produção do açúcar consumido globalmente, enquanto a beterraba compõe o restante do percentual (OECD/FAO, 2019). Devido ao seu grande potencial em biomassa, a cana-de-açúcar juntamente com o milho são as espécies mais utilizadas na produção do etanol ultrapassando trigo, beterraba e sorgo (KANDEL *et al.*, 2018; RULLI *et al.*, 2016).

A cana-de-açúcar está presente em mais de cem países sendo o Brasil o maior produtor, seguido por Índia, China e Tailândia (OECD/FAO, 2019). De acordo com as previsões, nas próximas décadas o Brasil continuará sendo o país que mais produz cana-de-açúcar, sendo atribuído 37% da produção mundial para 2028 (OECD/FAO, 2019). A produção anual chega a aproximadamente 1,8 bilhão de toneladas de cana-de-açúcar com uma área plantada total de 26 milhões de hectares, sendo esse número superior à estimativa de outras culturas alimentares importantes, tais como: milho, trigo e arroz (BORDONAL *et al.*, 2018; OECD/FAO, 2019). Na Figura 1 é apresentada a estimativa de produção de açúcar e bioetanol no Brasil e no mundo até 2028 em comparação àquela obtida nos últimos anos.

Figura 1 - Estimativa da produção de açúcar e bioetanol no Brasil e no mundo.



Fonte: OECD/FAO (2019) modificado.

Além disso, os subprodutos e resíduos gerados após a colheita e o processamento da cana-de-açúcar podem ser aproveitados e, a partir do uso de novas tecnologias pela indústria sucroalcooleira, têm sido obtidos outros produtos utilizados na alimentação humana e animal, na bioindústria, na fertilização de solos, na co-geração de energia, nos medicamentos veterinários e outros (ARAÚJO, 2016; MORAIS *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2020). Dentre os subprodutos e resíduos, destacam-se: o bagaço, no qual substitui o combustível fóssil e a madeira na geração de vapor e energia elétrica, além de ser utilizado na produção de etanol celulósico e alimentação animal; o melaço, em que participa da produção de etanol, da alimentação animal ou de outros processos fermentativos atribuídos à indústria química e farmacêutica; a vinhaça, na qual é usada como fertilizante, alimentação animal e produção de biogás; a torta de filtro é aproveitada como fertilizante nos

canaviais, visto que é rica em nitrogênio, fósforo, cálcio e matéria orgânica; as leveduras, devido ao seu potencial no desenvolvimento de novos produtos e derivados, pode colaborar com vários setores, tais como: saúde, alimentos e indústria (DOTANIYA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2020).

### 3.1.2 Cana-de-açúcar no Brasil

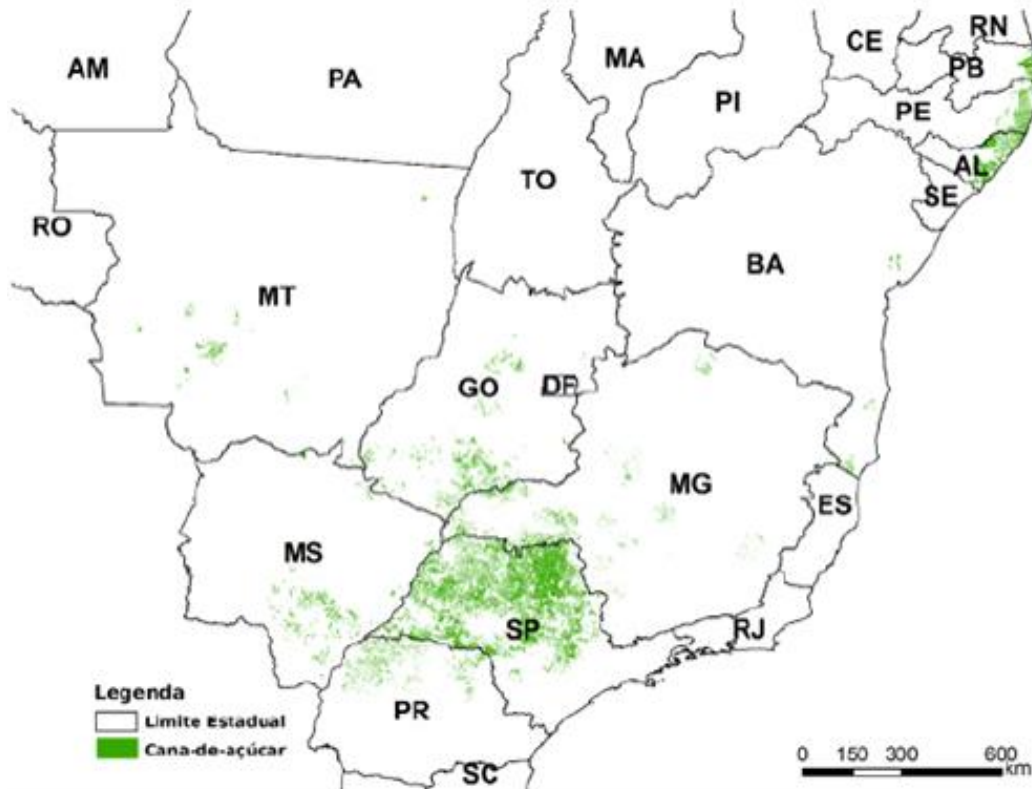
A cana-de-açúcar exerce um papel importante para o desenvolvimento econômico brasileiro desde o período colonial, entretanto, sua expansão foi alavancada em 1975 graças à criação do Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL) trazendo melhorias econômicas, sociais e científicas significativas para o país (HEINRICHS *et al.*, 2017; MORAES; MELLO; TOPPA, 2017; PESSOA-JR *et al.*, 2005). O PROÁLCOOL teve como finalidade impedir a crise do petróleo e a queda no preço do açúcar durante a década de 1970, em que a cana-de-açúcar foi eleita como principal cultura para produção de etanol devido às diversas vantagens apresentadas como sua adaptação às condições climáticas e ao solo brasileiro (MOREIRA; GOLDEMBERG, 1999; SOCCOL *et al.*, 2010).

Além de liderar a produção mundial de açúcar e etanol, o Brasil também apresenta a maior área cultivada chegando a mais de 8,4 milhões de hectares de cana-de-açúcar sendo esperado para safra 2021/2022 um rendimento de 628,1 milhões de toneladas. Estimativas também apontam que a produção de açúcar ultrapassará 38 milhões de toneladas, enquanto a produção de etanol será superior a 27 bilhões de litros (CONAB, 2021). O cultivo da cana-de-açúcar está presente em todas as regiões do país (Figura 2), sendo estimado que, para esta safra, a Região Centro-Sul seja responsável por aproximadamente 92% da produção nacional e a Região Norte/Nordeste pelo percentual remanescente (CONAB, 2021).

Além das condições climáticas favoráveis e práticas agronômicas adequadas, o sucesso do setor sucroalcooleiro no Brasil está relacionado com o desenvolvimento de novas cultivares comerciais, visto que diversos fatores bióticos e abióticos podem afetar negativamente a produtividade dessa cultura (MANECHINI *et al.*, 2018; NERKAR *et al.*, 2018; SOUZA; VAN-SLUYS, 2014). Dessa forma, várias instituições brasileiras, entre elas a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), têm contribuído com o melhoramento

genético da cana-de-açúcar visando desenvolver variedades altamente produtivas, tolerantes aos estresses e com teores de açúcar ou fibra elevados (KHAN; KHAN; YASMEEN, 2019; MANECHINI *et al.*, 2018; SOUZA; VAN-SLUYS, 2014).

Figura 2 - Mapeamento da distribuição geográfica das áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Brasil.



Fonte: CONAB (2021).

### 3.2 RAQUITISMO-DA-SOQUEIRA (RSD)

As plantas enfrentam vários estresses bióticos causados por bactérias, fungos, vírus, nematoides e insetos, podendo levar a perdas significativas no rendimento, assim como impactar a qualidade das culturas (GIMENEZ; SALINAS; MANZANO-AGUGLIARO, 2018; RANF, 2018). A cana-de-açúcar é hospedeira de dezenas de patógenos e sofre as consequências de diversas doenças (COMSTOCK, 2012; ROTT *et al.*, 2000). Uma das doenças mais importantes em termos econômicos é o raquitismo-da-soqueira (RSD - *Ratoon Stunting Disease*), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) (LI *et al.*, 2013; YOUNG *et al.*, 2006; YOUNG; BRUMBLEY, 2004). Pesquisas sobre a origem da RSD até a liberação dos híbridos modernos de cana-de-açúcar apontaram que, possivelmente, *Saccharum officinarum*, principal progenitor de cultivares modernas de cana-de-açúcar, não é o hospedeiro natural de *Lxx* (YOUNG, 2016). A teoria mais provável é

que o progenitor selvagem, *Saccharum spontaneum*, seja o hospedeiro natural e que esse fitopatógeno tenha sido disseminado através da hibridação interespecífica da cana-de-açúcar moderna em Java durante a década de 1920 (YOUNG, 2016).

O primeiro caso da RSD foi detectado na cultivar Q28 de cana-de-açúcar entre 1944 e 1945 em Queensland, na Austrália e desde então está presente em todos os lugares onde a cana-de-açúcar é cultivada (LI *et al.*, 2013; YOUNG, 2016). No início, acreditava-se que o agente causal do RSD se tratava de um vírus, visto que as tentativas de cultivo e microscopia não resultaram na visualização de microrganismo (YOUNG; NOCK, 2017). Apenas em 1972, as primeiras observações de uma bactéria relacionada a essa fitopatologia foram realizadas por meio de microscopia de contraste de fase (GILLASPIE; DAVIS; WORLEY, 1973). Apesar disso, não foi possível caracterizá-la até que, finalmente, o isolamento da bactéria causadora da RSD foi obtido sendo classificada como *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (DAVIS *et al.*, 1980; DAVIS *et al.*, 1984). Após a descoberta de outras espécies relacionadas e os avanços nas análises quimiotaxonômicas e moleculares, ela foi transferida para o gênero *Leifsonia*, na qual foi denominada de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) (EVTUSHENKO *et al.*, 2000).

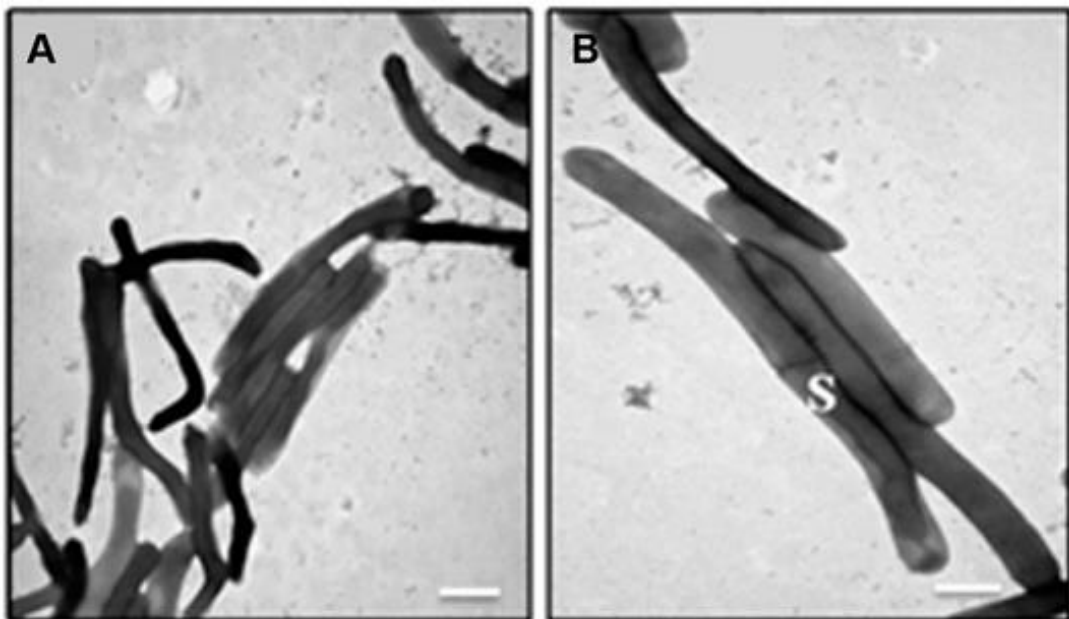
### 3.2.1 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*)

O gênero *Leifsonia*, pertencente ao filo Actinobacteria, inclui catorze espécies, no qual *Leifsonia xyli* é a única espécie fitopatogênica apresentando duas subespécies: *L. xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*), causadora da doença raquitismo-da-soqueira (RSD) na cana-de-açúcar e *L. xyli* subsp. *cynodontis* (*Lxc*), responsável pelo raquitismo da grama-bermuda (BSD; *Cynodon dactylis*) sob condições ambientais adversas (DAVIS *et al.*, 1983; DAVIS *et al.*, 1984). Através da inoculação de *Lxx* na grama-bermuda e de *Lxc* na cana-de-açúcar, observou-se que, além da ausência de sintomas externos, a infectiosidade é limitada (DAVIS *et al.*, 1983). Esses resultados sugerem que essa infectividade está mais relacionada à adaptação dos seus hospedeiros as respectivas cepas do que às defesas específicas do hospedeiro (DAVIS *et al.*, 1983; YOUNG, 2016). Além disso, experimentos *in vitro* demonstraram que *Lxx* é capaz de colonizar diversas espécies, tais como: milho, sorgo e outras gramíneas, podendo ser, posteriormente, reinoculada na cana-de-açúcar (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). Entretanto, *Lxx* não possui hábito de vida livre

e a cana-de-açúcar é o seu único hospedeiro natural descrito até o momento sendo, portanto, considerada um organismo endófito obrigatório dessa cultura, em que a patogenicidade e severidade da doença dependem de fatores bióticos e abióticos (ZAVAGLIA *et al.*, 2016).

A *Lxx* é uma bactéria gram-positiva, corineiforme, aeróbica, não-móvel e suas células são bastonetes retos ou ligeiramente curvos que, eventualmente, podem ser dilatados no meio ou nas pontas medindo de 0,25 a 0,35  $\mu\text{m}$  x 1,0 a 4,0  $\mu\text{m}$  (Figura 3) (CARVALHO *et al.*, 2016; GILLASPIE; TEAKLE, 1989; THIND, 2020). Após duas semanas de incubação em meio de cultura M-SC a 28°C, as colônias têm um aspecto circular com margem inteira, não-pigmentadas, convexas e medem entre 0,1 a 0,3 mm de diâmetro (DAVIS *et al.*, 1984; MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2004). Tais variações no tamanho celular são resultado dos diversos métodos de preparação das amostras (THIND, 2020). O cultivo *in vitro* de *Lxx* é laborioso, visto que essa bactéria é fastidiosa, ou seja, requer meios de cultura ricos em nutrientes, apresenta um crescimento muito lento levando entre 10 a 15 dias para o surgimento das colônias e mais de 21 dias para seu desenvolvimento em meio líquido (DAVIS *et al.*, 1984; HAAPALAINEN; MATTINEN; METZLER, 2000; ZHU *et al.*, 2019).

Figura 3 - Ultraestrutura celular interna de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* corada negativamente em ácido fosfotúngstico 1% sob microscopia eletrônica de transmissão (barra = 0,5  $\mu\text{m}$ ). **A** – Formato corineiforme e tipo “V” das células. **B** - Formação de um septo (S) na célula.



Fonte: Zhang *et al.* (2016a) modificado.

Durante muitos anos, as evidências sugeriam a ausência de diferentes cepas de *Lxx*, porém, a análise da diversidade genética da coleção internacional de *Lxx* mostrou que, independentemente do tempo de amostragem, cultivar de isolamento ou país de origem, há apenas um clone patogênico dessa bactéria no mundo (YOUNG *et al.*, 2006). Além disso, um estudo de genômica comparativa entre um isolado do Brasil (CTC-B07) e um da China (GXB-Z01) apontou que ambos os isolados são fundamentalmente idênticos, exceto pela presença de alguns SNPs e INDELS (ZHANG *et al.*, 2016a). Apesar das alterações nas sequências proteicas de GXB-Z01, o papel dessas proteínas relacionadas à patogenicidade permanece desconhecido (ZHANG *et al.*, 2016a). Entretanto, diversas cepas de *Lxx* associadas à cana-de-açúcar foram identificadas e, possivelmente, elas têm influência sobre os diagnósticos sorológicos e microscópicos de RSD sendo necessária a realização de ensaios epidemiológicos para confirmar essa hipótese (YOUNG; NOCK, 2017).

O sequenciamento total do genoma de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (CTC-B07) indicou a presença de um cromossomo circular com 2,6 Mpb (milhões de pares de base) com conteúdo guanina-citosina (GC) de 68% e um total de 2.351 genes preditos, dos quais 307 são pseudogenes sugerindo um processo de decaimento genômico (MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2004). Essa quantidade elevada de pseudogenes também demonstra que, inicialmente de vida livre, esse organismo tornou-se, ao longo da evolução, um endófito obrigatório (MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2004). Além disso, a *Lxx* apresenta o menor número de genes (105) relacionados à patogenicidade já verificado nas bactérias fitopatogênicas até o momento, em que 18% desses foram, presumivelmente, identificados como pseudogenes (MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2004). Esses resultados parecem explicar a ausência de sintomas específicos mesmo nas plantas com alto título bacteriano podendo, portanto, ser considerado um “fitopatógeno quase perfeito” (METZLER; LAINE; BOER, 1997; MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2004).

Análises com microscopia eletrônica de varredura de campo escuro evidenciaram a presença de *Lxx* nos vasos xilemáticos da cana-de-açúcar, sugerindo que este seja o principal nicho de colonização dessa bactéria (MARAMOROSCH *et al.*, 1973; DAMANN JUNIOR, 1988). Posteriormente, uma cepa mutante de *Lxx* transformada com o gene *gfp* nos tecidos da cana-de-açúcar revelou que esse fitopatógeno não está restrito aos vasos do xilema, mas também permanece nas células do mesófilo e nas células da bainha do feixe das folhas

infectadas sendo, portanto, capaz de se deslocar do xilema para o parênquima foliar (QUECINE *et al.*, 2015). A realização de observações microscópicas utilizando PCR *in situ* corroborou com os resultados anteriores e indicaram outro local de colonização da bactéria: o floema caulinar da cana-de-açúcar (GUO *et al.*, 2019).

### 3.2.2 Sintomas

Os sintomas da doença raquitismo-da-soqueira (RSD) são discretos, quando comparados aos sintomas causados por bactérias necrogênicas e, dessa maneira, *Lxx* é considerada um patógeno oculto (MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2009). O encurtamento dos entrenós, a redução no diâmetro e no comprimento dos colmos são os sintomas externos apresentados pelas plantas acometidas por essa doença (METZLER; LAINE; BOER, 1997; THIND, 2020). O crescimento mais lento com a produção de colmos mais finos, curtos e em quantidade reduzida nas plantas infectadas são consequências da presença de *Lxx* na cana-de-açúcar comprometendo os tecidos vasculares através da obstrução dos vasos xilemáticos e degradação da parede celular dos elementos de vaso (EVTUSHENKO *et al.*, 2000; YOUNG, 2018; ZHANG *et al.*, 2016a). Entretanto, esses sintomas não acontecem apenas em decorrência da infecção por *Lxx*, mas devido a vários outros aspectos, tais como: outros fitopatógenos, deficiência nutricional, déficit hídrico, além das práticas agrônômicas inapropriadas dificultando a identificação precisa do campo dessa fitopatologia (THIND, 2020; YOUNG, 2018).

Em relação aos sintomas internos, podem ser observadas manchas próximas aos meristemas laterais e apical nos nós de plantas jovens que variam em formato e coloração, de acordo com a severidade da doença e cultivar da cana-de-açúcar (METZLER; LAINE; BOER, 1997; THIND, 2020). Essa descoloração, possivelmente, está relacionada com a existência de uma substância eletrondensa de aspecto circular, granular e viscoso nos elementos de vaso, na qual é capaz de limitar o transporte de água e nutrientes na planta (THIND, 2020; ZHANG *et al.*, 2016a). Entretanto, ainda não há estudos a respeito da natureza química dessa substância podendo ser gomas, pectinas ou tiloses produzidas pela planta em resposta ao patógeno ou, ainda, fitotoxinas elaboradas pela bactéria (ZHANG *et al.*, 2016a).



### 3.2.3 Controle

O raquitismo-da-soqueira (RSD) é transmitido quando a seiva de uma planta infectada com *Lxx* entra em contato com uma planta saudável por meio da utilização de instrumentos contaminados no plantio ou colheita sendo favorecido pelo crescimento vegetativo da cana-de-açúcar (COMSTOCK, 2002; GILLASPIE; TEAKLE, 1989; MILLS *et al.*, 2001). O controle do RSD depende da eficiência na eliminação da bactéria, entretanto, essa é uma tarefa árdua, visto que todas as medidas apenas limitam sua propagação e, por isso, a *Lxx* permanece na cana-de-açúcar e pode reduzir a produtividade dessa cultura (URASHIMA *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2019). Diversos métodos físicos e químicos são empregados no controle do RSD, entre os quais destacam-se: a cultura de tecidos, o tratamento térmico, a sanitização dos equipamentos, quarentena e uso de variedades menos suscetíveis (COMSTOCK, 2002; GILLASPIE; TEAKLE, 1989; LI *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2019).

No Brasil, um dos métodos mais utilizados no controle do RSD é o tratamento térmico, que consiste na imersão dos colmos da cana-de-açúcar na água a 52°C durante 30 min causando baixo impacto na brotação das gemas (CARVALHO *et al.*, 2016; URASHIMA; GRACHET, 2012). A avaliação desse método demonstrou que não é totalmente eficaz, uma vez que 33% dos colmos ainda estavam infectados com *Lxx* mesmo após o tratamento (FERNANDES-JÚNIOR *et al.*, 2010). Apesar de não ser capaz de eliminar completamente *Lxx*, o tratamento térmico pode ser adotado para minimizar a população bacteriana nas plantas propagadas a partir de colmos infectados e, conseqüentemente, reduzir as perdas ocasionadas pela doença (CARVALHO *et al.*, 2016).

### 3.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico do raquitismo-da-soqueira (RSD) na cana-de-açúcar ainda no campo é fundamental, entretanto, esse procedimento é laborioso visto que se trata de uma doença causada por patógeno oculto com sintomas externos específicos inexistentes e os sintomas internos muitas vezes são ambíguos, além da chance de alguns perfilhos da mesma planta estarem saudáveis e outros não (MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2009; YOUNG *et al.*, 2016). No início, o diagnóstico do RSD era realizado por meio da inoculação do caldo de cana-de-açúcar infectada por *Lxx* nas

plantas de variedades suscetíveis à doença como, por exemplo, a Q28 e, em seguida, elas eram comparadas com as plantas não-inoculadas (THIND, 2020). Com a descoberta da bactéria causadora da doença, o diagnóstico passou a ser realizado por meio da observação da presença de *Lxx* no xilema do hospedeiro em microscópio de contraste de fase (PCM) (TEAKLE; SMITH; STEINDL, 1973).

Com os avanços científicos e tecnológicos, diversas análises microscópicas, sorológicas e moleculares têm sido aplicadas para o diagnóstico do RSD (WU *et al.*, 2018). Os métodos moleculares empregados na detecção de *Lxx* na cana-de-açúcar incluem a PCR convencional (*polymerase chain reaction*) (FEGAN *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2019), *nested*-PCR (FARAHANI; TAGHAVI; TAHER-KHANI, 2015; PELOSI *et al.*, 2013), PCR quantitativo em tempo real (qPCR) (CARVALHO *et al.*, 2016; FU *et al.*, 2016; GRISHAM; PAN; RICHARD, 2007; PELOSI *et al.*, 2013) e amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP - *loop-mediated isothermal amplification*) (GHAI *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2018). Os imunoenaios enzimáticos mais utilizados são: o DB-EIA (*dot-blot enzyme immunoassays*) (HOY; GRISHAM; DAMANN, 1999; URASHIMA; GRACHET, 2012), TB-EIA (*tissue-blot enzyme immunoassays*) (COMSTOCK *et al.*, 1996; GRISHAM; PAN; RICHARD, 2007) e EB-EIA (*evaporative-binding enzyme immunoassays*) (CROFT *et al.*, 1994; YOUNG *et al.*, 2016).

A técnica de qPCR apresenta grande destaque no diagnóstico e quantificação de fitopatógenos devido ao seu alto rendimento, rapidez, sensibilidade, especificidade e confiabilidade (FU *et al.*, 2016). A análise comparativa entre três métodos (PCR convencional, *nested* PCR e qPCR) para detecção de *Lxx* em colmos de cana-de-açúcar infectados demonstrou que a qPCR possui maior sensibilidade em comparação à técnica de PCR convencional, porém exibiu resultados semelhantes à *nested* PCR sendo qPCR mais adequada no diagnóstico do RSD em virtude das suas características adicionais supracitadas (FARAHANI; TAGHAVI; TAHER-KHANI, 2015). Um estudo conduzido por Wu *et al.* (2018) comparou o uso das técnicas de PCR convencional, qPCR e *Lxx*-LAMP na detecção de *Lxx* no caldo da cana-de-açúcar infectada e no plasmídeo recombinante *Lxx*-pMD18-T (usado como controle), revelando que apesar das três técnicas apresentarem alta reprodutibilidade, a *Lxx*-LAMP obteve maior sensibilidade.

Um método inovador no diagnóstico do RSD, desenvolvido por Young *et al.* (2014), é a utilização de amostras provenientes da bainha foliar (LSB - *leaf sheath*

*biopsies*) combinada com a técnica de PCR (LSB-PCR). Além de não ser destrutiva nem requerer etapas de extração de DNA, a LSB-PCR permite um aumento em mais de 3x na quantidade de plantas testadas em relação à técnica EB-EIA (YOUNG *et al.*, 2014). Recentemente, a comparação entre diferentes estratégias para o diagnóstico do RSD na cana-de-açúcar com *status* de infecção desconhecido demonstrou que tanto a PCR convencional quanto a qPCR de amostras da bainha foliar (LSB) foram capazes de detectar *Lxx* em várias cultivares de cana-de-açúcar entre 3 a 12 meses de desenvolvimento (YOUNG *et al.*, 2016). Embora a qPCR seja a mais sensível dos métodos testados, a PCR convencional mostrou resultados significativos no diagnóstico da doença, além de possuir custos mais reduzidos sendo, portanto, uma alternativa para os países em desenvolvimento dependentes da indústria sucroalcooleira (YOUNG *et al.*, 2016).

### 3.2.5 Importância econômica

A doença raquitismo-da-soqueira (RSD) é responsável pelas maiores perdas econômicas na cana-de-açúcar, em relação a outras fitopatologias que acometem essa cultura (THIND, 2020). Apesar disso, o quantitativo de perdas associado ao RSD é dependente de muitos aspectos, tais como: suscetibilidade da variedade, nível de infecção, disponibilidade de água, condições climáticas, além de outros fatores bióticos e abióticos (COMSTOCK, 2002; GAGLIARDI; CAMARGO, 2009; URASHIMA; MARCHETTI, 2013). No Brasil, essa doença está presente em todos os estados produtores e há muito tempo tem causado prejuízos econômicos significativos, em que foi verificada uma perda de produtividade entre 9 a 14% após o primeiro corte (cana-planta) e de 27 a 44% na colheita da cana-soca em três variedades cultivadas há 40 anos (TOKESHI; RAGO, 2016; VISWANATHAN, 2004).

Estudos anteriores constataram que a alta incidência de *Lxx* em canaviais brasileiros são independentes da época e região do país. Nos estados da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, por exemplo, essa incidência atingiu 68% nos anos de 2003 e 2004 (PONTE *et al.*, 2010). No estado de São Paulo, foi observada uma predominância de 25 a 29% dos canaviais infectados por *Lxx* entre 2005 e 2007, e 24 a 27% entre 2009 e 2011 (URASHIMA *et al.*, 2010; URASHIMA; MARCHETTI, 2013). A análise dos principais canaviais da região Centro-Sul do Brasil demonstrou que 10% desses foram positivos para *Lxx* e 58% das usinas de cana-de-açúcar

tiveram plantas com RSD sendo o maior percentual desses canaviais infectados correspondentes à variedade RB92579, na qual também teve a severidade mais elevada quando comparada às outras variedades (URASHIMA *et al.*, 2017). A variedade RB867515, a mais cultivada no Brasil, apresentou uma incidência de infecção nos canaviais de São Paulo de 70%, 48% e 88% em 2009, 2010 e 2011, respectivamente, na qual foi estimada uma perda econômica anual superior a 1 milhão de dólares em 2015 para região Centro-Sul brasileira (URASHIMA e MARCHETTI, 2013; URASHIMA *et al.*, 2017).

Um estudo recente da incidência temporal de *Lxx* em áreas que fornecem materiais propagativos para a formação de viveiros no Centro-Sul brasileiro mostrou um elevado nível de infecção provocada pela bactéria nas cinco cultivares mais utilizadas no país chegando a uma média de 40,2% nos anos de 2013 a 2018 (URASHIMA *et al.*, 2020). Uma tendência crescente de contaminação por *Lxx* foi prevista para essas áreas, pois em 2018 observou-se uma incidência muito significativa da doença e, além disso, todas cultivares analisadas tiveram alta suscetibilidade ao RSD, acarretando impactos negativos à indústria sucroalcooleira do país (URASHIMA *et al.*, 2020). Diante dos impactos econômicos gerados pela RSD, a busca por variedades resistentes à doença através dos programas de melhoramento torna-se essencial para redução dessas perdas (NELSON *et al.*, 2018; YOUNG, 2018).

### 3.3 INTERAÇÃO PLANTA-MICROORGANISMO

Nos ambientes naturais e agrícolas, as plantas se relacionam com diversos microrganismos, principalmente bactérias e fungos, proporcionando efeitos neutros, positivos ou negativos às plantas (FIORILLI *et al.*, 2020; NOMAN *et al.*, 2020). As interações entre plantas e microrganismos benéficos favorecem os efeitos positivos e esses microrganismos, então, promovem o crescimento vegetal, aumentam a tolerância aos estresses bióticos e abióticos, impulsionam a aquisição de nutrientes pelas plantas, estimulam a produção de fitormônios e, ainda, auxiliam na remediação ambiental recebendo em troca o carbono fixado fotossinteticamente pelos vegetais (FIORILLI *et al.*, 2020). Por outro lado, os efeitos negativos provocados pelos microrganismos envolvem a competição por recursos, o parasitismo e a patogênese resultando em vários danos para planta a hospedeira

que, conseqüentemente, poderão prejudicar o ecossistema e economia (SCHIRAWSKI; PERLIN, 2018). Essa última relação é considerada, portanto, parasitária e os microrganismos fitopatogênicos podem alimentar-se do hospedeiro vivo ou não sendo classificados em biotróficos ou necrotróficos, respectivamente (KUSHALAPPA; GUNNAIAH, 2013).

### **3.3.1 Resposta imune das plantas aos microrganismos**

As plantas são organismos sésseis, sujeitos ao ataque constante de microrganismos fitopatogênicos e dependem exclusivamente de seu sistema imune inato com sofisticados mecanismos no combate aos estresses bióticos, desenvolvidos ao longo da evolução (GIMENEZ; SALINAS; MANZANO-AGUGLIARO, 2018; WANG *et al.*, 2020). Entre as principais barreiras físico-químicas pré-formadas estão a cutícula, parede celular rígida e tricomas densos na epiderme, além da produção de metabólitos secundários com ação antimicrobiana (LIU *et al.*, 2021). Após a entrada de microrganismos no hospedeiro, as plantas são capazes de reconhecer elicitores exógenos ou padrões moleculares associados aos microrganismos/patógenos (MAMPs/PAMPs) por meio de receptores localizados na membrana da célula vegetal (DODDS; RATHJEN, 2010; KUSHALAPPA; GUNNAIAH, 2013). De maneira geral, tais MAMPs/PAMPs representam componentes da parede celular microbiana e possuem grande diversidade química como, por exemplo, carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (BOUTROT; ZIPFEL, 2017; RANF, 2018).

Além dos elicitores exógenos, as plantas também podem perceber a presença de microrganismos fitopatogênicos através da liberação de moléculas do próprio hospedeiro, conhecidas como elicitores endógenos ou padrões moleculares associados ao dano celular (DAMPs) (LI; WANG; MOU, 2020). Entre os DAMPs, destacam-se algumas proteínas citosólicas, peptídeos, aminoácidos e nucleotídeos provenientes de células danificadas ou até mesmo daquelas intactas invadidas por fitopatógenos (HOU *et al.*, 2019; RANF, 2018). Esses elicitores endógenos também incluem fragmentos oligoméricos de polissacarídeos oriundos da parede celular vegetal, liberados após o ataque das células do hospedeiro por enzimas microbianas degradadoras de parede celular (HOU *et al.*, 2019; RANF, 2018). Com funções de regular as respostas imunes e reparar os danos causados pelos microrganismos

invasores, os DAMPs presentes nas superfícies celulares são reconhecidos por receptores da membrana plasmática das células vizinhas (HOU *et al.*, 2019).

O sistema imunológico das plantas é formado por duas classes de receptores: os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), localizados na membrana celular, e os receptores do tipo NOD (NLRs), encontrados no citosol (CHEUNG *et al.*, 2020; WANG; CHAI, 2020). Os PRRs são classificados em receptores do tipo quinase (RLKs), nos quais estão presentes na membrana, e receptores do tipo proteína (RLPs), ambos responsáveis pela detecção dos elicitores (MAMPs/PAMPs e DAMPs) (DAVID; HARMON; CHEN, 2019; WANG; CHAI, 2020). As proteínas quinases associadas à parede celular (WAKs), uma subfamília de RLKs, também são consideradas como um dos PRRs mais comuns (NELSON *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019). Os RLKs apresentam um domínio de ligação extracelular, um domínio transmembrana e um domínio quinase intracelular de sinalização, enquanto os RLPs não possuem esse último (BOUTROT; ZIPFEL, 2017; COUTO; ZIPFEL, 2016). Além disso, baseado nas características estruturais do domínio de ligação extracelular, os PRRs podem ser divididos naqueles com repetições ricas em leucina (LRRs), ricos em lisina (LysM), ricos em cisteína (CRKs) e domínios de lectina (COUTO; ZIPFEL, 2016; ZIPFEL, 2014).

Através da ligação dos elicitores (MAMPs/PAMPs e DAMPs) aos PRRs, a sinalização intracelular é desencadeada e a expressão gênica no hospedeiro é modulada levando a uma primeira linha de defesa contra os fitopatógenos, conhecida como resposta imune desencadeada por PAMPs (PTI - *PAMP-triggered immunity*) ou resistência basal (MILLER; ALVES; VAN SLUYS, 2017; PENG; VAN WERSCH; ZHANG, 2018; YAMAGUCHI; HUFFAKER, 2011). Geralmente, a PTI é responsável pela resistência não-específica do hospedeiro, fenômeno em que a maior parte das plantas é resistente a um amplo espectro de fitopatógenos auxiliando na resistência quantitativa (DODDS; RATHJEN, 2010; MILLER; ALVES; VAN SLUYS, 2017; NELSON *et al.*, 2018). As respostas de sinalização e defesa características da PTI envolvem a despolarização da membrana plasmática com uma mudança rápida no efluxo de íons, aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma, indução de proteínas quinase dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e proteínas quinase ativadas por mitógenos (CDPKs e MAPKs), produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), síntese de óxido nítrico (NO), superexpressão de genes relacionados à defesa vegetal, maior acúmulo de enzimas antimicrobianas,

produção de metabólitos secundários, produção de fitormônios, fechamento estomático, deposição de calose e fortalecimento estrutural da parede celular (COUTO; ZIPFEL, 2016; KUSHALAPPA; YOGENDRA; KARRE, 2016; RANF, 2018).

Entretanto, na tentativa de inibir a PTI, proteínas efetoras codificadas por genes de avirulência (*Avr*) são liberadas na célula hospedeira pelos microrganismos invasores e interferem no reconhecimento de MAMPs/PAMPs e DAMPs pelos PRRs possibilitando o estabelecimento do fitopatógeno na planta num processo denominado suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS - *effector-triggered susceptibility*) (KHAN; SUBRAMANIAM; DESVEAUX, 2016; KUSHALAPPA; GUNNAIAH, 2013; PETIT-HOUDENOT; FUDAL, 2017). A planta hospedeira, por sua vez, responde a essa invasão por meio de NLRs codificados por genes de resistência (*R*) que reconhecem os efetores específicos dos fitopatógenos (*Avr*) direta ou indiretamente resultando numa segunda linha de defesa, chamada de imunidade desencadeada por efetores (ETI - *effector-triggered immunity*) ou interação gene-a-gene (KUSHALAPPA; YOGENDRA; KARRE, 2016; NELSON *et al.*, 2018; THORDAL-CHRISTENSEN, 2020). Diferentemente da PTI, a ETI compõe a resistência qualitativa ou monogênica limitando a propagação de tais microrganismos através de suas propriedades antimicrobianas e fortalecimento da parede celular (KUSHALAPPA; GUNNAIAH, 2013; KUSHALAPPA; YOGENDRA; KARRE, 2016; NELSON *et al.*, 2018).

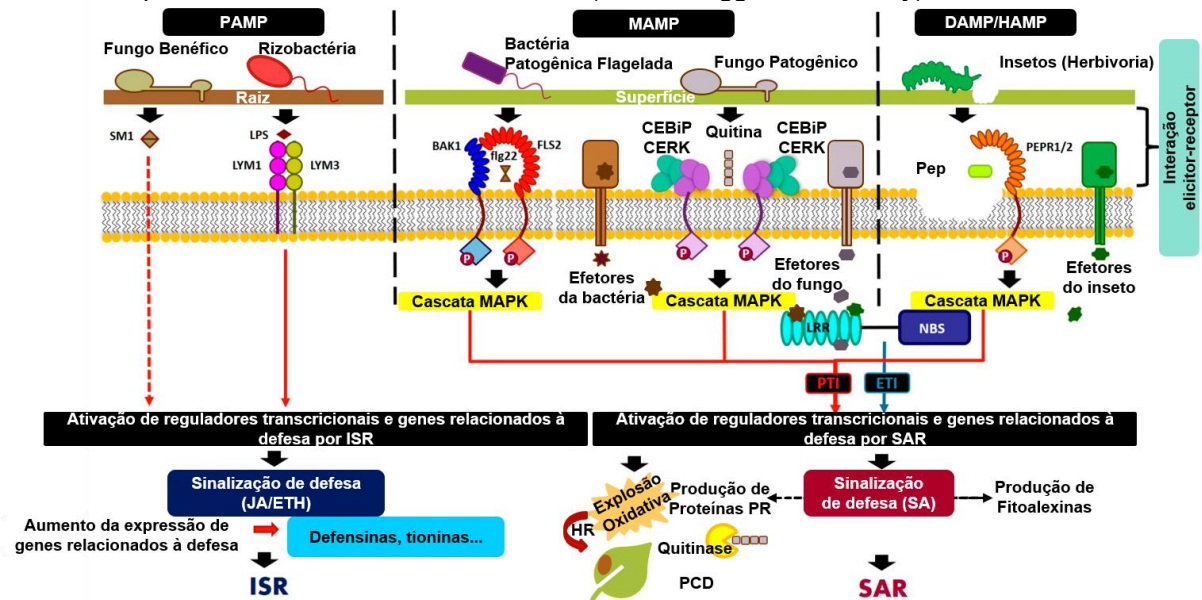
Uma das respostas da planta hospedeira no combate aos microrganismos, especialmente aqueles denominados biotróficos, observadas na ETI é a resposta hipersensitiva ou resposta de hipersensibilidade (HR - *hypersensitive response*), controlada por genes *R*, que induz a morte programada das células vegetais (PCD) próximas ao local de infecção inicial, ocasionando uma lesão necrótica no tecido circunvizinho que impede controlar o avanço da doença (BÜRGER; CHORY, 2019; KUSHALAPPA; GUNNAIAH, 2013). Apesar de funcionar como um mecanismo de defesa contra os microrganismos biotróficos, a PCD pode favorecer os necrotróficos (BÜRGER; CHORY, 2019; NELSON *et al.*, 2018). O balanço intracelular dos níveis de EROs e NO desempenha um papel fundamental no controle da HR, pois ambos são responsáveis pelo início da morte celular nas plantas (SADHU *et al.*, 2019; WANG; LOAKE; CHU, 2013). Recentemente, foi revelado que após o ataque de microrganismos necrotróficos, ocorre um acúmulo de EROs, tais como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxila ( $OH^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ),

promovendo o processo de autofagia pró-sobrevivência como um mecanismo de defesa (SADHU *et al.*, 2019). Porém, o contato prolongado com o fitopatógeno estimula uma cascata de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , na qual favorece o aumento do estresse oxidativo e produção de NO provocando a morte celular (SADHU *et al.*, 2019). Além do  $\text{Ca}^{2+}$ , outras moléculas-chave influenciadas pela atividade de EROs e NO envolvem as MAPKs e fosfatases (WANG; LOAKE; CHU, 2013).

A planta hospedeira sobrevivente à infecção inicial, na maioria das vezes, torna-se resistente aos ataques posteriores ocasionados pelo mesmo fitopatógeno ou espécies relacionadas por meio de dois tipos de respostas: a resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (ISR), ambas características da ETI variando de acordo com a natureza do patógeno (Figura 4) (BÜRGER; CHORY, 2019; MALIK; KUMAR; NADARAJAH, 2020). O aumento na concentração de ácido salicílico (SA) é o principal fator responsável pela indução da síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PRs - *pathogenesis-related proteins*) executando, assim, uma função essencial na resistência sistêmica adquirida (SAR), na qual tem como consequência a ativação da resposta imune contra os fitopatógenos biotróficos (BÜRGER; CHORY, 2019). Por outro lado, o ácido jasmônico (JA) provoca a resistência sistêmica induzida (ISR) promovendo uma cascata de sinalização na planta hospedeira que, por sua vez, ativa os mecanismos de proteção contra os fitopatógenos necrotróficos (MALIK; KUMAR; NADARAJAH, 2020). Normalmente, as vias de sinalização do SA e JA são antagônicas sofrendo interferência de outros fitormônios, tais como: etileno (ET), ácido abscísico (ABA), auxina (AUX), citocinina (CK), giberelina (GA), brassinosteróides (BRs) e estrigolactonas (SLs), envolvidos na resposta de defesa (BÜRGER; CHORY, 2019; LI *et al.*, 2019).



Figura 4 - Esquema simplificado da resposta imune vegetal aos microrganismos benéficos/fitopatogênicos e insetos. Após o reconhecimento dos elicitores (PAMPs, MAMPs e DAMPs/HAMPs) por meio de receptores do hospedeiro, uma cascata de sinalização é desencadeada resultando na PTI (PAMP-triggered immunity). Alguns fitopatógenos são capazes de suprimir a PTI e a planta, por sua vez, responde a essa invasão ativando a ETI (effector-triggered immunity).



Fonte: Malik; Kumar; Nadarajah (2020) modificado.

### 3.3.2 Mecanismos de defesa da cana-de-açúcar contra bactérias fitopatogênicas

No Brasil, mais de 40 doenças provocadas por bactérias, fungos, vírus, fitoplasmas e nematoides têm afetado a cultura da cana-de-açúcar (TOKESHI; RAGO, 2016). Entre as doenças bacterianas mais relevantes para o setor sucroalcooleiro encontram-se a escaldadura foliar, a estria vermelha e o raquitismo-da-soqueira, que têm como agentes causais *Xanthomonas albilineans*, *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, respectivamente (ROTT *et al.*, 2000; VISWANATHAN; RAO, 2011).

A escaldadura foliar, provocada pela bactéria *Xanthomonas albilineans*, tem como principal consequência a diminuição do crescimento vegetal e pode levar até a morte da planta sendo essa doença controlada, primariamente, através de mecanismos de defesa do hospedeiro (GUTIERREZ; GARCES; HOY, 2016; MENG *et al.*, 2020). Através da análise comparativa do transcriptoma foliar das cultivares de cana-de-açúcar resistente (LCP 85-384) e suscetível (ROC20) à infecção por *X. albilineans*, foi verificado um aumento nos processos biológicos de interação planta-patógeno, spliceossoma, metabolismo da glutatona, processamento de proteínas e

transdução de sinais por fitormônios (NTAMBO *et al.*, 2019). Além disso, a validação desses dados via qRT-PCR comprovou a expressão diferencial de genes da planta relacionados às vias de sinalização de ET e AUX sugerindo o desempenho de funções importantes na cana-de-açúcar durante a infecção por esse patógeno como, por exemplo, a indução da SAR (NTAMBO *et al.*, 2019).

Outra doença importante da cana-de-açúcar é a estria vermelha, ocasionada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (*Aaa*), na qual são observadas estrias vermelhas, marrons ou pretas e até necrose foliar e podridão podendo afetar os colmos, retardar o crescimento e resultar na morte da planta (GIRARD *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2018). O transcriptoma diferencial da cana-de-açúcar (var. SP70-1143) cultivada *in vitro* inoculada com *Aaa* apresentou 467 genes diferencialmente expressos (DEGs), dos quais vários processos biológicos apresentaram diferenças significativas em sua regulação, especialmente àqueles envolvidos na síntese de proteínas de resposta ao estresse, metabolismo dos carboidratos, transcrição e tradução, metabolismo dos aminoácidos e biossíntese de metabólitos secundários atuando, possivelmente, na defesa vegetal após infecção por *Aaa* (SANTA-BRIGIDA *et al.*, 2016).

A análise dos DEGs evidenciou a indução de alguns genes associados às vias biossintética de ET e JA, PRRs, produção e acúmulo de EROs, proteínas NLRs, fortalecimento da parede celular, genes indutores da SAR, assim como genes PRs sugerindo que tanto os mecanismos de PTI quanto ETI são ativados na cana-de-açúcar infectada por *Aaa* (SANTA-BRIGIDA *et al.*, 2016). Além disso, os dados transcriptômicos de duas cultivares de cana-de-açúcar, uma resistente (LCP 85-384) e outra suscetível (ROC22) à bactéria *Aaa*, indicaram que a maioria dos DEGs está relacionada com as vias da fotossíntese, metabolismo do carbono, biossíntese de fenilpropanoides, transdução de sinais por fitormônios e interação planta-patógeno demonstrando que, possivelmente, esses processos são primordiais na resposta à infecção por *Aaa* (CHU *et al.*, 2019).

Alguns estudos fisiológicos têm sido realizados na tentativa de desvendar os mecanismos de defesa envolvidos na resposta da cana-de-açúcar frente à bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*), causadora do raquitismo-da-soqueira (RSD). Segundo Zhang *et al.* (2016b), parâmetros fotossintéticos da cana-de-açúcar, especificamente condutividade estomática, CO<sub>2</sub> intracelular, taxa fotossintética e de transpiração, são afetados negativamente pela presença de *Lxx*. Além disso, foi

observada uma diminuição na altura da planta, diâmetro e peso dos colmos, assim como no potencial hídrico, da cana-de-açúcar infectada por *Lxx*, enquanto a permeabilidade da membrana e produção de aminoácidos foram aumentados em comparação às plantas controle (ZHU *et al.*, 2018). Por outro lado, a análise dos possíveis impactos provocados pela colonização de *Lxx* nos vasos xilemáticos da cana-de-açúcar (CB49260) revelou que a presença da bactéria não modifica o estado hídrico da planta mesmo sob condições de déficit hídrico (GARCIA *et al.*, 2021).

Além disso, alguns dados têm evidenciado a interferência de *Lxx* na atividade de enzimas envolvidas na defesa vegetal. As folhas de cana-de-açúcar inoculadas com *Lxx* apresentaram diminuição significativa nas atividades da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e catalase (CAT), enquanto a superóxido dismutase (SOD), e peroxidase (POD) foram aumentadas (ZHANG *et al.* 2016b). Outro estudo também apontou para indução da expressão gênica de fenilalanina amônia-liase (PAL), proteína dedo de zinco (ZFP), e dos genes de resistência do tipo NBS-LRR em resposta à infecção por *Lxx* (ZHU *et al.*, 2018). Algumas enzimas relacionadas ao metabolismo C<sub>4</sub> da cana-de-açúcar apresentaram expressão diferencial após a inoculação por *Lxx*, entre as quais destacam-se: fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), piruvato fosfato diquinase (PPDK) e a enzima málica dependente de NADP (NADP-ME) interferindo na assimilação do carbono (CO<sub>2</sub>) e, conseqüentemente, nos processos fotossintéticos da cana-de-açúcar (GUO *et al.*, 2019).

A análise das concentrações de fitormônios do colmo da cana-de-açúcar demonstrou que as plantas infectadas por *Lxx* manifestaram uma redução nos teores de ácido indolacético (AIA) e ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e um acréscimo de ácido abscísico (ABA) (ZHANG *et al.*, 2016a). Posteriormente, plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) geneticamente transformadas via *Agrobacterium tumefaciens* superexpressando o gene *Lxx18460* exibiram resultados negativos nas taxas de crescimento e fotossíntese, na atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e POD), bem como nos níveis dos fitormônios AIA, ABA e GA<sub>3</sub> (ZHU *et al.*, 2019). Esses resultados sugerem que o gene *Lxx18460* possivelmente desempenha um papel fundamental no processo de infecção da cana-de-açúcar por *Lxx* (ZHU *et al.*, 2019).

A análise transcriptômica da cana-de-açúcar cultivar Badila, altamente suscetível ao RSD, infectada com *Lxx* exibiu uma alteração na frequência de

ontologias dos DEGs ligados ao metabolismo fotossintético, transdução de sinais por fitormônios e interação planta-patógeno (ZHU *et al.*, 2021). Através da análise de expressão gênica da cana-de-açúcar (SP80-3280) aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) de *Lxx*, foram identificados 267 DEGs relacionados, majoritariamente, às categorias de ciclo celular, transdução de sinais e ao metabolismo hormonal, sugerindo uma relação entre a amplificação da resposta transcricional da planta e o alto título bacteriano (CIA *et al.*, 2018). Já o perfil metabolômico diferencial da cana-de-açúcar em resposta a *Lxx* revelou metabólitos diferenciais, especialmente foliar, com maior abundância de aminoácidos na cultivar CB49-260 e de compostos fenólicos, flavonoides, ácido salicílico (SA), além de sorbitol e glicerol na cultivar SP80-3280, regulando os níveis populacionais da bactéria no hospedeiro (CASTRO-MORETTI *et al.*, 2021).

### 3.4 PROTEÔMICA

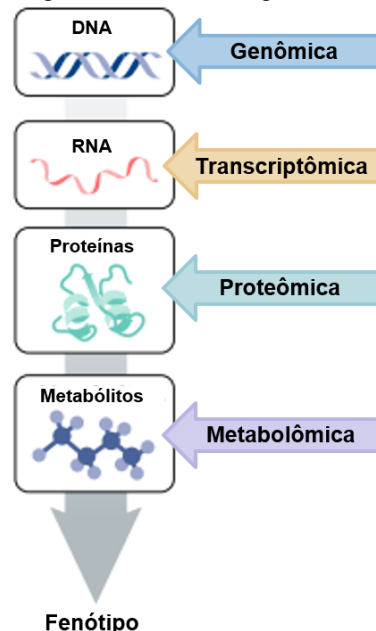
O termo proteoma foi descrito há mais de 20 anos e diz respeito ao conjunto de proteínas acumuladas numa organela, célula, tecido, órgão ou organismo em determinado período e condição do seu ciclo de vida (WASINGER *et al.*, 1995; WILKINS *et al.*, 1996). A proteômica, então, é definida como o estudo do proteoma de uma amostra e envolve a identificação e abundância dessas proteínas, bem como a predição de sua estrutura, funções, interações, modificações e localização na célula ou tecido (CARVALHO *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019). Dessa maneira, a proteômica é uma ferramenta primordial na caracterização de um sistema biológico complementando as informações presentes no genoma e no transcriptoma (ASLAM *et al.*, 2017; COX; MANN, 2007; NICE, 2021).

As proteínas são consideradas as moléculas regulatórias e efetoras finais de muitas funções biológicas e, por isso, estão mais próximas ao fenótipo (ASLAM *et al.*, 2017; NICE, 2021). Alguns processos que modulam a expressão e função de determinada proteína, tais como modificações pós-traducionais (PTMs), *splicing* alternativo e interações proteína-proteína, dificilmente podem ser compreendidos a partir de dados genômicos e transcriptômicos (NICE, 2021; ZAPALSKA-SOZONIUK *et al.*, 2019). Nesse sentido, a integração das “ômicas”, apresentada na Figura 5, favorece a obtenção de respostas completas e a interpretação apropriada desses

dados complexos evitando a adição de fatores extras que possam interferir no estudo (ZAPALSKA-SOZONIUK *et al.*, 2019).

Uma das etapas cruciais da análise proteômica é a separação prévia da mistura complexa proteica provenientes de determinada amostra biológica e pode ser realizada de duas maneiras diferentes: *gel-based* ou *gel-free* (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2015). A primeira metodologia inclui a extração e quantificação das proteínas de uma amostra, separação por eletroforese uni (1-DE) ou bidimensional (2-DE) em gel de poliacrilamida ou, ainda, eletroforese diferencial em gel (DIGE), digestão trípica e identificação via espectrometria de massas (MS) (CHAMPAGNE; BOUTRY, 2013; TAN; LIM; LAU, 2017). A segunda técnica, embora apresente as mesmas etapas iniciais da *gel-based*, não requer separação das proteínas por eletroforese, sendo a digestão trípica feita a partir de soluções proteicas complexas, seguida de separação por cromatografia líquida (LC) dos peptídeos e, posteriormente, identificação por MS (CHAMPAGNE; BOUTRY, 2013; TAN; LIM; LAU, 2017). Apesar das vantagens de ambas estratégias, a utilização da análise proteômica *gel-based* e *gel-free* em conjunto, minimiza as limitações e incrementa o número de proteínas identificadas e informações obtidas (VADIVEL, 2015).

**Figura 5** - Representação das abordagens “ômicas” integrativas.



Fonte: Rinschen *et al.* (2019) modificado.

A análise proteômica se fundamenta em duas abordagens de espectrometria de massas (MS): a *top-down* ou a *bottom-up* (BLUDAU; AEBERSOLD, 2020; CHAIT, 2006). Na estratégia de *top-down*, as proteínas intactas são separadas por

cromatografia, ionizadas, introduzidas na fase gasosa, fragmentadas no espectrômetro de massas e, posteriormente, analisadas propiciando uma maior cobertura da sequência e a detecção tanto de modificações pós-traducionais (PTMs) quanto de isoformas (CATHERMAN; SKINNER; KELLEHER, 2014; CHAIT, 2006; TIMP; TIMP, 2020). A estratégia *bottom-up* é amplamente utilizada e envolve a digestão enzimática das proteínas em pequenos peptídeos, os quais são separados por eletroforese ou cromatografia líquida, ionizados e, então, analisados no espectrômetro de massas (BLUDAU; AEBERSOLD, 2020; CHAIT, 2006; TIMP; TIMP, 2020). Nessa última, os peptídeos tripticos, geralmente, são analisados via MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) ou ESI (*Electrospray Ionization*) e, alternativamente, seus componentes podem ser separados primeiro por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas em tandem (LC-MS/MS) (TIMP; TIMP, 2020). Em analogia ao sequenciamento completo do genoma, o uso da abordagem *bottom-up* numa mistura complexa de proteínas, fracionada e submetida à análise por LC-MS/MS, ficou conhecida como proteômica *shotgun* (YATES, 2004).

A aplicação da proteômica em inúmeros estudos tem possibilitado o avanço de algumas áreas. Na clínica, a utilização dessa abordagem concentra-se na identificação de biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de muitas doenças, principalmente nos casos de câncer sendo, portanto, o futuro da medicina personalizada (DOLL; GNAD; MANN, 2019; HE, 2019). Na indústria farmacêutica, a proteômica tem auxiliado tanto na busca por novos alvos terapêuticos, quanto na produção fármacos com alto rendimento visto que as proteínas são moléculas chave nesse processo (FRANTZI; LATOSINSKA; MISCHAK, 2019). Relativamente recente, a análise proteômica de diferentes espécies vegetais tem proporcionado informações sobre os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nos processos de crescimento vegetal e tolerância aos fatores bióticos e abióticos (HU; RAMPITSCH; BYKOVA, 2015; TAN; LIM; LAU, 2017). A identificação de biomarcadores permite contribuir com os programas de melhoramento resultando no aumento da produtividade das culturas comercialmente importantes (PACHECO *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2020).

### 3.4.1 Eletroforese bidimensional (2DE)

A eletroforese bidimensional (2DE) é uma técnica bioquímica clássica, considerada muito poderosa na separação de proteínas provenientes amostras biológicas complexas sendo ainda muito utilizada, especialmente, nos estudos de proteômica vegetal (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2019; MELEADY, 2018; NING; WU; WANG, 2016). As principais vantagens do uso da 2D-PAGE envolvem a simplicidade do método, o baixo custo, a identificação de proteínas presentes em organismos com genoma não-sequenciado, a identificação de isoformas proteicas, além do fornecimento de alguns sinais de modificações pós-traducionais (PTMs) (GOEZ *et al.*, 2018; JORRÍN-NOVO *et al.*, 2019). Apesar de algumas centenas de proteínas serem obtidas a partir de uma análise proteômica via 2DE, inclusive algumas dessas relacionadas às variantes de PTMs, esse quantitativo constitui apenas uma pequena parcela do proteoma total (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2019).

Entretanto, isso não é apenas uma consequência da técnica empregada, mas também se refere às outras etapas experimentais da análise de proteômica (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2019). Além disso, a ferramenta de 2DE apresenta limitações na detecção de proteínas hidrofóbicas ou alcalinas, com baixo acúmulo, pesos moleculares muito altos ou proteínas com faixa de pH extrema (JORRÍN-NOVO *et al.*, 2019; MELEADY, 2018). Portanto, na tentativa de superar essas dificuldades, é imprescindível a aplicação de uma metodologia adequada na extração das proteínas, bem como o uso combinado à 2DE de outras ferramentas existentes garantido sua utilidade em pesquisas futuras (NING; WU; WANG, 2016; YADAV *et al.*, 2020). Por outro lado, os avanços nas tecnologias de LC-MS/MS têm reduzido a utilização de géis 2D-PAGE nos estudos proteômicos, entretanto, o pré-fractionamento de misturas proteicas complexas por SDS-PAGE ainda é bastante empregado (ZHANG *et al.*, 2013).

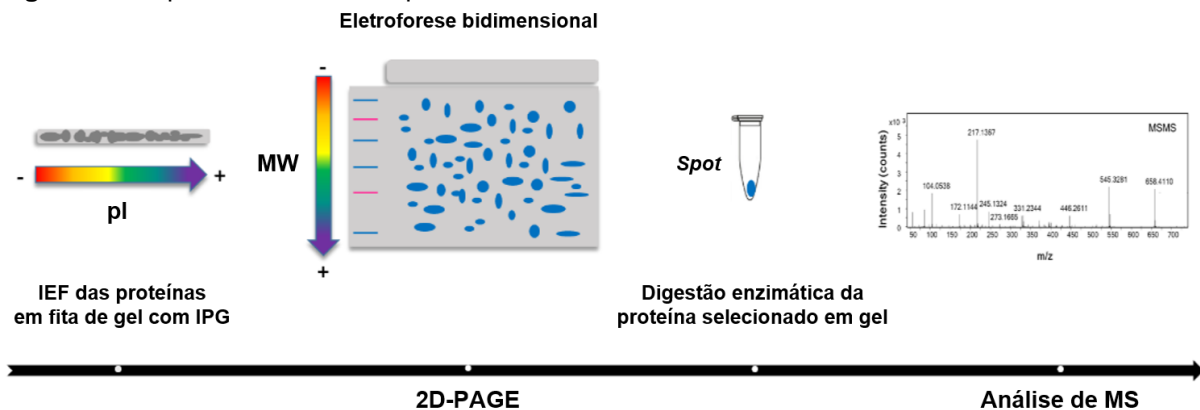
A eletroforese bidimensional (2DE) possui duas etapas de separação, como podem ser observadas na Figura 6. Na primeira dimensão as proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico (pI), ou seja, a diferença de suas cargas por meio da focalização isoelétrica (IEF) (MAGDELDIN *et al.*, 2014; NARYZHNY, 2016). A aplicação do extrato proteico sobre uma fita de gel com gradiente de pH imobilizado (IPG) submetida à IEF faz com que peptídeos e proteínas, conforme a composição de seus aminoácidos e resíduos carregados, se

comportem como ácidos e bases fracos migrando sob um campo elétrico até o alcance do seu ponto isoelétrico (pI), isto é, até que sua carga líquida seja zero (PERGANDE; COLOGNA, 2017). Na segunda dimensão, as proteínas são resolvidas com base na sua massa molecular (MW) através da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (NARYZHNY, 2016).

Para detecção dos *spots*, os géis, normalmente, são corados com azul de Coomassie (R-250, R-350 e G-250) ou nitrato de prata (NARYZHNY, 2016). Para escolha do corante, vários fatores devem ser levados em consideração, tais como: sensibilidade, linearidade e compatibilidade com as análises de MS (NARYZHNY, 2016). Enquanto a coloração com nitrato de prata apresenta alta sensibilidade (pg), baixa linearidade e precisão, além de incompatibilidade com as análises de MS, o azul de Coomassie possui sensibilidade moderada (ng), mas alta linearidade, precisão e compatibilidade com MS sendo este último corante, portanto, a melhor alternativa para realização dos estudos proteômicos (NARYZHNY, 2016).

Após a obtenção das imagens dos géis, as diferenças na intensidade de um mesmo *spot* são comparadas entre as replicatas e tratamentos das amostras com o auxílio de *softwares* a fim de indicar as proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) (PADULA *et al.*, 2017; RABILLOUD; LELONG, 2011). Assim, esses *spots* diferenciais são excisados, submetidos à digestão e, posteriormente, seus peptídeos tripticos analisados por MS e identificados (PADULA *et al.*, 2017; PERGANDE; COLOGNA, 2017). Ao final da análise proteômica baseada em 2DE, geralmente, são obtidos os padrões dos peptídeos característicos de cada proteína, conhecidos como “impressões digitais” (PMF - *peptide mass fingerprinting*) (MARCUS; LELONG; RABILLOUD, 2020).

**Figura 6** - Etapas de uma análise proteômica bidimensional.



Fonte: Pergande e Cologna (2017) modificado.



### 3.4.2 Espectrometria de massas (MS)

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica essencial aos estudos proteômicos, na qual consiste na volatilização, ionização e detecção dos analitos presentes numa amostra baseada na sua razão massa/carga ( $m/z$ ) e intensidade visando identificar e quantificar os mesmos (NOOR *et al.*, 2020). Basicamente, o espectrômetro de massas possui três componentes principais: uma fonte de ionização, na qual os analitos são ionizados e acelerados por um campo eletromagnético; um analisador de massas, responsável pela separação dos íons de acordo com sua  $m/z$ ; e um detector, onde os íons resultantes são contabilizados (Figura 7) (PHANSE; EMILI, 2020; STACHNIUK; FORNAL, 2016).

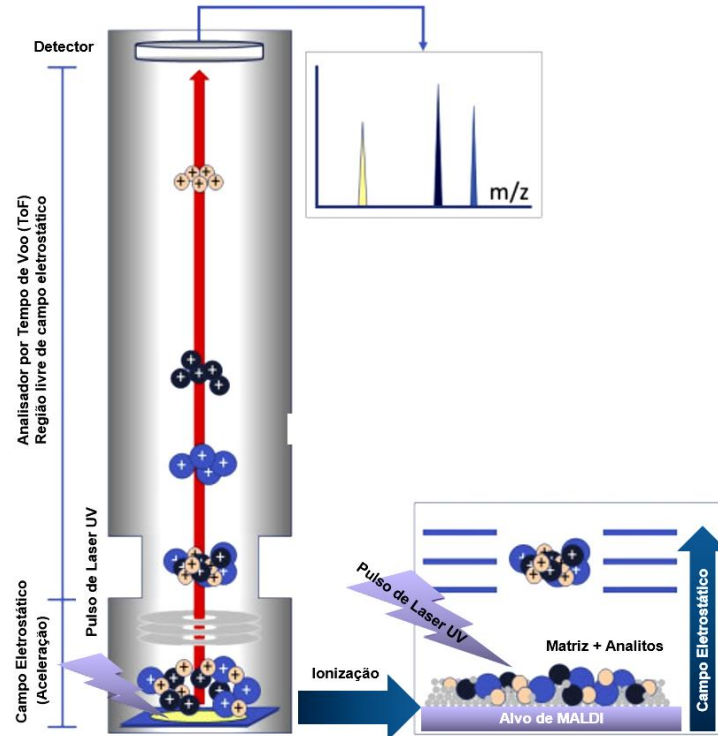
A ionização, geralmente, é realizada a partir da incorporação de energia às moléculas de peptídeo, nos quais resultam em espécies carregadas positivamente (cátions) ou negativamente (ânions) sendo a metodologia empregada variável de acordo com a estrutura e o princípio de operação do ionizador disponível (NOOR *et al.*, 2020; STACHNIUK; FORNAL, 2016). Entre os métodos de ionização existentes mais empregados nas análises proteômicas, destacam-se MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) e ESI (*Electrospray Ionization*), principalmente, por apresentarem alta sensibilidade, maior precisão, diversas formas de separação e fácil execução (NADLER, *et al.*, 2017).

Tanto MALDI quanto ESI são consideradas técnicas de ionização suave e, dessa forma, sua aplicação provoca nenhuma ou baixíssima fragmentação das biomoléculas permitindo que os íons dos analitos sejam identificados mesmo em misturas complexas (NOOR *et al.*, 2020; SUSNEA *et al.*, 2013). Na técnica de MALDI, um curto pulso laser é aplicado sobre os peptídeos co-cristalizados com uma matriz orgânica como, por exemplo, o ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), nos quais estão localizados sobre uma placa numa câmara à vácuo absorvendo fortemente a luz ultravioleta (UV) e, então, as moléculas de íons são transferidas para fase gasosa (Figura 7) (HOU; CHIANG-NI; TENG, 2019).

Contudo, estudos têm sugerido a aplicação complementar de ambas as técnicas tendo em vista que diferenças entre MALDI e ESI influenciam diretamente nas distribuições de frequência de várias propriedades físico-químicas dos peptídeos (NADLER *et al.*, 2017). Em comparação com a técnica de ESI, o uso de MALDI na análise de peptídeos e proteínas possui algumas vantagens, entre as quais

destacam-se: a facilidade na preparação das amostras, alta sensibilidade, tolerância a baixas concentrações de sais e detergentes, aquisição rápida de dados robustos, além de viabilizar a realização de múltiplas análises numa determinada amostra, pois apenas uma pequena área é consumida pelo laser (SUSNEA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016).

Figura 7 - Estrutura de um espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF.



Fonte: Hou; Chiang-Ni; Teng (2019) modificado.

As limitações do MALDI estão relacionadas à influência na qualidade do espectro de massas pela posição do laser, dificuldade na detecção de proteínas de baixo peso molecular, além de variações na co-cristalização das proteínas na matriz prejudicando a ionização de algumas amostras, especialmente, das misturas complexas (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009; WANG *et al.*, 2016). Apesar desses aspectos, MALDI ainda é reconhecida como uma técnica viável, rápida e confiável com grande potencial de aplicação nas análises proteômicas vegetais, principalmente, em relação à descoberta de biomarcadores contribuindo com os programas de melhoramento de plantas (MEHTA; SILVA, 2015).

Enquanto nas análises baseadas em 2DE normalmente é utilizado o método de MALDI, na proteômica *shotgun* as proteínas são separadas por cromatografia líquida e os peptídeos eluídos da coluna são ionizados diretamente por uma fonte ESI antes de alcançar o espectrômetro de massas (GILLET; LEITNER;

AEBERSOLD, 2016). Um dos maiores avanços nessas análises, foi a utilização da cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) potencializando o poder de resolução, velocidade de separação e reprodutibilidade em comparação à metodologia de HPLC, devido às reduções no tamanho das partículas da resina cromatográfica, além do aumento na pressão do sistema e no comprimento da coluna (FEIST; HUMMON, 2015; ZHANG *et al.*, 2013).

O analisador de massas atua na separação dos íons de acordo com sua  $m/z$  por meio de um campo eletromagnético num ambiente a vácuo e sob baixa pressão sendo considerado, portanto, o principal componente do espectrômetro de massas (NOOR *et al.*, 2020). Na análise proteômica, diversos tipos de analisadores de massas podem ser empregados, entre os quais destacam-se: o tempo de voo (ToF), quadrupolo (Q), ressonância ciclotônica de íons por transformada de Fourier (FT-ICR), aprisionamento de íons (IT) e *Orbitrap* (PHANSE; EMILI, 2020). Essencialmente, esses analisadores diferem na maneira de separação ou fragmentação dos íons, precisão e resolução na determinação das massas, amplitude da faixa de detecção das massas, além de outros parâmetros (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009; PHANSE; EMILI, 2020).

No analisador de massas do tipo ToF, os íons gerados na fonte de ionização são acelerados, percorrem um tubo de voo sob vácuo no qual é livre de campo elétrico ou magnético e, então, são separados conforme sua  $m/z$  (HAAG, 2016). Ao alcançar o detector, o tempo de voo dos íons é determinado sendo sua velocidade inversamente proporcional à raiz quadrada de sua massa a uma energia cinética constante (TSAI *et al.*, 2015). Assim, os íons com massas menores chegarão rapidamente ao detector, enquanto aqueles que possuem massas maiores levarão um intervalo de tempo maior para percorrerem o tubo de voo (HAAG, 2016). Uma variação desse analisador de massas é o ToF-ToF, no qual possui dois analisadores do tipo ToF, além de uma câmara de colisão (CID) entre os dois tubos de voo e, dessa forma, apresentam alto poder de resolução, sensibilidade e precisão de massa (DOMON; AEBERSOLD, 2006; HAAG, 2016).

No analisador de massas ToF-ToF, o íon conhecido como parental ou precursor é selecionado no primeiro analisador tipo ToF, fragmentado na câmara de colisão e, em seguida, as massas dos fragmentos são separadas no segundo ToF resultando na aquisição de espectros do tipo MS/MS (AEBERSOLD; MANN, 2003; GRECO *et al.*, 2018). Dessa maneira, as amostras submetidas a esse analisador

podem ser exploradas tanto ao nível de MS quanto MS/MS proporcionando maior rapidez na execução das análises que em associação à fonte de ionização tipo MALDI, torna-se ideal para a identificação de peptídeos digeridos enzimaticamente oriundos de 2D-PAGE (DOMON; AEBERSOLD, 2006; HAAG, 2016). Após a separação baseada na razão  $m/z$  no analisador de massas, os íons finalmente alcançam o detector, no qual é responsável por captar os seus sinais, amplificá-los e indicar suas abundâncias (NOOR *et al.*, 2020).

### 3.4.3 Proteômica da cana-de-açúcar em resposta aos estresses bióticos

A exposição constante das plantas aos fatores bióticos e abióticos induzem a ativação de uma resposta rápida e complexa, na qual nem sempre é capaz de combater esses estresses, prejudicando severamente sua produtividade (BAILLO *et al.*, 2019; JAVED *et al.*, 2020). A cana-de-açúcar é uma das culturas mais relevantes para economia mundial, entretanto, várias doenças podem prejudicar seu rendimento intensificando a necessidade de compreender as respostas bioquímicas, fisiológicas e moleculares da planta frente aos patógenos e, conseqüentemente, auxiliar nos programas de melhoramento (BARNABAS *et al.*, 2015; ENGELHARDT; STAM; HÜCKELHOVEN, 2018). Entretanto, o melhoramento da cultura canavieira é um trabalho árduo, principalmente, devido ao seu genoma complexo e à propagação vegetativa sendo, portanto, fundamental o uso das ferramentas moleculares nesse processo (ALI *et al.*, 2019; JAVED *et al.*, 2020). Assim, os avanços nos estudos envolvendo as abordagens “ômicas”, tais como genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, têm revelado vários mecanismos moleculares envolvidos na interação planta-patógeno auxiliando no controle das doenças (ASHWIN *et al.*, 2017; TAN; LIM; LAU, 2017).

A análise proteômica vegetal permite compreender os processos celulares e moleculares envolvidos na interação planta-microrganismo, pois as proteínas participam diretamente de toda ação celular (JAIN; SINGH; DAS, 2021). O aumento expressivo no número de sequências genômicas disponíveis provenientes tanto das plantas quanto de seus patógenos, associada ao desenvolvimento das tecnologias de massas (MS), têm possibilitado entender o papel das proteínas envolvidas na tolerância ao estresse, entretanto, quando comparada às outras abordagens “ômicas” e ao seu próprio potencial, a análise proteômica ainda é pouco explorada

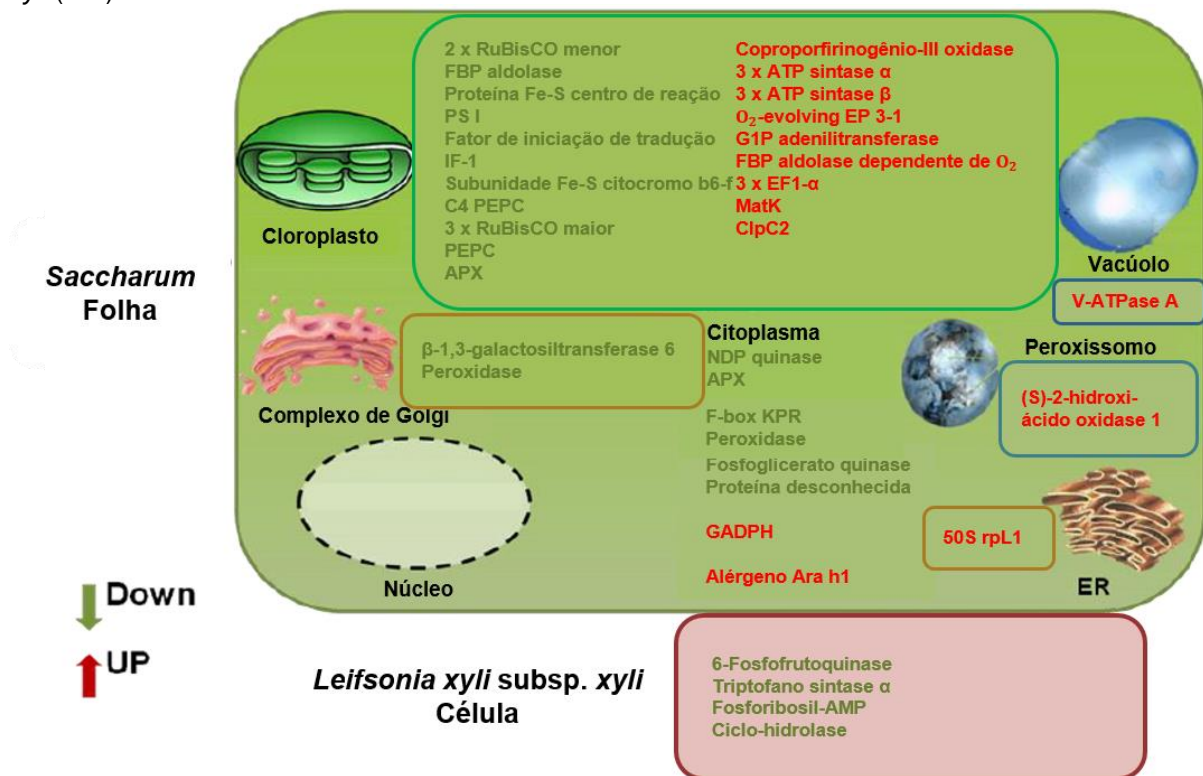
(ASHWIN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2019). A resposta imune das plantas frente aos fatores bióticos é considerada complexa sendo, portanto, resultado da interação de vários sinais e do acúmulo diferencial de algumas proteínas que, geralmente, atuam em conjunto (GONG; HU; WANG, 2015; LIU *et al.*, 2019). Por isso tudo, a análise proteômica vegetal torna-se indispensável na identificação, caracterização e categorização por processo biológico das DAPS, as quais podem atuar como potenciais biomarcadores favorecendo o melhoramento vegetal (AHMAD *et al.*, 2016; FANG *et al.*, 2015).

A investigação do perfil proteômico foliar das cultivares de cana-de-açúcar LCP 85-384 (tolerante) e ROC20 (sensível) inoculadas com *X. albilineans* revelou 285 proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) sendo a maioria delas associada à biossíntese de metabólitos secundários e mecanismos de defesa vegetal (MENG *et al.*, 2020). Esse estudo também demonstrou que as DAPs relacionadas à defesa, mais acumuladas na cultivar tolerante à escaldadura foliar, participam da biossíntese de fenilpropanoides, proteólise mediada pela ubiquitina e metabolismo de glutatona (MENG *et al.*, 2020). No estudo do proteoma quantitativo de duas cultivares de cana-de-açúcar infectadas por *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Aaa), realizado por Zhou *et al.* (2021), foram identificadas 1.027 DAPs em ROC20 (tolerante) e 1.030 em MT11-610 (sensível). Desse total, algumas proteínas de defesa, encontradas pela primeira vez na cana-de-açúcar em interação com patógeno, estão envolvidas na transdução de sinais, resposta imunológica, metabolismo de carboidratos e energético, além de outras vias (ZHOU *et al.*, 2021).

A análise proteômica diferencial das folhas de cana-de-açúcar (RB867515) em interação com *Lxx* revelou 56 DAPs responsivas aos estresses bióticos, defesa, desenvolvimento, e metabolismo de carboidratos (ALMEIDA, 2015). A Figura 8 apresenta os principais mecanismos moleculares relacionados à interação planta-patógeno evidenciados nesse estudo, sendo observado um baixo acúmulo de proteínas envolvidas na fotossíntese e na resposta ao estresse oxidativo, em contrapartida, há um aumento na abundância de proteínas com função intracelular similar às PRs, como a proteína alergênica Ara h1 em resposta à infecção por *Lxx* (ALMEIDA, 2015). Além disso, no estudo do proteoma foliar de cana-de-açúcar (SP80-3280) inoculadas com *Lxx*, após 30 e 60 dias, foram identificadas 150 DAPs associadas ao metabolismo de carboidratos, metabolismo de proteínas, regulação da transcrição, defesa e ciclo celular (CIA *et al.*, 2018).

Contudo, nenhuma análise proteômica caulinar envolvendo a interação cana-de-açúcar x *Lxx* foi realizada até o momento, embora os colmos apresentem grande relevância para investigação dos mecanismos moleculares associados ao RSD (ZHANG *et al.*, 2016a). Adicionalmente, a cana-de-açúcar acumula altas concentrações de sacarose nos seus colmos sendo, assim, o órgão vegetal de maior importância econômica para essa cultura (TAVARES *et al.*, 2018). Por isso tudo, a seleção de proteínas envolvidas nesse patossistema, aplicadas como biomarcadores no melhoramento da cultura canavieira, contribuirá com o desenvolvimento de cultivares de cana-de-açúcar tolerantes e/ou resistentes à infecção por *Lxx* causando impactos positivos no mercado (BARNABAS *et al.*, 2015; YOUNG, 2018).

Figura 8 - Modelo biológico do proteoma foliar da cana-de-açúcar associada à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*).



Fonte: Almeida (2015) modificado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ARTIGO 1

#### **Proteômica bidimensional caulinar de cana-de-açúcar revela mecanismos moleculares de resposta associados à infecção por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli***

Rayssa Guedes Gomes da Silva<sup>1</sup>, Renata Rodrigues de Almeida<sup>1</sup>, Fabiana Aparecida Cavalcante Silva<sup>2</sup>, Tercilio Calsa Junior<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50740-580, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife 50740-545, Brasil

\*Autor correspondente: telefone: +55 81 21267829; e-mail: [tercilio.calsaj@ufpe.br](mailto:tercilio.calsaj@ufpe.br)

#### **Resumo**

O raquitismo-da-soqueira (RSD), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*), é uma das principais doenças que acometem a cana-de-açúcar e ocorre no mundo inteiro, impactando negativamente o setor sucroalcooleiro. Apesar disso, o papel das proteínas do hospedeiro envolvidas na interação com *Lxx* ainda não foi completamente desvendado. No presente estudo, o proteoma do colmo de cana-de-açúcar (var. RB867515) inoculado ou não com *Lxx* foi analisado por eletroforese bidimensional (2DE) e espectrometria de massas (MS). Um total de 76 proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) foram identificadas revelando uma maior abundância de proteínas associadas à defesa nas plantas infectadas, incluindo uma proteína com domínio NB-ARC. Algumas proteínas ativadas em resposta aos danos no DNA provocados por *Lxx*, tais como a PARP1 e a AGO10b foram verificadas. Além disso, a presença de *Lxx* nos colmos da cana-de-açúcar parece interferir no ciclo celular da planta com a indução da TPX2 e inibição da MAP3Kε1. Esses resultados favorecem a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nesse patossistema e poderão contribuir com os programas de melhoramento da cultura canavieira.

## Abstract

Ratoon stunting disease (RSD), caused by the bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*), is one of the main diseases that affect sugarcane and occurs all over the world, negatively impacting the sugar alcohol market. Despite this, the role of host proteins involved in the interaction with *Lxx* has not yet been completely unraveled. In the present study, the proteome of sugarcane stalk (var. RB867515) inoculated or not with *Lxx* was analyzed by two-dimensional electrophoresis (2DE) and mass spectrometry (MS). A total of 76 differentially accumulated proteins (DAPs) were identified revealing a greater abundance of defense associated proteins in infected plants, including a NB-ARC domain-containing protein. Some proteins activated in response to DNA damage caused by *Lxx*, such as PARP1 and AGO10b, have been verified. Furthermore, the presence of *Lxx* in sugarcane stalks seems to interfere in the plant cell cycle with the induction of TPX2 and inhibition of MAP3K $\epsilon$ 1. These results favor the understanding of the molecular mechanisms involved in this pathosystem and may contribute to sugarcane breeding program.

## Significância Biológica

O presente trabalho fornece as principais respostas traducionais e pós-traducionais da cana-de-açúcar infectada por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) alterando várias vias metabólicas do hospedeiro. Este é o primeiro estudo com identificação de proteínas diferenciais de colmos da cana-de-açúcar envolvidas na resposta à interação com *Lxx*. Dessa maneira, os resultados apresentados juntamente com os demais estudos “ômicos” acerca desse patossistema permitem um melhor entendimento acerca dos mecanismos moleculares. Além disso, a identificação de possíveis biomarcadores facilita o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar tolerantes e/ou resistentes à infecção por *Lxx*.



## Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta perene com metabolismo C<sub>4</sub>, membro da subtribo Saccharinae, tribo Andropogoneae e família Poaceae (FICKETT *et al.*, 2020). Em razão do seu grande potencial de síntese e acúmulo de altas concentrações de sacarose nos colmos, essa cultura é a principal matéria-prima para produção de açúcar e etanol (MIRAJKAR *et al.*, 2019). Essa monocotiledônea é cultivada no mundo inteiro, especialmente, nas regiões tropicais e subtropicais sendo o Brasil o maior produtor, seguido por Índia, China e Tailândia (OECD/FAO, 2019). Entretanto, diversos fatores bióticos e abióticos podem prejudicar o rendimento e a produtividade da cana-de-açúcar causando grandes impactos econômicos que, associados à alta demanda por alimentos pela crescente população mundial, têm estimulado os programas de melhoramento (SALVATO *et al.*, 2019).

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram complexos mecanismos de defesa contra os patógenos, porém, nem sempre elas são capazes de contornar essa situação (GIMENEZ; SALINAS; MANZANO-AGUGLIARO, 2018; WANG *et al.*, 2020). O raquitismo-da-soqueira (RSD), causado pela bactéria fastidiosa e endofítica obrigatória *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*), é uma das principais doenças que acometem a cana-de-açúcar e está presente em todo o mundo resultando em perdas significativas para o setor sucroalcooleiro (CIA *et al.*, 2018; DAVIS *et al.*, 1984). Esse fitopatógeno está presente no interior dos vasos xilemáticos, floema caulinar e parênquima foliar da cana-de-açúcar provocando, assim, o encurtamento dos entrenós, redução no diâmetro e comprimento dos colmos (FARIA *et al.*, 2020; QUECINE *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2019). Os sintomas do RSD são discretos e facilmente confundidos com outros estresses, nos quais podem intensificar a invasão do hospedeiro por *Lxx* comprometendo o diagnóstico e o controle dessa doença (ZHU *et al.*, 2021).

Embora esses impactos sejam relevantes, muitos programas de melhoramento não têm considerado o RSD uma prioridade, visto que os mecanismos moleculares envolvendo o patossistema cana-de-açúcar x *Lxx* ainda não foram completamente elucidados e a maioria dos estudos têm sido direcionados, predominantemente, ao controle e diagnóstico do RSD (ZHU *et al.*, 2021). Assim, a aplicação das ferramentas proteômicas para identificação de

possíveis biomarcadores relacionados à defesa contra esse fitopatógeno pode, portanto, contribuir para a seleção e o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar tolerantes e/ou resistentes ao RSD evitando as perdas associadas à doença. Neste sentido, o presente trabalho objetivou identificar proteínas diferencialmente acumuladas nos colmos da cana-de-açúcar em resposta à infecção por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*).

## **Materiais e Métodos**

### Material vegetal e cultivo bacteriano

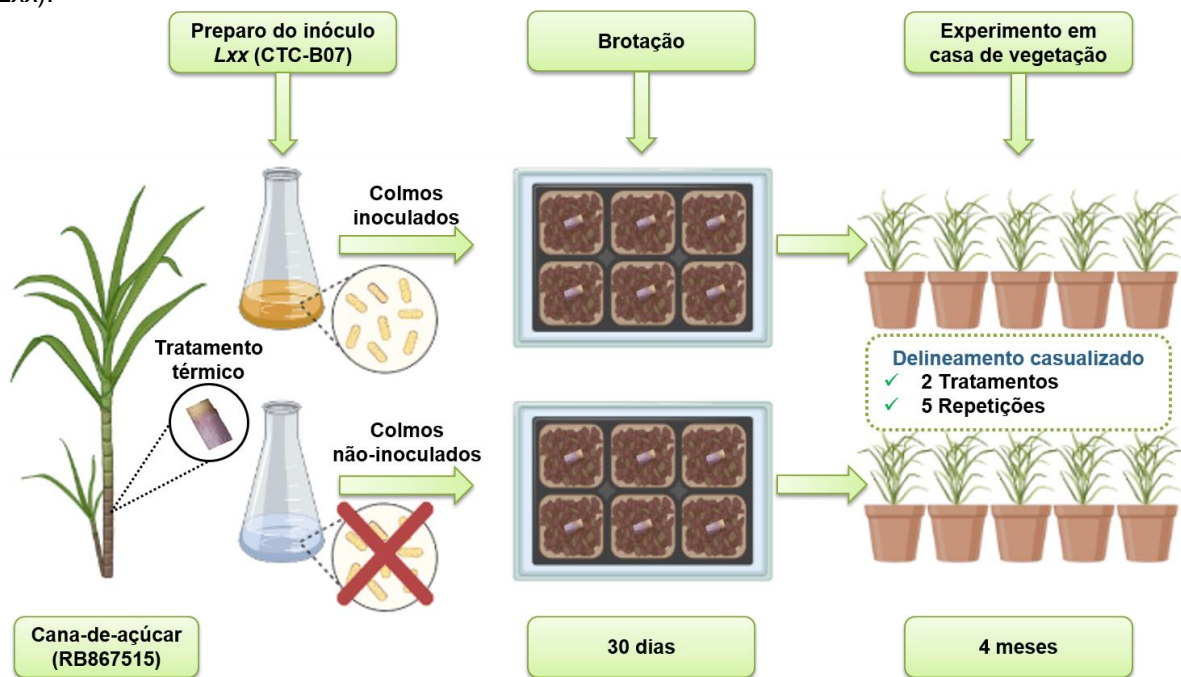
Os rebolos de cana-de-açúcar RB867515, uma das variedades mais cultivadas nas regiões Nordeste e Centro-Oeste do Brasil, foram disponibilizados pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucro-Alcooleiro (RIDESA). O experimento foi realizado em casa de vegetação, na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, Universidade Federal Rural de Pernambuco (EECAC, UFRPE). A cepa CTC-B07 da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) foi gentilmente concedida pelo Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). O inóculo de *Lxx* foi cultivado em meio líquido M-SC sob agitação de 130 rpm a 28°C durante 10 dias (DAVIS *et al.*, 1984; MONTEIRO-VITORELLO *et al.*, 2004). Então, o seu crescimento foi mensurado até atingir a densidade óptica (DO) de 0,335 a 600 nm, equivalendo a  $10^{12}$  células.mL<sup>-1</sup>, aproximadamente. Em seguida, uma alíquota do inóculo foi diluída em água ultrapura para obter uma suspensão bacteriana em torno de  $10^9$  células.mL<sup>-1</sup>.

### Inoculação e crescimento das plantas

A fim de reduzir a concentração de células de *Lxx*, os colmos foram tratados termicamente por submersão em água a 50,5°C durante 2 h e, em seguida, resfriados a temperatura ambiente (DAMANN JUNIOR; BENDA, 1983; URASHIMA; GRACHET, 2012). Logo após o resfriamento, parte dos rebolos foram inoculados com *Lxx* por imersão em suspensão celular a  $10^9$  células.mL<sup>-1</sup> por 1 h. O restante dos rebolos foi imerso em água ultrapura estéril pelo mesmo tempo. Posteriormente, os segmentos de colmo foram plantados em bandejas de polietileno com solo

autoclavado para brotação. Após 30 dias, as plantas foram deslocadas para vasos contendo solo autoclavado em casa de vegetação, dispostas inteiramente ao acaso com dois tratamentos (não-inoculado e inoculado com *Lxx*) e cinco repetições cada (Figura 1). A coleta dos colmos de ambos os tratamentos foi feita aos 120 dias do transplântio. Imediatamente, as amostras foram fracionadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso.

Figura 1 - Esquema do delineamento experimental realizado em casa de vegetação a partir de colmos de cana-de-açúcar (RB867515) inoculados ou não com a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*).



### Confirmação da presença de *Lxx*

O DNA total das plantas não-inoculadas (controle) e inoculadas (estresse) foi extraído através das folhas +1 coletadas aos 120 dias do transplântio (DOYLE; DOYLE, 1990). Os títulos bacterianos foram quantificados por PCR em tempo real (qPCR) utilizando os iniciadores específicos *LxxF* (5'-AGGATTCGGTTCTCATCTCA-3') e *LxxR* (5'-AAGGAGCATCTGGCACCCCT-3') desenhados a partir da região ITS do genoma de *Lxx* (FEGAN *et al.*, 1998). As reações foram executadas no sistema RotorGene 6000 (Corbett Research) com o uso da tecnologia SYBR Green® qPCR Master Mix (Thermo Scientific), segundo as instruções do fabricante. As reações de amplificação consistiram em 20 ng do DNA molde, 0,4  $\mu\text{M}$  de cada *primer* a 10 mM, 2x SYBR Green® qPCR Master Mix (Thermo Scientific) e água ultrapura estéril para

um volume final de 15  $\mu$ L. Para o protocolo de qPCR foram aplicados os seguintes parâmetros: um ciclo inicial de 95°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 s, anelamento a 57°C por 15 s e extensão a 60°C por 60 s. Então, o produto obtido foi submetido a aquecimento gradual de 60-95°C para construção da curva de dissociação. Os valores de Cq (ciclo de quantificação) encontrados nas plantas não-inoculadas (controle) foram comparados aos das plantas inoculadas com *Lxx* (estresse) para determinar a concentração relativa de DNA bacteriano no hospedeiro.

### Extração e quantificação de proteínas

As proteínas totais de colmo da cana-de-açúcar foram extraídas utilizando o método fenólico conforme Hurkman e Tanaka (1986), com modificações descritas por Boaretto (2012). A extração foi realizada a partir de cinco réplicas biológicas das plantas não-inoculadas (controle) e inoculadas com *Lxx* (estresse) e, ao final, os extratos proteicos foram agrupados a fim de obter um tubo para cada tratamento. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz e pistilo, previamente resfriados. Logo depois, 2 g de tecido pulverizado foram transferidos para um tubo de microcentrífuga e homogeneizados em tampão de extração [0,5 M de Tris-HCl (pH 7,5), 0,7 M de sacarose, 0,1 M de KCl, 50 mM de EDTA-Na, 2 mM de PMSF (fluoreto de fenil-metano-sulfonil), 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 1% de PVPP (polivinilpolipirrolidona)] mantidos em agitação a 70 rpm, a 4°C. Após 30 min, o mesmo volume de fenol equilibrado com Tris-HCl (pH 8,5) foi adicionado aos tubos sob as mesmas condições e, em seguida, centrifugados a 10000xg por 30 min a 4°C.

A fase fenólica foi transferida para um novo tubo e acrescentou-se cinco volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol gelado a esse extrato fenólico sendo incubados a -20°C por 18 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 16.000x g por 30 min a 4°C e o precipitado submetido a três lavagens: 1. 0,1 M de acetato de amônio em metanol 100%, 2. metanol 100% e 3. acetona 100%. A cada lavagem, as amostras foram incubadas a -20°C por 30 min e centrifugadas por 16.000x a 4°C g durante 30 min. Então, os precipitados foram secos a 4°C, ressuspensos em solução de ureia 8 M e tiourea 2 M e, em seguida, realizada a sonicação com 60% de amplitude em cinco pulsos de 5 s intercalados com pausas

de 10 s. A quantificação das proteínas totais foi realizada, em triplicata, pelo método descrito por Bradford (1976). As leituras de absorbância foram feitas no espectrofotômetro (Biochrom WPA Biowave II) a 595 nm, e a albumina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich) na concentração de 2,0 mg.mL<sup>-1</sup> foi utilizada para construção da curva padrão.

#### Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

A integridade das proteínas foi analisada por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 12,5% (LAEMMLI, 1970), 20x20 cm, utilizando o sistema Omniphor MV 20 (Biosystems). O gel SDS-PAGE foi preparado a partir da solução de gel de corrida [solução Tris de corrida (4x), acrilamida 30%, APS 10% e TEMED em água ultrapura] e da solução de gel de empacotamento [solução Tris de empacotamento (4x), acrilamida 30%, APS 10% e TEMED em água ultrapura]. Após a polimerização, 4 µL de marcador molecular (*Low Marker*, GE Life Sciences) e 50 µg de proteínas de cada amostra (controle e estresse) foram aplicados no gel.

A migração proteica ocorreu sob voltagem constante de 300 V em duas etapas: 17 mA de corrente por 30 min, seguida de 34mA de corrente durante 2 h e 30 min, em temperatura ambiente no tampão de corrida [192 mM Tris, 25 mM glicina, SDS 0,1% (m/v)]. Posteriormente, o gel foi submetido à fixação [ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v)] por 30 min sob agitação e, em seguida, corado com uma solução de azul de Coomassie [Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1% (m/v), sulfato de amônio 10% (m/v), ácido fosfórico 2% (v/v) e metanol 20% (v/v)] para revelação das bandas. Após 16 h, o gel foi lavado com água destilada 3x por 10 min cada, submetido à solução descorante [ácido acético 5% (v/v) e etanol 20% (v/v)] durante 1 h e preservados em solução de ácido acético 5% (v/v).

#### Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

A análise proteômica bidimensional foi realizada com três réplicas biológicas para os tratamentos não-inoculado (controle) e inoculado com *Lxx* (estresse). Um total de 150 µg de proteínas de cada amostra foi ressuspendido em tampão de reidratação [50mM Tris-HCl (pH 8,8), 7 M ureia, 2 M tioureia, CHAPS 2% (m/v), 38,9 mM DTT, IPG *buffer* 1% (v/v) (pH 3-10, NL; GE Life Sciences), azul de bromofenol 0,005% (m/v) e PMSF 1% (m/v)] e, em seguida, aplicado em fitas de gradiente de pH

imobilizado (IPG *strips* 11 cm, pH 3-10; GE Life Sciences) permanecendo na bandeja de reidratação (IPGbox; GE Life Sciences) por 16 h à temperatura ambiente. Posteriormente, as fitas foram submetidas à focalização isoelétrica (IEF) no sistema de eletroforese Ettan IPGphor III (GE Life Sciences) sob as seguintes condições: 500 V-500 V/h, 1000 V-800 V/h, 6000 V-7000 V/h, 6000 V-4200 V/h a 20°C.

Após a primeira dimensão, as fitas foram submetidas ao procedimento de redução e alquilação em solução de equilíbrio [50mM Tris-HCl (pH 6,8), 6 M ureia, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,005% (m/v)] contendo 1% de DTT (ditiotreitól) por 30 min e 2,5% de IAA (iodoacetamida) por mais 30 min, respectivamente. Para segunda dimensão, cada fita equilibrada foi disposta no topo de um gel SDS-PAGE 12,5% [1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), acrilamida 30%, SDS 10%, APS 10% e TEMED em água ultrapura] com o acréscimo de uma solução de agarose selante (Tris 250 mM, glicina 192 mM, SDS 1%, agarose 0,5%, azul de bromofenol 0,002%). A eletroforese bidimensional foi executada no sistema Omniphor MV 20 (Biosystems) em duas etapas: pré-corrida a 15 mA.gel<sup>-1</sup> por 20 min, seguida de corrida a 30 mA.gel<sup>-1</sup> durante 2,5 h, a 300 V. Ao final, os géis tiveram seus *spots* submetidos a coloração, conforme descrito.

#### Aquisição e análise das imagens

Os géis uni e bidimensionais foram digitalizados através do *scanner* de transparência Image Scanner III (GE Life Sciences) empregando o programa Lab Scan 6.0 (GE Life Sciences), com resolução de 300 dpi e filtro vermelho, recomendado para géis corados com azul de Coomassie. As imagens dos géis foram analisadas por meio do programa ImageMaster 2D Platinum v.7.05 (GE Life Sciences) para detecção e seleção dos *spots*, obtendo informações fundamentais, tais como: número de *spots.gel*<sup>-1</sup>, ponto isoelétrico (pI), massa molecular (MW) e volume (% vol.). Após a análise comparativa entre as triplicatas dos tratamentos, os *spots* que apresentaram variação significativa na porcentagem de volume (% vol.), ou seja, com ANOVA  $\leq 0,05$  e *ratio*  $\geq 1,5$  entre os géis foram considerados como diferencialmente acumulados.

## Digestão tríptica

Os *spots* diferenciais selecionados foram excisados dos géis, manualmente, utilizando um bisturi estéril e submetidos à digestão *in gel*, segundo o protocolo descrito por Shevchenko *et al.* (2007). Os *spots* foram cortados em fragmentos de, aproximadamente, 1 mm<sup>3</sup> e incubados em solução de descoloração [25 mM bicarbonato de amônio (pH 8,0) e acetonitrila 50% (v/v)] sob agitação por 20 min em temperatura ambiente. Os pedaços de géis foram desidratados com acetonitrila 100% por 5 minutos em vórtex e, após a retirada do excesso de solvente, eles foram reidratados com bicarbonato de amônio 25 mM durante 10 min. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com 25 mM bicarbonato de amônio (pH 8,0) e acetonitrila 50% (v/v) por 5 min cada e o líquido excedente foi, então, removido.

Os fragmentos de géis foram saturados em solução de bicarbonato de amônio 25 mM contendo 10 ng/μL de tripsina (Promega) durante 15 min em banho de gelo e, posteriormente, cobertos com bicarbonato de amônio 25 mM permanecendo em digestão por 16 h a 37°C. Ao final deste período, os peptídeos foram extraídos do gel duas vezes utilizando o tampão de extração [5% de ácido trifluoroacético (TFA) e 50% de acetonitrila (v/v)], incubados por 15 min e o sobrenadante foi coletado em outro tubo. Os peptídeos recuperados foram concentrados por centrifugação a vácuo no *SpeedVac* (Eppendorf) e armazenados a -20°C até a realização das análises via espectrometria de massas (MS).

## Espectrometria de massas (MS)

Os peptídeos foram ressuspensos em água ultrapura, co-cristalizados com a matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico [10 mg/mL de CHCA em acetonitrila 50% (v/v) e TFA 0,3% (v/v)] e aplicados, em duplicata, sobre uma placa de MALDI. Os espectros de massa (MS) foram adquiridos por meio do espectrômetro Auto Flex III MALDI-ToF-ToF (Bruker Daltonics), fornecido pelo Centro de Análises Bioquímicas e Proteômicas da Universidade Católica de Brasília (UCB). As análises foram realizadas pelo método de PMF (*peptide mass fingerprinting*), no modo refletor positivo (RP\_Proteomics), considerando somente íons com *m/z* acima de 700 Da. Em seguida, os dados foram processados no programa FlexAnalysis v.3.4 (Bruker Daltonics) para obtenção dos arquivos *peaklist.xml*.

## Identificação e categorização das DAPs

As proteínas foram identificadas através do programa Mascot *Matrix Science* (<http://www.matrixscience.com/>) contra o banco de sequências de proteínas do SwissProt para o táxon Viridiplantae e contra o banco de sequências de proteínas de espécies de Poales (*Saccharum* spp., *Sorghum* spp., *Triticum* spp. e *Zea mays*) disponibilizado em colaboração com o Centro de Pesquisas em Proteômica da Universidade de Washington (UWPR, Seattle, EUA). As buscas foram delimitadas pelos seguintes parâmetros: carbamidometilação da cisteína e oxidação da metionina (modificações fixa e variável), perda de um sítio de clivagem e tolerância máxima de 1,2 Da. Somente as identificações com *score* acima do valor limite (*cut-off*) foram aceitas por mostrarem-se significativas ( $p < 0,05$ ). Os acessos das proteínas identificadas foram submetidos ao banco de dados do Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) para recuperação das sequências em formato FASTA por meio da ferramenta *Retrieve ID*. Posteriormente, as DAPs foram funcionalmente anotadas por meio do *software* Blast2GO v. 6.0 (GÖTZ *et al.*, 2008; <https://www.blast2go.com>). A distribuição dos termos de ontologia gênica (GO), ou seja, das categorias funcionais do conjunto de DAPs para o colmo não-inoculado (C) e inoculado com *Lxx* (E) foi utilizada na comparação entre os tratamentos.

## Resultados

### Confirmação da inoculação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*)

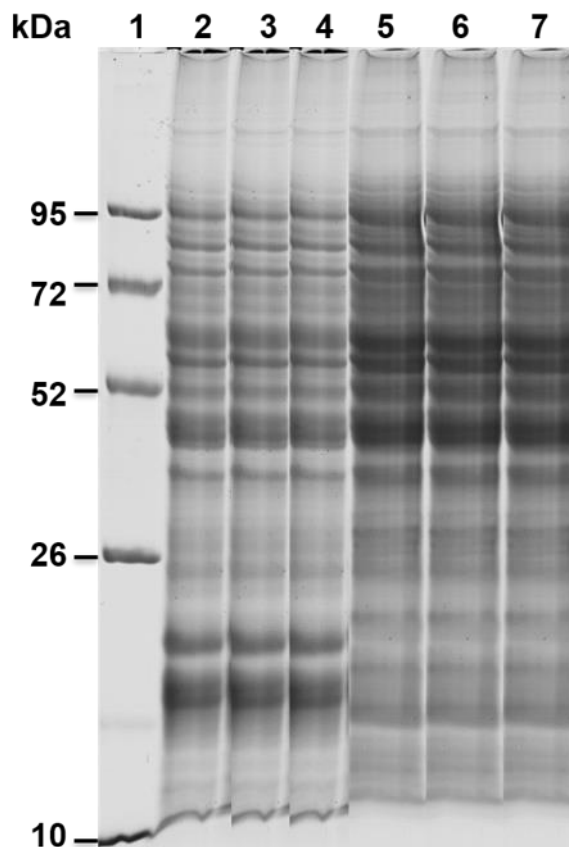
As amostras da cana-de-açúcar (RB867515) inoculada ou não com *Lxx* na concentração de  $10^9$  células.mL<sup>-1</sup> foram coletadas aos 120 dias do transplântio. A quantificação relativa da presença da bactéria nas folhas por PCR em tempo real (qPCR), utilizando *primers* específicos para *Lxx*, demonstraram diferenças significativas no título bacteriano. Os valores de quantificação foram 17 vezes superiores nas plantas inoculadas (estresse) comparados àqueles observados nas plantas não-inoculadas (controle). Dessa maneira, os dados confirmaram a inoculação das plantas com *Lxx*, apresentando um aumento de 17x na carga bacteriana.



## Quantificação e integridade proteica

As concentrações das proteínas caulinares totais de cana-de-açúcar não-inoculada (controle) e inoculada (estresse) com *Lxx* foram, respectivamente,  $4,23 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  e  $1,94 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$  indicando a eficiência do método fenólico. A análise do gel unidimensional (SDS-PAGE) demonstrou um padrão de bandas diferencial entre os tratamentos. Além disso, foi observado que o protocolo de extração utilizado permitiu a recuperação e solubilização proteica numa ampla faixa de massa molecular revelando bandas definidas e íntegras com baixos níveis de compostos interferentes (Figura 2). Portanto, os resultados da dosagem e integridade dos extratos proteicos foram satisfatórios permitindo a realização da eletroforese bidimensional (2D-PAGE).

Figura 2 - Perfil proteico do colmo da cana-de-açúcar (RB867515) não-inoculado e inoculado com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) visualizado em gel SDS-PAGE 12,5%. 1. Marcador molecular (MW) medido em kDa; 2-4. Controle (não-inoculado); 5-7. Estresse (não-inoculado).

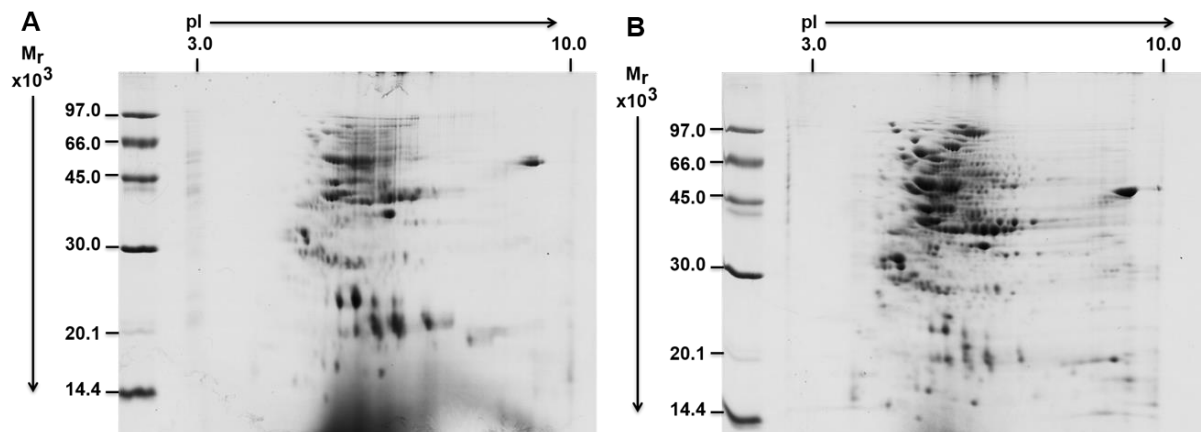


## Análise proteômica bidimensional

A fim de investigar os mecanismos moleculares da cana-de-açúcar envolvidos na resposta à *Lxx*, os perfis proteicos dos colmos não-inoculados e inoculados com

a bactéria foram obtidos por eletroforese bidimensional (Figura 3). A análise das imagens dos géis 2D-PAGE demonstrou semelhanças significativas entre as três réplicas biológicas pertencentes a cada tratamento. Assim, a média dos coeficientes de correlação foi de 0,74 e 0,92 para os colmos não-inoculado e inoculado com *Lxx*, respectivamente, sustentando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. Os *spots* adquiridos foram bem distribuídos ao longo do padrão de massa molecular (MW) selecionado com maior preferência pela faixa de pI entre 5-7. Os mapas comparativos 2-DE revelaram um total de 1.779 *spots* exibindo uma média de 193 e 400 *spots.gel*<sup>-1</sup> para o tratamento controle e estresse, respectivamente, entre os quais 629 apresentaram *matches*. Portanto, a condição estresse revelou uma média superior de *spots.gel*<sup>-1</sup> quando comparada ao controle comprovando a alteração no proteoma do colmo da cana-de-açúcar provocada pela bactéria.

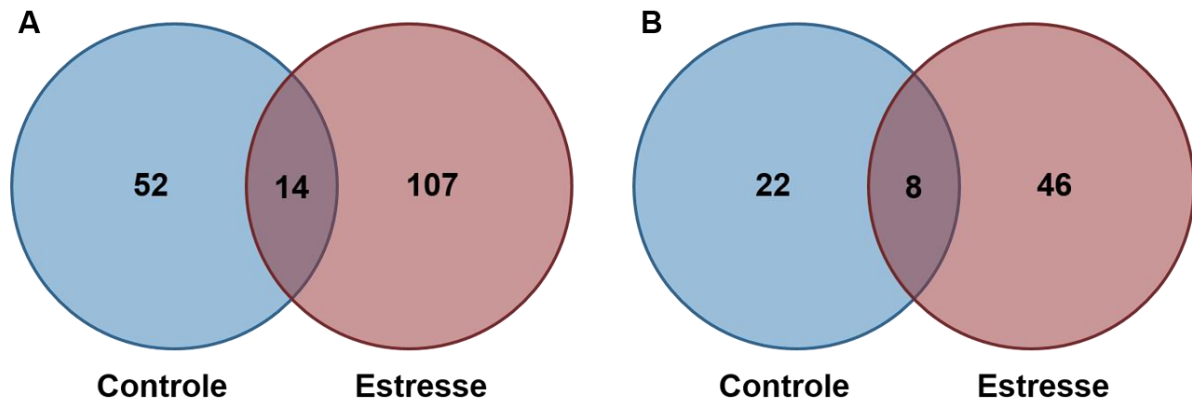
Figura 3 - Mapas comparativos em 2-DE de colmo da cana-de-açúcar (RB867515) não-inoculado (A) e inoculado com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (B). O marcador molecular é medido em kDa e o ponto isoelétrico (pI) varia entre 3 e 10.



Após análise estatística baseada na porcentagem de volume dos *spots* entre os géis comparados, 173 proteínas foram consideradas diferencialmente acumuladas (DAPs) por apresentarem variação significativa (ANOVA  $\leq 0,05$  e *ratio*  $\geq 1,5$ ). Deste quantitativo, 14 DAPs foram observadas tanto no colmo não-inoculado quanto no colmo inoculado com *Lxx* e 159 em apenas uma das condições (Figura 4A). Entre as DAPs comuns, 13 exibiram maior acúmulo no controle, enquanto somente uma foi mais acumulada no estresse. Com relação às DAPs exclusivas, 52 foram detectadas apenas no controle e 107 no estresse revelando um número superior de DAPs no tratamento inoculado com *Lxx* em comparação ao tratamento não-inoculado (Figura 4A).

Do total de 173 DAPs submetidas à espectrometria de massas (MS), 76 foram presumivelmente identificadas, as quais 8 foram encontradas em ambos os tratamentos e 68 foram exclusivas a um dos tratamentos (Figura 4B). Das DAPs comuns, 7 foram inibidas, enquanto apenas 1 foi induzida na cana-de-açúcar em interação com *Lxx*. Entre as 68 DAPs exclusivas, 22 foram verificadas no colmo não-inoculado e 46 no colmo inoculado com a bactéria (Figura 4B). Desse modo, somente 44% das DAPs analisadas via MS foram passíveis de identificação. Esses resultados serão complementados por meio da análise proteômica via nUPLC-MS/MS em andamento (dados não apresentados).

Figura 4 - Diagramas de Venn exibindo a distribuição das DAPs de colmo de cana-de-açúcar (RB867515) nos tratamentos não-inoculado (controle) e inoculado com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (estresse) submetidas à espectrometria de massas (A) e, posteriormente, identificadas pelo programa Mascot (B).



A identificação presumível das proteínas selecionadas como diferencialmente acumuladas (DAPs) é detalhada na Tabela 1, adquirida após a análise dos arquivos dos arquivos *peaklist.xml* pelo método de PMF no *software* Mascot e somente as associações estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) foram aceitas. Na Tabela 1 também são apresentados os valores de ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MW) teóricos e experimentais. Além disso, a distribuição das identificações obtidas evidenciou uma quantidade maior de DAPs nas plantas infectadas por *Lxx* em relação ao controle.

Tabela 1 - Identificação presumível das DAPs de colmo da cana-de-açúcar (RB867515), de acordo com a maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) alcançada por meio do programa Mascot. *Ratio* é referente à razão de variação entre as porcentagens de volume dos *spots* nos tratamentos não-inoculado (controle) e inoculado com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (estresse). ANOVA relaciona-se ao valor p calculado para significância estatística da diferença na porcentagem de volume do spot entre os tratamentos, em que é significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são exibidos o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MW, em Da) calculados do acesso similar e observados nos géis 2D-PAGE.

<b>Spot ID</b>	<b>Ratio</b>	<b>ANOVA</b>	<b>Acesso</b>	<b>Proteína</b>	<b>Score</b>	<b>Organismo</b>	<b>pI</b>		<b>MW (Da)</b>	
							<b>Cálc./Obs.</b>		<b>Cálc./Obs.</b>	
<b>Controle</b>	<b>C/E</b>									
3	2,464	0,0301146	Q7XMJ2	Proteína tipo cinesina KIN-10B	50	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	8,50	6,73	79.941	19.066
				Proteína associada à RNA						
17	2,477	0,0086423	A0A0A9P914	polimerase II homóloga à RPAP2	71	<i>Arundo donax</i>	5,24	5,96	79.983	19.304
18	1,674	0,0270178	Q9G1H4	Maturase K	62	<i>Rorippa amphibia</i>	9,62	6,29	60.638	19.594
21	3,862	0,0014126	A0A059Q045	2,4-dienoil-CoA redutase, peroxissomal	54	<i>Saccharum</i> spp.	10,38	6,65	7.497	22.026
22	2,768	0,0017865	A0A3B6A289	Proteína com domínio sHSPs	69	<i>Triticum aestivum</i>	8,73	6,26	24.287	22.343
23	1,992	0,0366743	A0A059Q1L8	Proteína 14-3-3	51	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	4,76	5,67	29.729	22.523
24	3,010	0,0017099	A0A059PZG5	Proteína não-caracterizada	58	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	5,97	5,93	27.981	22.511
511	Excl.	0,0012529	A0A1D6JGX2	Proteína MAP3K epsilon 1	65	<i>Zea mays</i>	4,85	6,79	26.837	34.657
				Proteína associada à RNA						
513	Excl.	0,0029216	A0A0A9P914	polimerase II homóloga à RPAP2	71	<i>Arundo donax</i>	5,24	6,35	79.983	43.486
521	Excl.	0,0269465	A0A059Q2L9	Proteína com domínio NB-ARC	51	<i>Saccharum</i> spp.	8,15	5,65	100.465	75.069

523	Excl.	0,0305077	Q9GF61	Maturase K	61	cultivar R570 <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>petraea</i>	9,58	5,78	60.816	75.249
524	Excl.	0,0085497	A0A059Q2U2	Proteína não-caracterizada	49	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	8,48	5,87	13.792	74.740
542	Excl.	0,0114006	A0A059Q017	Provável proteína ligante de zinco	50	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	7,60	6,02	16.519	44.889
545	Excl.	0,0266872	A0A1D6LSG1	Argonauta 10b	67	<i>Zea mays</i>	9,34	6,33	108.432	49.996
546	Excl.	0,0005657	A0A446RLV9	Proteína não-caracterizada	68	<i>Triticum</i> spp.	6,91	6,48	70.952	54.023
550	Excl.	0,0227131	A0A059Q2L9	Proteína com domínio NB-ARC	50	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	8,15	6,02	100.465	55.576
551	Excl.	0,0046458	A0A1B6Q1X0	Proteína não-caracterizada	59	<i>Sorghum bicolor</i>	6,11	5,94	16.793	54.467
566	Excl.	0,0148053	A0A059Q2L9	Proteína com domínio NB-ARC	53	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	8,15	6,84	100.465	41.164
568	Excl.	0,0405155	A0A446K7V1	Histona H2B	65	<i>Triticum aestivum</i>	8,15	5,65	10.899	41.732
569	Excl.	0,0169952	A0A1D6ICI8	Proteína TPX2	62	<i>Zea mays</i>	9,96	5,45	68.722	33.000
573	Excl.	0,0007846	B8AR30	Fator de transcrição GATA 19	50	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>indica</i>	6,14	5,82	29.479	41.688
578	Excl.	0,0470604	A0A1D6ICI8	Proteína TPX2	66	<i>Zea mays</i>	9,96	5,59	68.722	69.983
581	Excl.	0,0043860	A0A059Q2L9	Proteína com domínio NB-ARC	50	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	8,15	5,80	100.465	69.401
583	Excl.	0,0142520	K4AFX0	Proteína específica de pólen C13	73	<i>Setaria italica</i>	6,81	5,95	18.434	69.137
584	Excl.	0,0003802	A0A059Q2L9	Proteína com domínio NB-ARC	50	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	8,15	6,05	100.465	68.911

586	Excl.	0,0134029	A0A7H4LC44	Proteína não-caracterizada Provável proteína At1g69350	65	<i>Triticum aestivum</i>	8,50	6,08	19.178	74.647
591	Excl.	0,0037746	Q9C507	com repetição de pentatricopeptídeo	57	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,97	7,17	88.631	34.536
592	Excl.	0,0151378	C5YZS7	Proteína não-caracterizada	59	<i>Sorghum bicolor</i>	9,62	7,18	19.019	20.642
607	Excl.	0,0419717	Q8RXR6	Proteína At1g50280 com domínio de BTB/POZ	62	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,96	6,78	60.794	54.905
<b>Estresse</b>	<b>E/C</b>									
61	2,122	0,0011688	Q9S9M2	Proteína quinase semelhante à WAK 4	55	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,66	4,94	86.269	38.095
95	Excl.	0,0154196	Q6K7G9	Endoglucanase 8	57	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	8,02	5,47	54.962	13.802
96	Excl.	0,0004982	A0A059Q017	Provável proteína ligante de zinco	50	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	7,60	6,49	16.519	7.490
116	Excl.	0,0000027	A0A1D6LSG1	Argonauta 10b	64	<i>Zea mays</i>	9,34	5,54	108.432	13.774
118	Excl.	0,0146066	A0A3B6C284	Proteína com domínio de repetição WD	68	<i>Triticum aestivum</i>	6,43	5,99	48.227	27.752
151	Excl.	0,0109989	A0A059Q017	Provável proteína ligante de zinco	50	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	7,60	7,21	16.519	38.247
168	Excl.	0,0077819	A0A059PZU7	Proteína semelhante à SGT1	50	<i>Saccharum</i> spp.	4,69	5,95	56.857	41.281
172	Excl.	0,0040521	A0A059Q2L9	Proteína com domínio NB-ARC	51	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	8,15	6,47	100.465	41.240
179	Excl.	0,0002210	A0A059PZU7	Proteína semelhante à SGT1	50	<i>Saccharum</i> spp.	4,69	6,47	56.857	42.422
213	Excl.	0,0237091	A0A1B6PI43	Proteína não-caracterizada	59	<i>Sorghum bicolor</i>	10,18	5,47	7.904	48.726
218	Excl.	0,0100199	C5XKD9	Provável proteína com repetição	59	<i>Sorghum bicolor</i>	6,15	6,86	82.051	51.494

de pentatricopeptídeo										
224	Excl.	0,0001157	A0A059Q2L9	Proteína com domínio NB-ARC	48	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	8,15	7,26	100.465	51.541
241	Excl.	0,0162225	A0A1D6ICI8	Proteína TPX2	68	<i>Zea mays</i>	9,96	5,89	68.722	57.849
244	Excl.	0,0035376	A0A3B6C7C1	Proteína do tipo DUF4149	66	<i>Triticum aestivum</i>	8,78	7,08	61.475	57.746
246	Excl.	0,0349864	Q7EYV7	Poli-(ADP-ribose) polimerase-1	53	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	8,85	5,65	111.340	58.961
248	Excl.	0,0031975	Q9M9W8	Fosfolipase D zeta 2	57	<i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	6,19	5,58	119.933	59.740
265	Excl.	0,0169942	B8AR30	Fator de transcrição GATA 19	52	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>indica</i>	6,14	6,04	29.479	63.303
267	Excl.	0,0086462	C5X386	Fator de <i>splicing</i> SCL25B rico em serina/arginina	64	<i>Sorghum bicolor</i>	10,48	5,97	24.591	62.989
272	Excl.	0,0000028	A0A059Q2L9	Proteína com domínio NB-ARC	51	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	8,15	6,66	100.465	64.549
282	Excl.	0,0012192	Q7EYV7	Poli-(ADP-ribose) polimerase-1	51	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	8,85	5,91	111.340	67.430
283	Excl.	0,0027728	A0A109NDQ3	Proteína homóloga a TPD1 1A	59	<i>Sorghum bicolor</i>	12,48	5,84	37.388	67.215
300	Excl.	0,0022428	Q9C507	Provável proteína At1g69350 com repetição de pentatricopeptídeo	58	<i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	5,97	5,93	88.631	74.940
303	Excl.	0,0016822	A0A059Q2L9	Proteína com domínio NB-ARC	50	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	8,15	5,87	100.465	76.168
315	Excl.	0,0010174	A0A059Q2L9	Proteína com domínio NB-ARC	51	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	8,15	6,08	100.465	78.792
322	Excl.	0,0000189	Q7EYV7	Poli-(ADP-ribose) polimerase-1	51	<i>Oryza sativa</i>	8,85	6,33	111.340	85.748

324	Excl.	0,0002987	A0A059PZL9	Proteína da família v-SNARE	49	subsp. <i>japonica</i> <i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	9,27	6,26	24.910	43.072
338	Excl.	0,0025002	B8AR30	Fator de transcrição GATA 19	50	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>indica</i>	6,14	6,65	29.479	95.179
340	Excl.	0,0026145	Q39442	V-ATPase subunidade A	65	<i>Beta vulgaris</i>	5,10	6,35	6.879	93.827
344	Excl.	0,0000578	A0A059Q2L9	Proteína com domínio NB-ARC	49	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	8,15	6,42	100.465	93.566
365	Excl.	0,0000095	A0A3B6TJ41	Proteína do tipo F-box	68	<i>Triticum aestivum</i>	9,35	6,12	54.640	96.255
386	Excl.	0,0000869	A0A1B6PLU8	Proteína não-caracterizada	61	<i>Sorghum bicolor</i>	11,89	6,29	30.151	94.060
387	Excl.	0,0003139	A0A077S1Z1	Proteína com domínio tipo NT-C2	65	<i>Triticum aestivum</i>	4,94	6,29	113.227	102.007
404	Excl.	0,0011568	B8AR30	Fator de transcrição GATA 19	53	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>indica</i>	6,14	5,66	29.479	67.888
406	Excl.	0,0008132	A0A077S1Z1	Proteína com domínio tipo NT-C2	66	<i>Triticum aestivum</i>	4,94	5,72	113.227	67.207
413	Excl.	0,0001178	A0A1D6ICI8	Proteína TPX2	62	<i>Zea mays</i>	9,96	6,35	68.722	75.084
421	Excl.	0,0038478	Q1ENB6	Proteína bifuncional ligada à biossíntese de folato	55	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,80	5,67	54.418	63.479
429	Excl.	0,0001021	Q7FAH2	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 2	54	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	6,34	5,73	36.921	58.138
431	Excl.	0,0142402	Q9C507	Provável proteína At1g69350 com repetição de pentatricopeptídeo	55	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,97	5,89	88.631	60.064
439	Excl.	0,0395714	C5YU68	Proteína não-caracterizada	59	<i>Sorghum bicolor</i>	7,66	5,61	58.869	52.011
440	Excl.	0,0283741	A0A1B6PID4	Proteína cinesina com domínio	64	<i>Sorghum bicolor</i>	5,31	5,69	117.341	51.541



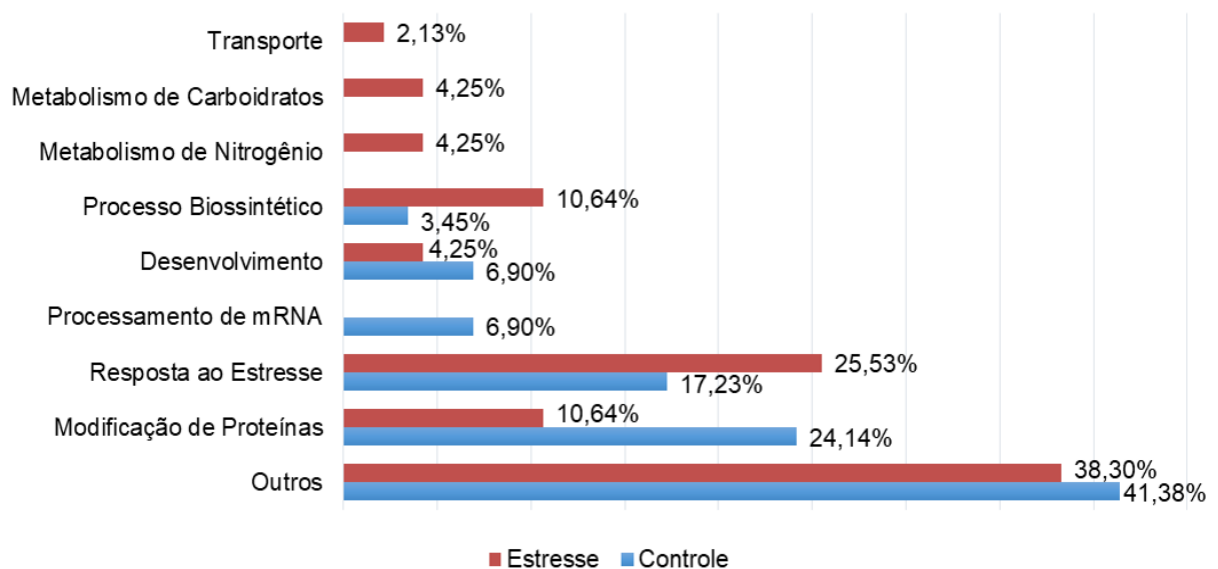
motor										
441	Excl.	0,0487091	A2XMN2	Provável glutaciona S-transferase 1	50	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>indica</i>	5,91	5,77	26.044	52.484
443	Excl.	0,0007946	A0A1D6ICI8	Proteína TPX2	66	<i>Zea mays</i>	9,96	6,14	68.722	50.638
444	Excl.	0,0350053	B8AR30	Fator de transcrição GATA 19	50	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>indica</i>	6,14	6,21	29.479	53.136
450	Excl.	0,0001122	A0A3B6TJ41	Proteína do tipo F-box	67	<i>Triticum aestivum</i>	9,35	5,36	54.640	49.572
461	Excl.	0,0005030	A0A1D6ICI8	Proteína TPX2	66	<i>Zea mays</i>	9,96	6,24	68.722	46.104
464	Excl.	0,0015743	A0A1D6GAN7	RNA helicase ATP-dependente tipo DExH-box	63	<i>Zea mays</i>	9,87	5,61	31.194	38.471
465	Excl.	0,04926	A0A059Q2L9	Proteína com domínio NB-ARC	50	<i>Saccharum</i> spp. cultivar R570	8,15	6,07	100.465	38.095

---

## Ontologia gênica (GO)

As DAPs foram anotadas e classificadas por processo biológico (BP) e componente celular (CC). Após a análise de ontologia gênica (GO) por meio do programa Blast2GO, 18 das 29 (62%) proteínas mais acumuladas nos colmos não-inoculados e 30 das 47 (64%) DAPs dos colmos inoculado com *Lxx* apresentaram associações significativas. A distribuição e frequência obtidas de termos de GO para processos biológicos referentes às proteínas anotadas previamente são exibidas na Figura 5. As proteínas foram agrupadas, de acordo com sua GO, em 55 e 84 categorias para as condições controle e estresse, respectivamente. Destas, as mais relevantes foram: modificação de proteínas, resposta ao estresse, processamento de RNA, desenvolvimento, processo biossintético, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de carboidratos, transporte e outros. Além disso, foi verificado um aumento na frequência de ontologias associadas à inoculação com *Lxx* referentes à resposta ao estresse, biossíntese, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de carboidratos e transporte indicando potencialmente os processos biológicos mais responsivos à presença da bactéria.

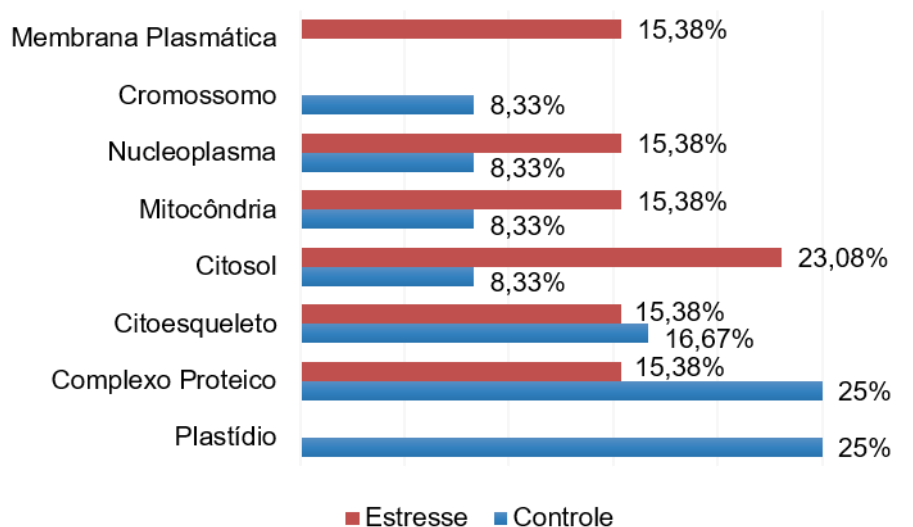
Figura 5 - Ontologia gênica (GO) por processo biológico (BP) das proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) em colmo de cana-de-açúcar nos tratamentos não-inoculado (controle) e inoculado com *Lxx* (estresse).



Quanto ao componente celular (CC), as proteínas foram classificadas nas categorias de plastídio, complexo proteico, citoesqueleto, citosol, mitocôndria, nucleoplasma, cromossomo e membrana plasmática sendo que nesta última,

somente DAPs da condição estresse estavam presentes (Figura 6). Por outro lado, nenhuma proteína mais acumulada no estresse foi englobada nos plastídios. Além disso, um aumento expressivo ligado à inoculação por *Lxx* foi constatado para as categorias de citosol, mitocôndria e nucleoplasma destacando os componentes celulares mais relevantes para esse patossistema.

Figura 6 - Ontologia gênica (GO) por componente celular (CC) das DAPs em colmo de cana-de-açúcar nos tratamentos não-inoculado (controle) e inoculado com *Lxx* (estresse).



## Discussão

### Modificação de proteínas

A proteína-alvo para *Xklp2* (TPX2) desempenha um papel fundamental durante o ciclo celular e associa-se aos microtúbulos para formação do fuso sendo, portanto, fosforilada por auroras-quinases durante a mitose (EVRARD *et al.*, 2009; TOMAŁTÍKOVÁ *et al.*, 2015). Além do ciclo celular, a TPX2 atua em outros processos, tais como: regulação do alongamento das células do hipocótilo, desenvolvimento vascular e tolerância aos estresses abióticos (SMERTENKO *et al.*, 2021). A proteína TPX2 foi identificada 2x nos colmos não-inoculados (*spots* 569, 578) e 4x nos colmos inoculados com *Lxx* (241, 413, 443, 461). A partir da análise das massas moleculares (MW), é possível inferir que essa proteína, provavelmente, está presente no tratamento controle em duas versões diferentes: uma monomérica (*spot* 569) e outra dimérica (*spot* 578), enquanto os pontos isoelétricos (pI) observados se mantêm muito próximos. No tratamento inoculado com *Lxx*, a TPX2 parece ter sofrido modificações pós-traducionais (PTMs), especialmente fosforilação,

apresentando variações na MW e pl. No estudo do transcriptoma foliar de cana-de-açúcar (SP80-3280) inoculadas com *Lxx*, foi observada a baixa expressão de duas auroras quinases, as quais interagem diretamente com a TPX2 (CIA *et al.*, 2018). Entretanto, a superexpressão de TPX2 em células de *Arabidopsis thaliana* demonstrou que a formação das matrizes de microtúbulos mediada por TPX2 pode ocorrer, independentemente, da ligação à aurora-quinase (PETROVSKÁ *et al.*, 2013).

A proteína MAP3K épsilon 1 (*spot* 511), exclusiva das plantas controle, está envolvida no crescimento, desenvolvimento e regulação da sinalização desencadeada por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (MITHOE *et al.*, 2016). Esses dados diferem da análise proteômica foliar das cultivares de cana-de-açúcar LCP 85-384 (tolerante) e ROC20 (sensível), a qual apresentou maior acúmulo de outra proteína serina-treonina quinase nas plantas infectadas por *Xanthomonas albilineans* (MENG *et al.*, 2020). Apesar disso, o baixo acúmulo de MAP3Kε1 nos colmos inoculados com *Lxx* pode indicar um aumento da atividade de várias proteínas fosfatases, visto que elas estão envolvidas na regulação negativa da ativação de MAPKs (XU; ZHANG, 2015). Possivelmente, as alterações no ciclo celular provocadas por *Lxx* promovem o desenvolvimento anormal das plantas sendo o raquitismo um dos sintomas mais característicos do RSD.

Outra proteína verificada apenas no controle foi a At1g50280 com domínio de BTB/POZ (*spot* 607), a qual atua como um adaptador substrato específico para formar o complexo E3 ubiquitina-ligase (CUL3-RBX1-BTB) intervindo na ubiquitinação e degradação proteossomal de proteínas-alvo (BAN; ESTELLE, 2021). Alguns estudos em *Arabidopsis thaliana* demonstram que essa proteína regula negativamente a sinalização por ácido abscísico (ABA) e quando mutada provoca alterações na germinação de sementes, crescimento e comportamento estomático (KIM *et al.*, 2016; WOO *et al.*, 2018). A análise dos fitormônios em colmos da cana-de-açúcar infectadas por *Lxx* revelou um aumento nos níveis de ABA demonstrando que os estresses abióticos, principalmente a seca, podem influenciar no agravamento dos sintomas do RSD (ZHANG *et al.*, 2016a).

A proteína quinase semelhante à WAK 4 (*spot* 61), um mediador fundamental da resistência inata das plantas contra os microrganismos, foi 2x mais acumulada nos colmos inoculados com *Lxx*. Esse achado corrobora com um estudo em *Citrus* spp., no qual foi observada uma superexpressão de genes WAKLs (CsWAKL01,

CsWAKL08 e CsWAKL20) em resposta à infecção pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) (LI *et al.*, 2020). Esses resultados indicam um papel central dos WAKLs na defesa contra o patógeno através da regulação dos níveis de EROs e da ativação de proteínas relacionadas à patogênese (PRs) via sinalização dependente de ácido jasmônico (JA) (LI *et al.*, 2020). A cana-de-açúcar inoculada com *Lxx* demonstrou um aumento na produção de EROs e expressão de genes relacionados ao JA, sugerindo que esses processos aliados as WAKLs, possivelmente, desempenham funções primordiais nesse patossistema (ZHANG *et al.* 2016b; ZHU *et al.*, 2021).

#### Resposta ao estresse

A proteína com domínio NB-ARC foi identificada 5x no controle (*spots* 521, 550, 566, 584, 581) e 7x no estresse (*spots* 172, 224, 272, 303, 315, 344, 465) e, portanto, exibiu acúmulo diferencial em ambos os tratamentos sendo maior nos colmos com *Lxx*. O domínio NB-ARC é formado por subdomínios de ligação a nucleotídeos e ATPase que provocam mudanças conformacionais modulando sua atividade (YU *et al.*, 2018). Essas proteínas codificadas por genes R são capazes de detectar a presença de efetores produzidos pelos fitopatógenos e, em seguida, desencadeiam uma reação hipersensitiva (HR) caracterizada pela morte celular programada (PCD) localizada (STEELE; HUGHES; BANFIELD, 2019). Na análise proteômica da cana-de-açúcar resistente (Co 93009) e suscetível (CoC 671) à infecção por *Colletotrichum falcatum*, foi verificada a presença da proteína com domínio NB-ARC em ambas as variedades, entretanto, seu acúmulo foi muito maior na variedade resistente (KUMAR *et al.*, 2020). Outros estudos também revelaram que genes de resistência do tipo NBS-LRR foram induzidos em resposta à infecção por *Lxx* na cana-de-açúcar, sustentando nossos resultados (ZHU *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2021).

A proteína poli-(ADP-ribose) polimerase-1 (PARP1) foi verificada 3x, exclusivamente, na condição de estresse (*spots* 246, 282, 322). Ela está envolvida no reparo por excisão base (BER) catalisando a transferência de ADP-ribose às proteínas-alvo, a partir do NAD<sup>+</sup>, num processo conhecido como PARilação (GU *et al.*, 2019). Algumas evidências sugerem que os fatores bióticos podem levar ao acúmulo de danos ao DNA durante a infecção e, embora algumas lesões no DNA

possam, simplesmente, refletir na indução de morte celular programada (PCD), a ativação de uma cascata de sinalização denominada *DNA Damage Response* (DDR) parece ser fundamental no estímulo ao sistema imune das plantas (NISA *et al.*, 2019). Além disso, estudos envolvendo inibidores da PARP indicam um papel positivo dessa proteína em várias respostas de PTI, inclusive a deposição de calose induzida por flagelinas (FENG *et al.*, 2016). Diante disso, assim como demonstrado em *Arabidopsis thaliana*, o acúmulo de PARP1 na cana-de-açúcar inoculada com *Lxx* indica uma potencial regulação dos mecanismos de vigilância, reparo e tolerância aos danos no DNA em resposta ao estresse (GU *et al.*, 2019).

Outra proteína exclusiva desse tratamento foi a fosfolipase D zeta 2 (*spot* 248), a qual está relacionada ao desenvolvimento e defesa vegetal, produzindo ácido fosfatídico (PA) a partir da hidrólise de diversos fosfolipídios de membrana, tais como fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (LEE; PARK, 2019). O complexo PLD-PA apresenta uma atuação relevante no controle do metabolismo de lipídios, interação membrana-citoesqueleto e sinalização hormonal, incluindo ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA), etileno (ET), ácido abscísico (ABA) e brassinosteróides (BRs) (LI; WANG, 2019). Algumas evidências apontam que o ácido fosfatídico derivado da PLD $\zeta$  interage com a proteína fosfatase 2A (PP2A) e, dessa maneira, ativa o co-receptor de PRRs, o BAK1, regulando os níveis de BRs (LI; WANG, 2019). Além disso, um estudo sugere que a PLD $\zeta$ 2, especificamente, está envolvida na regulação do tráfego de vesículas e dos níveis de auxina (AUX) nas plantas (TAKÁČ; NOVÁK; IMAJ, 2019). A PLD $\zeta$ 2 também parece estar relacionada à produção de PA por meio de uma via de sinalização de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) citosólico durante estresse hipóxico (LINDBERG *et al.*, 2018). Na cana-de-açúcar inoculada com *Lxx* também foi identificada 2x uma fosfolipase D alfa 1 confirmando o importante papel desempenhado pelas PLDs nesse patossistema (dados não-publicados).

A proteína bifuncional ligada à biossíntese de folato (*spot* 421), também verificada somente no estresse, parece fazer parte da imunidade inata das plantas influenciando, diretamente, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GORELOVA *et al.*, 2017). Essa hipótese está em concordância com os poucos estudos sobre os mecanismos de defesa da cana-de-açúcar em interação com *Lxx*, nos quais apontam para importância da atividade de EROs (ZHANG *et al.* 2016b; ZHU *et al.*, 2019). O acúmulo de precursores de folato e o ácido fólico em

*Arabidopsis thaliana* induzem a resistência local e sistêmica dependente de SA contra *Pseudomonas syringae* (WITTEK *et al.*, 2015). Além disso, a análise dos padrões globais de expressão gênica no trigo em resposta ao fungo *Fusarium pseudograminearum* revelou diversos genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de folato (POWELL *et al.*, 2017).

#### Processamento de RNA

A enzima maturase K (MatK) foi identificada em ambos os tratamentos, entretanto, seu acúmulo foi maior nos colmos não-inoculados (*spot* 18). Outro acesso dessa proteína, provavelmente uma isoforma diferente, foi verificado exclusivamente no tratamento controle (*spot* 523). Diversos estudos apontam que a MatK desempenha um papel essencial no processamento do RNA cloroplastidial (BARTHET; PIERPONT; TAVERNIER, 2020; SCHMITZ-LINNEWEBER *et al.*, 2015). A MatK está associada à excisão dos íntrons do grupo IIA de um pré-mRNA, para produzir um mRNA maduro funcional atuando, portanto, nos processos de transcrição e pós-transcrição (BARTHET; PIERPONT; TAVERNIER, 2020).

Além disso, essa proteína funciona como uma chaperona em plantas e também envolvida na defesa vegetal (JIANG *et al.*, 2008). Na cana-de-açúcar infectada por *Colletotrichum falcatum*, três proteínas MatK apresentaram maior acúmulo na variedade resistente (KUMAR *et al.*, 2020). Já na variedade suscetível, uma das MatK foi menos acumulada após a inoculação do fungo, enquanto as outras duas não foram encontradas (KUMAR *et al.*, 2020). Por outro lado, um estudo transcriptômico do milho em resposta a *Setosphaeria turcica* exibiu uma diminuição na expressão de *matK* (SHI *et al.*, 2018). Assim, o baixo acúmulo da MatK nas plantas inoculadas com *Lxx* indica um possível impacto nos processos básicos, tais como transcrição e tradução, nos proplastídios do colmo da cana-de-açúcar durante a patogênese.

#### Desenvolvimento

A proteína 14-3-3 (*spot* 23), quase duas vezes mais acumulada no tratamento controle em relação ao estresse, é codificada por uma família multigênica. Ela está diretamente relacionada com as interações proteína-proteína participando de diversos processos biológicos, tais como transdução de sinais, ciclo celular, fixação

de nitrogênio, desenvolvimento e crescimento vegetal, maturação pós-colheita, bem como defesa vegetal (SANG *et al.*, 2021). Além disso, vários estudos têm sugerido que essa proteína desempenha um papel chave na regulação da biossíntese, sinalização e transporte hormonal (CAMONI *et al.*, 2018). Arelado aos fitormônios, a 14-3-3 também regula a atividade enzimática, localização subcelular e interações proteína-proteína frente ao ataque de fitopatógenos (LOZANO-DURÁN; ROBATZEK, 2015). Entretanto, algumas proteínas 14-3-3 são menos acumuladas em resposta ao estresse biótico como, por exemplo, a TFT1 de tomate a qual é reprimida em resposta ao fungo *Verticillium dahliae* (ROBB; LEE; NAZAR, 2007).

A investigação do proteoma da cana-de-açúcar sob efeito de poliaminas exógenas, por exemplo, demonstrou uma relação negativa entre os níveis da proteína 14-3-3 e a enzima ácido indol-3-acético amido sintetase (REIS *et al.*, 2016). Assim, o baixo acúmulo da proteína 14-3-3 nos colmos de cana-de-açúcar infectados pela bactéria *Lxx* indica que essa proteína, provavelmente, atua como um regulador negativo da IAA-amido sintetase, aumentando sua abundância frente ao patógeno. Essa hipótese é reforçada pelo estudo do transcriptoma da cana-de-açúcar em resposta à inoculação com *Lxx*, no qual foi verificado uma superexpressão de IAA-amido sintetase associada à redução dos níveis de auxina, prejudicando o crescimento e desenvolvimento vegetal (CIA *et al.*, 2018).

A proteína argonauta 10b foi identificada tanto nos colmos não-inoculados (*spot* 545) quanto nos colmos inoculados com *Lxx* (*spot* 116), indicando possíveis proteoformas com estruturas semelhantes, mas funcionalmente distintas. As argonautas (AGOs), associadas aos pequenos RNAs não-codificantes (sRNAs), formam o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Elas atuam na regulação da expressão gênica em diversos processos biológicos por meio de mecanismos epigenéticos, clivagem de mRNAs-alvo ou bloqueio da tradução (BETTI *et al.*, 2020). Nas plantas as AGOs estão envolvidas, principalmente, no reparo aos danos no DNA, desenvolvimento, assim como nas respostas aos estresses bióticos e abióticos (KUO *et al.*, 2021). A análise molecular das AGOs em pimentão (*Capsicum annuum* L.) demonstrou um padrão de expressão tecido-específico, com uma superexpressão de CaAGO10b nos caules quando em relação aos demais órgãos vegetais (QIN *et al.*, 2018).

O mesmo estudo revelou que CaAGO10b desempenha um importante papel na resposta à seca e salinidade, através da regulação de genes responsivos ao ABA



(QIN *et al.*, 2018). Resultados semelhantes foram encontrados em milho apresentando uma expressão diferencial de ZmAGO10b em resposta a vários fatores abióticos, tais como estresse térmico, seca, frio, salinidade, além do tratamento com ABA (ZHAI *et al.*, 2019). Além disso, foi observado um aumento dos níveis de CaAGO10b nas folhas de pimentão infectadas pelos vírus CMV (*Cucumber Mosaic Virus*), PVY (*Potato Virus Y*) e TMV (*Tobacco Mosaic Virus*) sugerindo também uma relação com os estresses bióticos (QIN *et al.*, 2018). A caracterização de AGOs em uma das espécies de cana-selvagem do complexo *Saccharum*, *S. spontaneum*, verificou um aumento nos níveis de transcritos desses genes, principalmente SsAGO10c, em plantas sob déficit hídrico (CUI *et al.*, 2020). As folhas de *S. spontaneum* inoculadas com *X. albilineans* também exibiram uma superexpressão de SsAGO10c sustentando as evidências de envolvimento da AGO10 na resposta aos fatores bióticos e abióticos (CUI *et al.*, 2020).

#### Processo biossintético

O fator de transcrição GATA 19 foi encontrado 1x no controle (*spot* 573) e 4x no estresse (*spots* 265, 338, 404, 444) atuando na regulação de vários processos biológicos, tais como metabolismo de nitrogênio, desenvolvimento vegetal, metabolismo secundário, sinalização hormonal e resposta ao estresse (AN *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2021). Um estudo demonstrou que os genes GATA de *Brachypodium distachyon* apresentam um padrão de expressão diferencial em resposta à infecção pelo fungo *Magnaporthe oryzae* e tratamento com fitormônios. Esses dados sugerem um envolvimento dos genes GATA na indução de resistência em plantas contra o ataque desse fitopatógeno (PENG *et al.*, 2021). Além disso, diversos fatores de transcrição (TFs), incluindo GATA, foram diferencialmente expressos (TFs) nas folhas de *Citrus sinensis* inoculadas pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (DAURELIO *et al.*, 2013). A análise do transcriptoma e proteoma da cana-de-açúcar infectada por *Lxx* também identificou diversos TFs relacionados, principalmente, ao desenvolvimento e defesa vegetal (CIA *et al.*, 2018).

## Metabolismo de nitrogênio

Prováveis proteínas com repetição de pentatricopeptídeo (PPRs) foram identificadas tanto no controle (*spot* 591), quanto no estresse (*spots* 218, 300 e 431). As PPRs estão, predominantemente, localizadas nas mitocôndrias e cloroplastos e são necessárias para o processamento pós-transcricional do RNA e desenvolvimento vegetal (CHEN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018). Além disso, as PPRs atuam frente a muitos estresses abióticos, tais como seca, frio, salinidade e estresse oxidativo, além dos reguladores ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA) e metil jasmonato (MeJA) (CHEN *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2016; XING *et al.*, 2018). Algumas evidências também apontam para o envolvimento dessas proteínas na resposta aos fatores bióticos. A caracterização da família gênica PPR em arroz submetido à infecção por diferentes fitopatógenos exibiu um perfil de expressão diferencial, principalmente, na interação com *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* indicando um aumento da resistência nas plantas contra o cretamento bacteriano foliar (*bacterial leaf blight* - BLB) (CHEN *et al.*, 2018).

A glutationa S-transferase 1, identificada apenas nos colmos inoculados com *Lxx* (*spot* 441), pertence a uma superfamília de enzimas multifuncionais. Ela participa diretamente da desintoxicação de metabólitos ou fitotoxinas através da conjugação com a forma reduzida da glutationa (GSH) durante o estresse oxidativo ou ataque de patógenos (LIU *et al.*, 2021). Além disso, as glutationa-S-transferases (GSTs) atuam na detoxicação de hidroperóxidos lipídicos acumulados durante as infecções por exibirem atividade de glutationa peroxidase (GULLNER *et al.*, 2018). Elas também estão envolvidas no transporte hormonal como, por exemplo, de auxina (AUX) e ácido salicílico (SA) (GULLNER *et al.*, 2018). Entretanto, algumas funções bioquímicas e fisiológicas atribuídas às GSTs são restritas a um determinado tipo de interação planta-patógeno, enquanto outras são encontradas em diversos tipos de interação, tais como, o controle da morte celular nas plantas e a regulação das GSTs por fitormônios e TFs (GULLNER *et al.*, 2018).

Na cana-de-açúcar, vários genes codificadores de GSTs foram induzidos após a inoculação de *Sporisorium scitamineum*, principalmente nos genótipos resistentes à infecção por esse fungo (MCNEIL *et al.*, 2018; PETERS *et al.*, 2017). O transcriptoma diferencial da cana-de-açúcar infectada pela bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* mostrou um enriquecimento dos processos biológicos

relacionados à biossíntese da glutatona atuando, possivelmente, na resposta à infecção por *Aaa* (SANTA-BRIGIDA *et al.*, 2016). A análise dos DEGs de duas cultivares de cana-de-açúcar, uma resistente e outra suscetível à infecção por *X. albilineans*, exibiu uma superexpressão de diversas GSTs em ambas as cultivares reforçando a importância dessas proteínas na defesa vegetal (NTAMBO *et al.*, 2019). Em outro estudo proteômico da interação cana-de-açúcar x *Lxx* também foram verificadas diversas GSTs, entretanto, a maioria dessas proteínas foi inibida na presença do fitopatógeno (dados não-publicados). Possivelmente, é necessário estabelecer um equilíbrio entre algumas GSTs com abundância aumentada e outras diminuída afim de controlar a infecção por *Lxx* sem causar danos extensos ao tecido vegetal. Essa hipótese corrobora com os resultados encontrados numa cultivar de *Brassica oleracea* resistente à infecção por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) (SANTOS *et al.*, 2019).

#### Metabolismo de carboidratos

O proteoma da interação planta-patógeno a partir do apoplasto tem revelado um acúmulo de proteínas envolvidas na degradação ou manutenção da parede celular em resposta aos estresses bióticos. As endoglucanases, por exemplo, são responsáveis pela hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas intramoleculares da cadeia de celulose (DELAUNOIS *et al.*, 2014). No presente trabalho, a proteína endoglucanase 8 (*spot* 95) foi verificada apenas nos colmos de cana-de-açúcar inoculados com *Lxx*. Esse resultado corrobora com a análise do transcriptoma da cana-de-açúcar infectada pela bactéria *A. avenae* subsp. *avenae*, a qual revelou um aumento na expressão de uma endoglucanase (SANTA-BRIGIDA *et al.*, 2016). A análise proteômica da cana-de-açúcar em interação com *Lxx* também evidenciou o acúmulo da endo- $\beta$ -1,3(4)-glucanase (dados não-publicados). Assim, vários estudos têm demonstrado que as endoglucanases são essenciais no estabelecimento de respostas de sinalização no hospedeiro frente ao patógeno, alterando as propriedades da parede celular e interferindo na transdução de sinais (DELAUNOIS *et al.*, 2014).

## Transporte

A proteína da família v-SNARE (*spot* 324), exclusiva dos colmos inoculados com *Lxx*, atua no endereçamento e catalisa a fusão de vesículas de transporte endocítico-exocítico por meio da formação de um complexo em tetra-hélice (ROSQUETE; DRAKAKAKI, 2018). Em resposta ao ataque de fitopatógenos, principalmente dos fungos, as plantas lançam mão de mecanismos de resistência à penetração. Assim, ocorre um acúmulo de ácido fosfatídico (PA) e, conseqüentemente, a co-localização com a fosfolipase D (PLD) associando-se ao complexo SNARE no local de entrada do microrganismo (XING *et al.*, 2021). Além disso, é sugerido que a invasão por bactérias fitopatogênicas provoca nas plantas uma exocitose imune conduzida pelo complexo SYP132-SNAP33-VAMP721 / 722 SNARE (KWON; LEE; YUN, 2020). Conforme descrito anteriormente, o presente estudo também verificou o acúmulo diferencial de uma proteína PLD na cana-de-açúcar em resposta à infecção com *Lxx* evidenciando o envolvimento desse processo.

## Ontologias não-determinadas

Uma proteína ligante de zinco contendo o domínio GRF foi encontrada 1x no controle (*spot* 542) e 2x no estresse (*spots* 96 e 151). As variações observadas nas massas moleculares (MW) e nos pontos isoelétricos (pI) dessa proteína indicam que na presença de *Lxx*, provavelmente, ocorrem modificações pós-traducionais (PTMs) e separação em duas subunidades, as quais foram identificadas no presente trabalho. Os GRFs (*Growth-Regulating Factors*), uma família de fatores de transcrição (TFs), interagem com o cofator transcricional GIFs (*GRF-Interacting Factors*) e miR396, nos quais constituem o complexo miR396–GRF/GIF (LIEBSCH; PALATNIK, 2020). Esses TFs atuam como importantes reguladores do crescimento e desenvolvimento vegetal influenciando as respostas aos estresses bióticos e abióticos (OMIDBAKHSHFARD *et al.*, 2015). Além disso, algumas evidências apontam que os GRFs desempenham um papel fundamental na sinalização de fitormônios, tais como ABA, JA e GA<sub>3</sub> (KHATUN *et al.*, 2017).

Alguns estudos em *Arabidopsis thaliana* e arroz (*Oryza sativa* L.) revelaram que os estresses bióticos promovem uma regulação negativa nos níveis de miR396

e, conseqüentemente, a indução de GRFs ativando a imunidade inata vegetal (CHANDRAN *et al.*, 2019; SOTO-SUÁREZ *et al.*, 2017). Por outro lado, o aumento dos níveis de miR396 provoca a repressão de GRFs tornando as plantas mais suscetíveis aos patógenos (CHANDRAN *et al.*, 2019; SOTO-SUÁREZ *et al.*, 2017). A análise do perfil de expressão gênica da cana-de-açúcar (SP80-3280) aos 60 DAI de *Lxx*, verificou múltiplos genes codificadores de TFs, inclusive GRFs, e demonstraram uma relação entre os processos de desenvolvimento e resposta ao estresse com os níveis de ABA e ET (CIA *et al.*, 2018).

Provável modelo biológico das respostas da cana-de-açúcar à infecção por *Lxx*

Diante dos resultados obtidos, um provável modelo biológico da cana-de-açúcar frente à inoculação com a bactéria fitopatogênica *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) é apresentado (Figura 7). A primeira linha de defesa das plantas contra a invasão das bactérias, também conhecida como PTI, é baseada no reconhecimento dos elicitores exógenos e endógenos produzidos pelo patógeno por meio de receptores localizados na membrana da célula vegetal como a proteína WAKL4 (*spot 61*) (DAVID; HARMON; CHEN, 2019). Muitas vezes, o receptor central e suas proteínas quinases formam um complexo conhecido como receptor primário, no qual associado a outros reguladores, medeia o processo de reconhecimento dos patógenos desencadeando uma cascata de sinalização (LI *et al.*, 2020). Surpreendentemente, a MAP3Kε1 (*spot 511*), uma proteína reguladora dessa sinalização, foi inibida na presença de *Lxx*.

Entretanto, a indução da PLDζ2 (*spot 248*) estimula a produção de ácido fosfatídico (PA) na qual é influenciada pelo aumento da concentração Ca<sup>2+</sup> citosólico. O acúmulo de PA favorece, então, a co-localização com a PLD se ligando ao complexo v-SNARE (*spot 324*) verificado na cana-de-açúcar em resposta à bactéria (XING *et al.*, 2021). Além disso, PA interage com a PP2A e resulta na ativação de BAK1, um co-receptor de PRRs. Esse co-receptor associado a outras proteínas mediadoras disparam uma explosão oxidativa como consequência do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) (LIU *et al.*, 2017).

A produção de EROs está diretamente relacionada com a abundância de uma proteína bifuncional ligada à biossíntese de folato (*spot 421*) atuando, assim, na manutenção do crescimento vegetal e na tolerância ao estresse. Porém, o

desequilíbrio nos níveis de EROs pode provocar a oxidação de diversos componentes celulares essenciais, tais como lipídeos, proteínas, DNA e alguns microRNAs (HUANG *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2016). A fim de controlar a infecção por *Lxx* e também evitar esses danos ao tecido, a cana-de-açúcar induz algumas enzimas antioxidantes, incluindo a GSTU1 (*spot* 441). O acúmulo de danos ao DNA em decorrência da interação com o patógeno durante a PTI pode provocar a morte celular programada (PCD), entretanto, a indução de proteínas envolvidas na resposta a esses danos, tais como a PARP1 (*spots* 246, 282, 322) e a AGO10b (*spots* 116, 545), parecem favorecer o sistema de defesa do hospedeiro.

A cascata de sinalização amplificada pelas proteínas quinases resultam numa diversidade de mecanismos de defesa, particularmente, a reprogramação transcricional por meio da atividade de fatores de transcrição (TFs). O acúmulo de uma proteína ligante de zinco contendo um domínio GRF (*spots* 96, 151, 542), por exemplo, é consequência da regulação negativa nos níveis de miR396 por *Lxx* na cana-de-açúcar. Outro TF induzido é GATA 19 (*spots* 265, 338, 404, 444, 573), um regulador da resposta imune vegetal, no qual co-ocorre com WRKY e NAC TFs (DEB; KUNDU, 2015).

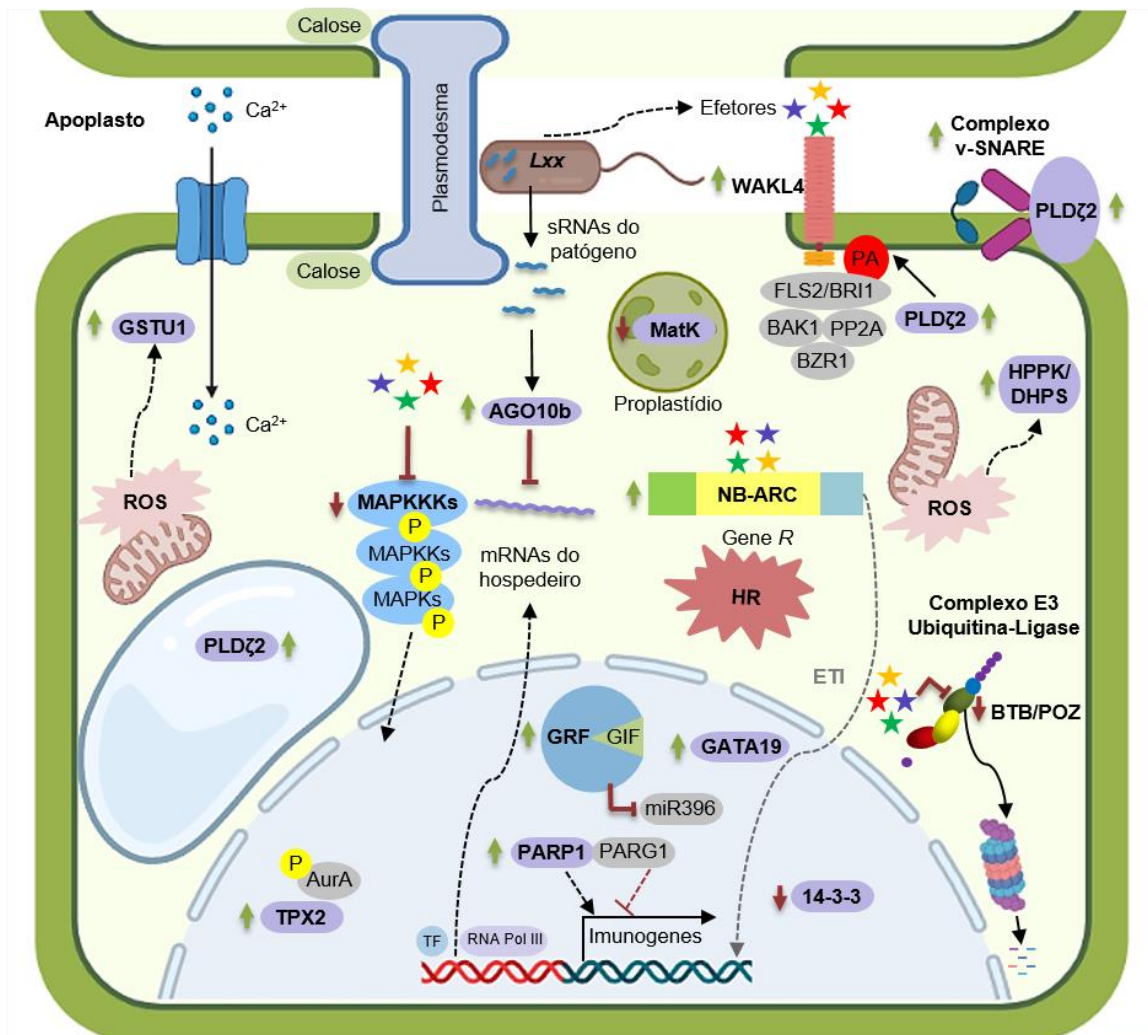
Algumas bactérias como, por exemplo *Lxx*, são capazes de vencer a PTI através da produção de proteínas efetoras específicas denominadas *Avr*, permanecendo no hospedeiro. Por sua vez, a planta possui uma segunda linha de defesa ou ETI que reconhece os efetores do fitopatógeno meio de proteínas de resistência NB-LRRs resultando numa resposta hipersensitiva (HR) (DAVID; HARMON; CHEN, 2019). Assim, foi constatado o acúmulo de uma proteína com domínio NB-ARC (*spots* 172, 224, 272, 303, 315, 344, 465, 521, 550, 566, 584, 581) em ambos os tratamentos, porém, com maior abundância nos colmos inoculados com *Lxx*.

O sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), responsável pela proteólise, desempenha um papel essencial na defesa contra os fitopatógenos. Porém, muitas bactérias fitopatogênicas apresentam efetores de virulência, tais como os T3SEs, capazes interagir com o UPS suprimindo as respostas imunes do hospedeiro e acarretando na restauração da virulência bacteriana (KHAN *et al.*, 2017). Conseqüentemente, o presente estudo demonstrou um baixo acúmulo de proteínas relacionadas à via de ubiquitinação em resposta a *Lxx* como, por exemplo, a

At1g50280 com domínio de BTB/POZ (*spot 607*) e uma 14-3-3 (*spot 23*), na qual é alvo comum dos efetores T3SE (SCHREIBER; CHAU-LY; LEWIS, 2021).

Finalmente, o acúmulo de TPX2 (spots 241, 413, 443, 461, 569, 578), fosforilada por Auroras-quinases durante a mitose revela que a presença de *Lxx* na cana-de-açúcar também parece interferir no ciclo celular modificando as vias de sinalização e desenvolvimento vegetal. As alterações no ciclo celular causadas pela bactéria também sofrem influência da inibição da MAP3Kε1 promovendo o desenvolvimento anormal das plantas sendo o raquitismo um dos sintomas mais característicos do RSD. O baixo acúmulo da MatK (*spot 18*) nos proplastídios revela que outros processos básicos, tais como transcrição e tradução, também são afetados pela bactéria.

Figura 7 - Esquema do provável modelo biológico do proteoma caulinar de cana-de-açúcar infectada por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*). As proteínas representadas com setas em vermelho e verde indicam aquelas com menor acúmulo e maior acúmulo, respectivamente. A figura também mostra a localização celular das DAPs segundo o banco de dados do UniProt. As informações detalhadas sobre as DAPs são apresentadas na Tabela 1.



Muito recentemente, foram obtidos os resultados da análise proteômica diferencial através de nUPLC-MS/MS (dados não apresentados), ainda em processamento e anotação presumível via MaxQuant (COX; MANN, 2008) e Perseus (TYANOVA *et al.*, 2016). Em geral, mesmo em maior escala, os dados corroboram os resultados já obtidos anteriormente via 2D-PAGE e enriquecem a proposta de modelo biológico apresentada.

## **Conclusão**

Este é o primeiro estudo proteômico caulinar da cana-de-açúcar em resposta à infecção pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*). Esses achados fornecem informações relevantes para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares desencadeados no hospedeiro durante a infecção por *Lxx*. Proteínas associadas às vias metabólicas de modificação de proteínas, resposta ao estresse, processo biológico, processamento de RNA, processo biossintético, desenvolvimento, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de carboidratos e transporte foram moduladas em ambos os tratamentos. Os colmos inoculados com *Lxx* apresentaram uma abundância aumentada de uma proteína com domínio NB-ARC relacionada ao reconhecimento de efetores da bactéria provocando uma resposta hipersensitiva (HR) na planta. A ativação do sistema de defesa resulta no acúmulo de danos no DNA do hospedeiro, no entanto, algumas proteínas responsivas a esses danos, tais como a PARP1 e a AGO10b são induzidas. Em contrapartida, o ciclo celular vegetal parece ser alterado, possivelmente, em decorrência da infecção por *Lxx* exibindo um aumento dos níveis da TPX2 e redução da MAP3K $\epsilon$ 1 na cana-de-açúcar. Assim, as DAPs candidatas a biomarcadores poderão auxiliar no desenvolvimento de variedades tolerantes e/ou resistentes ao raquitismo-da-soqueira (RSD) por meio dos programas de melhoramento.

## **Agradecimentos**

RGGS agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida. Os autores agradecem à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pelo apoio na realização deste trabalho. Ao Prof. Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) pelo



fornecimento da cepa CTC-B07 de *Leifsonia xyli* subsp *xyli*. Aos professores, Dr<sup>a</sup>. Andrea Chaves Fiuza Porto e Dr. Djalma Euzébio Simões Neto, da Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (EECAC/UFRPE), pelo fornecimento do material vegetal e infraestrutura para o experimento em casa-de-vegetação. Ao Prof. Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada, da Universidade Católica de Brasília (UCB), pela disponibilização do espectrômetro de massas e colaboração nas análises. Ao Dr. Jimmy Eng, do Centro de Pesquisas em Proteômica da Universidade de Washington (UWPR, Seattle, EUA), pela inclusão dos dados de cana-de-açúcar e disponibilização de acesso para identificação das proteínas via Mascot. A todos os integrantes do grupo de pesquisa pelo auxílio durante os experimentos e análise dos dados.

## Referências

- AN, Y. *et al.* The GATA transcription factor GNC plays an important role in photosynthesis and growth in poplar. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 6, p. 1969-1984, mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erz564>.
- BAN, Z.; ESTELLE, M. CUL3 E3 ligases in plant development and environmental response. **Nature Plants**, v. 7, n. 1, p. 6-16, jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41477-020-00833-6>.
- BARTHET, M. M.; PIERPONT, C. L.; TAVERNIER, E. K. Unraveling the role of the enigmatic MatK maturase in chloroplast group IIA intron excision. **Plant Direct**, v. 4, n. 3, p. 1-17, mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.1002/pld3.208>.
- BETTI, F. *et al.* RNAi mediated hypoxia stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9394-9409, dez. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21249394>.
- BOARETTO, L. F. **Análise do transcritoma e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose**. 2012. 177 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p.248-254, maio 1976. <http://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- CAMONI, L. *et al.* 14-3-3 Proteins in Plant Hormone Signaling: doing several things at once. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 297, p. 1-8, mar. 2018. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.00297>.

CHANDRAN, V. *et al.* miR396-OsGRFs module balances growth and rice blast disease-resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1999, p. 1-16, jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01999>.

CHEN, G. *et al.* Genome-wide analysis of the rice PPR gene family and their expression profiles under different stress treatments. **BMC Genomics**, v. 19, n. 720, p. 1-14, out. 2018. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-018-5088-9>.

CIA, M. C. *et al.* Novel insights into the early stages of ratoon stunting disease of sugarcane inferred from transcript and protein analysis. **Phytopathology**, v. 108, n. 12, p. 1455-1466, dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-04-18-0120-r>.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367-1372, nov. 2008. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1511>.

CUI, D. L. *et al.* Genome-wide identification and characterization of DCL, AGO and RDR gene families in *Saccharum spontaneum*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 13202, p. 1-17, ago. 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-70061-7>.

DAMANN JR, K. E.; BENDA, G. T. A. Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease. **Plant Disease**, v. 67, n. 9, p. 966-967, sep. 1983. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-67-966>.

DAURELIO, L. D. *et al.* Characterization of *Citrus sinensis* transcription factors closely associated with the non-host response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 10, p. 934-942, jul. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2013.01.011>.

DAVID, L.; HARMON, A. C.; CHEN, S. Plant immune responses: from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens. **Plant Signaling & Behavior**, v. 14, n. 5, p. e1588667, mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1080/15592324.2019.1588667>.

DAVIS, M. J. *et al.* *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, n. 2, p. 107-117, abr. 1984. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-34-2-107>.

DEB, A.; KUNDU, S. Deciphering cis-regulatory element mediated combinatorial regulation in rice under blast infected condition. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0137295, set. 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137295>.

DELAUNOIS, B. *et al.* Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 249, p. 1-18, jun. 2014. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00249>.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

EVARD, J. L. *et al.* Plant TPX2 and related proteins. **Plant Signaling and Behavior**, v. 4, n. 1, p. 69-72, jan. 2009. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.4.1.7409>.

FARIA, R. S. C. A. *et al.* Characterization of genes responsive to osmotic and oxidative stresses of the sugarcane bacterial pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 77-86, mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-019-00163-6>.

FEGAN, M. *et al.* Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. **Plant Pathology**, v. 47, n. 4, p. 495-504, ago. 1998. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00255.x>.

FENG, B. *et al.* Protein ADP-Ribosylation takes control in plant–bacterium interactions. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 12, p. e1005941, dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005941>.

FICKETT, N. D. *et al.* An enriched sugarcane diversity panel for utilization in genetic improvement of sugarcane. **Scientific Reports**, v. 10, n. 13390, p. 1-12, ago. 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-70292-8>.

GIMENEZ, E.; SALINAS, M.; MANZANO-AGUGLIARO, F. Worldwide research on plant defense against biotic stresses as improvement for sustainable agriculture. **Sustainability**, v. 10, n. 2, p. 391-409, fev. 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/su10020391>.

GORELOVA, V. *et al.* Folates in Plants: research advances and progress in crop biofortification. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. 21, p. 1-20, mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2017.00021>.

GÖTZ, S. *et al.* High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3420-3435, jun. 2008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn176>.

GU, Z. *et al.* New perspectives on the plant PARP family: *Arabidopsis* PARP3 is inactive, and PARP1 exhibits predominant poly (ADP-ribose) polymerase activity in response to DNA damage. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 364, p. 1-18, ago. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1958-9>.

GULLNER, G. *et al.* Glutathione s-transferase enzymes in plant-pathogen interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1836, p. 1-19, dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01836>.

GUO, Y. *et al.* Activities of key enzymes in the C4 pathway and anatomy of sugarcane infected by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 6, p. 1790-1800, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14444>.

HUANG, H. *et al.* Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 800, p. 1-10, jun. 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>.

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology**, v. 81, n. 3, p.802-806, jul. 1986. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.802>.

JIANG, Q. *et al.* Proteomic analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) hybrid necrosis. **Plant Science**, v. 175, n. 3, p. 394-401, set. 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.05.017>.

KHAN, M. *et al.* Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. **The Plant Journal**, v. 93, n. 4, p. 651-663, dez. 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.13780>.

KHATUN, K. *et al.* Molecular characterization and expression profiling of tomato GRF transcription factor family genes in response to abiotic stresses and phytohormones. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 1056-1075, maio 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18051056>.

KIM, H. *et al.* ABA-HYPERSENSITIVE BTB/POZ PROTEIN 1 functions as a negative regulator in ABA-mediated inhibition of germination in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 3, p. 303-315, fev. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-015-0418-7>.

KUMAR, V. G. *et al.* Identification of differential expressed proteins and establishing a defense proteome of sugarcane in response to *Colletotrichum falcatum* infection. **Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 3, p. 685-702, maio 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s42161-020-00577-4>.

KUO, S. Y. *et al.* Argonaute 5 family proteins play crucial roles in the defence against *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus* in *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*. **Molecular Plant Pathology**, v. 22, n. 6, p. 627-643, mar. 2021. <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.13049>.

KWON, C.; LEE, J. H.; YUN, H. S. SNAREs in plant biotic and abiotic stress responses. **Molecules and Cells**, v. 6, n. 43, p. 501-508, jun. 2020. <https://doi.org/10.14348/molcells.2020.0007>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, ago 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

LEE, H. J.; PARK, O. K. Lipases associated with plant defense against pathogens. **Plant Science**, v. 279, n. 6, p. 51-58, fev. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.07.003>.

LI, J.; WANG, X. Phospholipase D and phosphatidic acid in plant immunity. **Plant Science**, v. 279, n. 6, p. 45-50, fev. 2019.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.05.021>.

LI, P. *et al.* The lifecycle of the plant immune system. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 39, n. 1, p. 72-100, maio. 2020.  
<http://dx.doi.org/10.1080/07352689.2020.1757829>.

LI, Q. *et al.* CsWAKL08, a pathogen-induced wall-associated receptor-like kinase in sweet orange, confers resistance to citrus bacterial canker via ROS control and JA signaling. **Horticulture Research**, v. 7, n. 42, p. 1-15, abr. 2020.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41438-020-0263-y>.

LIEBSCH, D.; PALATNIK, J. F. MicroRNA miR396, GRF transcription factors and GIF co-regulators: a conserved plant growth regulatory module with potential for breeding and biotechnology. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 53, n. 6, p. 31-42, fev. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2019.09.008>.

LINDBERG, S. *et al.* Phospholipases AtPLD $\zeta$ 1 and AtPLD $\zeta$ 2 function differently in hypoxia. **Physiologia Plantarum**, v. 162, n. 1, p. 98-108, jan. 2018.  
<http://dx.doi.org/10.1111/ppl.12620>.

LIU, G. T. *et al.* Proteomic analysis of early-stage incompatible and compatible interactions between grapevine and *P. viticola*. **Horticulture Research**, v. 8, n. 100, p. 1-21, maio 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41438-021-00533-y>.

LIU, J. M. *et al.* The E-subgroup pentatricopeptide repeat protein family in *Arabidopsis thaliana* and confirmation of the responsiveness PPR96 to abiotic stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1825, p. 1-14, dez. 2016.  
<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.01825>.

LIU, J. *et al.* BIK1 cooperates with BAK1 to regulate constitutive immunity and cell death in *Arabidopsis*. **Journal of Integrative Plant Biology**, [v. 59, n. 4, p. 234-239, abr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/jipb.12529>.

LOZANO-DURÁN, R.; ROBATZEK, S. 14-3-3 proteins in plant-pathogen interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 5, p. 511-518, maio 2015.  
<http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-10-14-0322-cr>.

MCNEIL, M. D. *et al.* Analysis of the resistance mechanisms in sugarcane during *Sporisorium scitamineum* infection using RNA-seq and microscopy. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. e0197840, maio 2018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0197840>.

MENG, J. Y. *et al.* Identification of differentially expressed proteins in sugarcane in response to infection by *Xanthomonas albilineans* using iTRAQ quantitative proteomics. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 76-96, jan. 2020.  
<http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8010076>.

MIRAJKAR, S. J. *et al.* Sugarcane (*Saccharum* spp.): breeding and genomics. In: AL-KHAYRI, J. M.; JAIN, S. M.; JOHNSON, D. V. (Ed.). *Advances in Plant Breeding Strategies: industrial and food crops*. Basel: Springer, 2019. Cap. 11. p. 363-406. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8>.

MITHOE, S. C. *et al.* Attenuation of pattern recognition receptor signaling is mediated by a MAP kinase kinase kinase. **Embo Reports**, v. 17, n. 3, p. 441-454, mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.15252/embr.201540806>.

MONTEIRO-VITORELLO, C. B. *et al.* The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 8, p. 827-836, ago. 2004. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi.2004.17.8.827>.

NISA, M. U. *et al.* The Plant DNA Damage Response: signaling pathways leading to growth inhibition and putative role in response to stress conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 653, p. 1-12, maio 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00653>.

NTAMBO, M. S. *et al.* Comparative transcriptome profiling of resistant and susceptible sugarcane cultivars in response to infection by *Xanthomonas albilineans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 6138-6157, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20246138>.

OECD/FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028**. OECD Publishing, Paris / Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, p. 1-81, jul. 2019.

OMIDBAKHSHFARD, M. A. *et al.* Growth-Regulating Factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology. **Molecular Plant**, v. 8, n. 7, p. 998-1010, jul. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.013>.

PENG, W. *et al.* Genome-wide characterization, evolution, and expression profile analysis of GATA transcription factors in *Brachypodium distachyon*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 2026-2039, fev. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22042026>.

PETERS, L. P. *et al.* Functional analysis of oxidative burst in sugarcane smut-resistant and -susceptible genotypes. **Planta**, v. 245, n. 4, p. 749-764, abr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-016-2642-z>.

PETROVSKÁ, B. *et al.* Overexpressed TPX2 causes ectopic formation of microtubular arrays in the nuclei of acentrosomal plant cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 14, p. 4575-4587, nov. 2013. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ert271>.

POWELL, J. J. *et al.* The defence-associated transcriptome of hexaploid wheat displays homoeolog expression and induction bias. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 4, p. 533-543, abr. 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12651>.

- QIN, L. *et al.* genome-wide analysis of DCL, AGO, and RDR gene families in pepper (*Capsicum annuum* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1038-1052, mar. 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19041038>.
- QUECINE, M. C. *et al.* A stable *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* GFP-tagged strain reveals a new colonization niche in sugarcane tissues. **Plant Pathology**, v. 65, n. 1, p. 154-162, jun. 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12397>.
- REIS, R. S. *et al.* Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. **Journal of Proteomics**, v. 130, n. 17, p. 170-179, jan. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.029>.
- ROBB, J.; LEE, B.; NAZAR, R. N. Gene suppression in a tolerant tomato-vascular pathogen interaction. **Planta**, v. 226, n. 2, p. 299-309, jul. 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-007-0482-6>.
- SALVATO, F. *et al.* Label-free quantitative proteomics of enriched nuclei from sugarcane (*Saccharum* ssp) stems in response to drought stress. **Proteomics**, v. 19, n. 14, p. 1900004-1900018, jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201900004>.
- SANG, N. *et al.* Roles of the 14-3-3 gene family in cotton flowering. **BMC Plant Biology**, v. 21, n. 162, p. 1-17, mar. 2021. <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-021-02923-9>.
- SANTA-BRIGIDA, A. B. *et al.* Sugarcane transcriptome analysis in response to infection caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0166473, dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0166473>.
- SANTOS, C. *et al.* Proteomic analysis and functional validation of a *Brassica oleracea* endochitinase involved in resistance to *Xanthomonas campestris*. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 414, p. 1-17, abr. 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00414>.
- SCHMITZ-LINNEWEBER, C. *et al.* Organellar maturases: a window into the evolution of the spliceosome. **Biochimica et Biophysica Acta: Bioenergetics**, v. 1847, n. 9, p. 798-808, set. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.01.009>.
- SCHREIBER, K. J.; CHAU-LY, I. J.; LEWIS, J. D. What the wild things do: mechanisms of plant host manipulation by bacterial type III-secreted effector proteins. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1029-1077, maio 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9051029>
- SHARMA, B. B. *et al.* Genetics and molecular mapping of black rot resistance locus Xca1bc on chromosome B-7 in Ethiopian mustard (*Brassica carinata* A. Braun). **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152290, mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0152290>.
- SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p.2856-2860, jan. 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>.

SHI, F. *et al.* Expression profile analysis of maize in response to *Setosphaeria turcica*. **Gene**, v. 659, n. 12, p. 100-108, jun. 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.030>.

SMERTENKO, A. *et al.* A guide to plant TPX2-like and WAVE-DAMPENED2-like proteins. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 4, p. 1034-1045, fev. 2021. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/eraa513>.

SOTO-SUÁREZ, M. *et al.* The *Arabidopsis* miR396 mediates pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses against fungal pathogens. **Scientific Reports**, v. 7, n. 44898, p. 1-14, mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/srep44898>.

STEELE, J. F. C.; HUGHES, R. K.; BANFIELD, M. J. Structural and biochemical studies of an NB-ARC domain from a plant NLR immune receptor. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0221226, ago. 2019. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0221226>.

URASHIMA, A. S.; GRACHET, N. G. Métodos de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e efeito da termoterapia na brotação das gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 1, p. 57-64, fev. 2012. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000100007>.

TAKÁČ, T.; NOVÁK, D.; IMAJ, J. Recent advances in the cellular and developmental biology of phospholipases in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 362, p. 1-12, abr. 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00362>.

TOMAĽTÍKOVÁ, E. *et al.* TPX2 Protein of *Arabidopsis* activates aurora kinase 1, but not aurora kinase 3 in vitro. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 33, n. 6, p. 1988-1995, abr. 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s11105-015-0890-x>.

TYANOVA, S. *et al.* The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature Methods**, v. 13, n. 9, p. 731-740, jun. 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3901>.

WANG, C. *et al.* Three new pentatricopeptide repeat proteins facilitate the splicing of mitochondrial transcripts and complex I biogenesis in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 21, p. 5131-5140, out. 2018. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ery275>.

WANG, D. *et al.* A class III WRKY transcription factor in sugarcane was involved in biotic and abiotic stress responses. **Scientific Reports**, v. 10, n. 20964, p. 1-15, dez. 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-78007-9>.

WITTEK, F. *et al.* Folic acid induces salicylic acid-dependent immunity in *Arabidopsis* and enhances susceptibility to *Alternaria brassicicola*. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 6, p. 616-622, ago. 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12216>.

WOO, O. G. *et al.* BPH1, a novel substrate receptor of CRL3, plays a repressive role in ABA signal transduction. **Plant Molecular Biology**, v. 96, n. 6, p. 593-606, abr. 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-018-0717-x>.



XING, H. *et al.* Genome-wide investigation of pentatricopeptide repeat gene family in poplar and their expression analysis in response to biotic and abiotic stresses. **Scientific Reports**, v. 8, n. 2817, p. 1-9, fev. 2018. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-21269-1>.

XING, J. *et al.* Coordination of phospholipid-based signaling and membrane trafficking in plant immunity. **Trends in Plant Science**, v. 26, n. 4, p. 407-420, abr. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2020.11.010>.

XU, J.; ZHANG, S. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 1, p. 56-64, jan. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.001>.

YU, C. *et al.* Genome-wide identification and function characterization of GATA transcription factors during development and in response to abiotic stresses and hormone treatments in pepper. **Journal of Applied Genetics**, v. 62, n. 2, p. 265-280, maio 2021. <http://dx.doi.org/10.1007/s13353-021-00618-3>.

YU, Z. *et al.* A semi-dominant mutation in a CC-NB-LRR-type protein leads to a short-root phenotype in rice. **Rice**, v. 11, n. 54, p. 1-11, out. 2018. <http://dx.doi.org/10.1186/s12284-018-0250-1>.

ZHAI, L. *et al.* Expression analysis of Argonaute genes in maize (*Zea mays* L.) in response to abiotic stress. **Hereditas**, v. 156, n. 27, p. 1-10, jul. 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s41065-019-0102-z>.

ZHANG, X. *et al.* Morphological and physiological responses of sugarcane to *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infection. **Plant Disease**, v. 100, n. 12, p. 2499-2506, dez. 2016a. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-10-15-1134-re>.

ZHANG, X. Q. *et al.* Influence of inoculation of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* on photosynthetic parameters and activities of defense enzymes in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 19, n. 4, p. 394-401, set. 2016b. <http://dx.doi.org/10.1007/s12355-016-0479-1>.

ZHU, K. *et al.* A transcriptomic analysis of sugarcane response to *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infection. **PLOS ONE**, v. 16, n. 2, p. e0245613, fev. 2021. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0245613>.

ZHU, K. *et al.* Functional analysis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* membrane protein gene Lxx18460 (anti-sigma K). **BMC Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 1-12, jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-018-1378-2>.

ZHU, K. *et al.* The physiological characteristics and associated gene expression of sugar cane inoculated with *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 1, p. 44-52, jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12659>.

## 5 CONCLUSÕES

- A infecção e o estabelecimento da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) nos colmos da cana-de-açúcar está associada a modificações significativas no proteoma do hospedeiro em resposta ao estresse biótico.
- A identificação de proteínas de cana-de-açúcar diferencialmente acumuladas (DAPs) no colmo em resposta à infecção por *Lxx* pode auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares associados a esse patossistema e à defesa da planta.
- Em perspectiva futura, após conclusão da identificação, as DAPs selecionadas como candidatas a biomarcadores poderão ser utilizadas na seleção e desenvolvimento de variedades mais tolerantes ou resistentes ao raquitismo-da-soqueira (RSD).

## 6 SÚMULA CURRICULAR

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7130500593452280>

### Rayssa Guedes Gomes da Silva

Bacharela em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Brasil (2018). Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia na Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Brasil. Empenha-se em pesquisas com foco na identificação de proteínas e genes envolvidos na tolerância da cana-de-açúcar aos estresses bióticos utilizando ferramentas "ômicas". Desenvolve seu trabalho no Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP), Departamento de Genética, UFPE, sob a orientação do Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior.

### Formação complementar

2019 - Genetic Engineering to Higher Crops Development: Genome Editing - CBAB. Carga horária: 40h. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, Brasil.

### Resumos publicados em anais de congressos

SILVA, R. G. G.; SILVA, F. A. C.; CALSA JUNIOR, T. Interatoma caulinar de cana-de-açúcar em resposta à simbiose com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. In: XXIII Encontro de Genética do Nordeste, 2021, Juazeiro-BA. Anais do XXIII Encontro de Genética do Nordeste, 2021.

SILVA, R. G. G.; ALMEIDA, R. R.; SILVA, F. A. C.; CALSA JUNIOR, T. Interatoma foliar da cana-de-açúcar em resposta à infecção por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. In: I Encontro de Biociências da UFPE, 2019, Recife-PE. Anais do I Encontro de Biociências da UFPE, 2019.

### Apresentações de trabalhos

SILVA, R. G. G.; SILVA, F. A. C.; CALSA JUNIOR, T. Interatoma caulinar de cana-de-açúcar em resposta à simbiose com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. 2021. (Apresentação de Trabalho/Outra).

SILVA, R. G. G.; ALMEIDA, R. R.; SILVA, F. A. C.; CALSA JUNIOR, T. Interatoma foliar da cana-de-açúcar em resposta à infecção por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. 2019. (Apresentação de Trabalho/Outra).

### Curso de curta duração ministrado

SILVA, F. A. C.; PENA, E. P. N.; SILVA, R. G. G.; FECHINE, J. M. Introdução à Análise Proteômica: princípios e métodos computacionais. 2019.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, P. *et al.* Role of proteomics in crop stress tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1336, p. 1-14, set. 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01336>.
- ALI, A. *et al.* Sugarcane Omics: an update on the current status of research and crop improvement. **Plants**, v. 8, n. 9, p.344-367, set. 2019. <https://doi.org/10.3390/plants8090344>.
- ALMEIDA, R. R. **Proteômica da interação planta-patógeno/simbionte em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2015. 234 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- ARAÚJO, W. A. Ethanol Industry: surpassing uncertainties and looking forward. In: SALLES-FILHO, S. L. M. *et al* (Ed.). **Global Bioethanol: evolution, risks and uncertainties**. London: Academic Press, 2016. p. 1-33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803141-4.00001-0>.
- ASHWIN, N. M. R. *et al.* Advances in proteomic technologies and their scope of application in understanding plant-pathogen interactions. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 371-386, abr. 2017. <https://doi.org/10.1007/s13562-017-0402-1>.
- ASLAM, B. *et al.* Proteomics: technologies and their applications. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 2, p. 182-196, fev. 2017. <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>.
- BAILLO, E. H. *et al.* Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. **Genes**, v. 10, n. 10, p. 771-793, set. 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/genes10100771>.
- BARNABAS, L. *et al.* Sugarcane proteomics: an update on current status, challenges, and future prospects. **Proteomics**, v. 15, n. 10, p. 1658-1670, maio 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201400463>.
- BESSA, B. **Poesia que transforma**. Rio de Janeiro: Sextante, 2018.
- BLUDAU, I.; AEBERSOLD, R. Proteomic and interactomic insights into the molecular basis of cell functional diversity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 6, p. 327-340, mar. 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-0231-2>.
- BOARETTO, L. F. **Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose**. 2012. 177 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p.248-254, maio 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

BOUTROT, F.; ZIPFEL, C. Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n. 1, p. 257-286, ago. 2017. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>.

BORDONAL, R. O. *et al.* Sustainability of sugarcane production in Brazil: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 38, n. 2, p. 1-22, abr. 2018. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0490-x>.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 2. ed. Oxford: Wiley, 2015. 1280 p.

BÜRGER, M.; CHORY, J. Stressed out about hormones: how plants orchestrate immunity. **Cell Host and Microbe**, v. 26, n. 2, p. 163-172, ago. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2019.07.006>.

CALDERAN-RODRIGUES, M. J. *et al.* Applying molecular phenotyping tools to explore sugarcane carbon potential. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. 637166, p. 1-23, fev. 2021. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2021.637166>.

CARVALHO, G. *et al.* Development of a qPCR for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and quantification of the effects of heat treatment of sugarcane cuttings on Lxx. **Crop Protection**, v. 80, n. 6, p.51-55, fev. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.10.029>.

CARVALHO, L. M. *et al.* Bioinformatics applied to biotechnology: a review towards bioenergy research. **Biomass and Bioenergy**, v. 123, n. 17, p. 195-224, abr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.02.016>.

CASTRO-MORETTI, F. R. *et al.* Targeted metabolic profiles of the leaves and xylem sap of two sugarcane genotypes infected with the vascular bacterial pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Metabolites**, v. 11, n. 4, p. 234-250, abr. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/metabo11040234>.

CATHERMAN, A. D.; SKINNER, O. S.; KELLEHER, N. L. Top down proteomics: facts and perspectives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 445, n. 4, p.683-693, mar. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.041>.

CHAIT, B. T. Mass Spectrometry: bottom-up or top-down? **Science**, v. 314, n. 5796, p. 65-66, out. 2006. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1133987>.

CHAMPAGNE, A.; BOUTRY, M. Proteomics of nonmodel plant species. **Proteomics**, v. 13, n. 3, p. 663-673, fev. 2013. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201200312>.

CHEN, C. *et al.* Bioinformatics methods for mass spectrometry-based proteomics data analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2873, abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21082873>.

CHEUNG, A. Y. *et al.* Update on receptors and signaling. **Plant Physiology**, v. 182, n. 4, p. 1527-1530, abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.20.00275>.

CHU, N. *et al.* Global gene responses of resistant and susceptible sugarcane cultivars to *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* identified using comparative transcriptome analysis. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 10-28, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8010010>.

CIA, M. C. *et al.* Novel insights into the early stages of ratoon stunting disease of sugarcane inferred from transcript and protein analysis. **Phytopathology**, v. 108, n. 12, p. 1455-1466, dez. 2018. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-04-18-0120-r>.

COMSTOCK, J. C. *et al.* Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* colonization in sugarcane and spread of ratoon stunting disease in the field. **Plant Disease**, v. 80, n. 6, p. 704-708, mar. 1996. <http://dx.doi.org/10.1094/pd-80-0704>.

COMSTOCK, J. C. Ratoon stunting disease. **Sugar Tech**, v. 4, n. 1-2, p. 1-6, jun. 2002. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02956872>.

COMSTOCK, J. C. Sugarcane diseases: futuristic management strategies. **Sugar Tech**, v. 15, n. 1, p. 1-2, dez. 2012. <https://doi.org/10.1007/s12355-012-0193-6>.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar. Brasília, v. 8 - Safra 2021/2022, n. 1 - Primeiro Levantamento, p. 1-55, 2021.

COUTO, D.; ZIPFEL, C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p.537-552, ago. 2016. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.77>.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367-1372, nov. 2008. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1511>.

COX, J.; MANN, M. Is proteomics the new genomics? **Cell**, v. 130, n. 3, p. 395-398, ago. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.032>.

CROFT, B. J. *et al.* RSD diagnosis and varietal resistance screening in sugarcane using the EB-EIA technique. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, v. 16, n. 1, p. 143-151, abr. 1994.

DAMANN JUNIOR, K. E. Alkaline-induced metaxylem autofluorescence: a diagnostic symptom of ratoon stunting disease of sugarcane. **Phytopathology**, v. 78, n. 2, p. 233-236, jun. 1988. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-78-233>.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdã: Elsevier, 1987.

DAVID, L.; HARMON, A. C.; CHEN, S. Plant immune responses: from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens. **Plant**

**Signaling and Behavior**, v. 14, n. 5, p. e15886671-e15886679, mar. 2019.  
<http://dx.doi.org/10.1080/15592324.2019.1588667>.

DAVIS, M. J. *et al.* *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, n. 2, p. 107-117, abr. 1984.  
<http://dx.doi.org/10.1099/00207713-34-2-107>.

DAVIS, M. J. *et al.* Properties and relationships of two xylem-limited bacteria and a mycoplasma-like organism infecting bermuda grass. **Phytopathology**, v. 73, n. 2, p. 341-346, jan. 1983. <http://dx.doi.org/10.1126/science.210.4476.1365>.

DAVIS, M. J. *et al.* Ratoon stunting disease of sugarcane: isolation of the causal bacterium. **Science**, v. 210, n. 4476, p. 1365-1367, dez. 1980.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.210.4476.1365>.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 539-548, ago. 2010.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nrg2812>.

DOLL, S.; GNAD, F.; MANN, M. The case for proteomics and phospho-proteomics in personalized cancer medicine. **Proteomics Clinical Applications**, v. 13, n. 2, p. 1800113, mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/prca.201800113>.

DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and protein analysis. **Science**, v. 312, n. 5771, p. 212-217, abr. 2006. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1124619>.

DOTANIYA, M. L. *et al.* Use of sugarcane industrial by-products for improving sugarcane productivity and soil health. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 5, n. 3, p. 185-194, jun. 2016.  
<https://doi.org/10.1007/s40093-016-0132-8>.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p. 210-230, abr. 2009.  
<http://dx.doi.org/10.1080/05704920902717872>.

ENGELHARDT, S.; STAM, R.; HÜCKELHOVEN, R. Good riddance? breaking disease susceptibility in the era of new breeding technologies. **Agronomy**, v. 8, n. 114, p. 155-169, jul. 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy8070114>.

EVTUSHENKO, L. I. *et al.* *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of "*Corynebacterium aquaticum*" Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli*

(Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 371-380, jan. 2000.  
<http://dx.doi.org/10.1099/00207713-50-1-371>.

FANG, X. *et al.* Proteomic dissection of plant responses to various pathogens. **Proteomics**, v. 15, n. 9, p. 1525-1543, mar. 2015.  
<http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201400384>.

FARAHANI, A. S.; TAGHAVI, S. M.; TAHER-KHANI, K. Comparison of conventional, nested and real-time PCR for detection of the causal agent of ratoon stunt in Iran. **Journal of Plant Pathology**, v. 97, n. 2, p. 259-263, jul. 2015.  
<http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I2.020>

FEGAN, M. *et al.* Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. **Plant Pathology**, v. 47, n. 4, p. 495-504, ago. 1998.  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00255.x>.

FERNANDES-JÚNIOR, A. R. *et al.* Avaliação de diferentes tratamentos térmicos no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 1, p. 60-64, fev. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/s1982-56762010000100011>.

FEIST, P.; HUMMON, A. Proteomic challenges: sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 3537-3563, fev. 2015.  
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms16023537>.

FIORILLI, V. *et al.* Editorial: interactions of plants with bacteria and fungi. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, n. 274, p. 1-3, mar. 2020.  
<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.00274>.

FRANTZI, M.; LATOSINSKA, A.; MISCHAK, H. Proteomics in drug development: the dawn of a new era? **Proteomics Clinical Applications**, v. 13, n. 2, p. 1800087, fev. 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/prca.201800087>.

FU, H. Y. *et al.* Rapid and quantitative detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane stalk juice using a real-time fluorescent (TaqMan) PCR assay. **Biomed Research International**, v. 2016, n. 2681816, p. 1-8, ago. 2016.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/2681816>.

GAGLIARDI, P. R.; CAMARGO, L. E. A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1211-1214, mar. 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782009005000034>.

GARCIA, F. H. S. *et al.* Impact of the colonization of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in a susceptible sugarcane genotype on water status and physiological traits. **European Journal of Plant Pathology**, v. 159, n. 4, p. 839-849, jan. 2021.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10658-021-02209-8>.



GARSMEUR, O. *et al.* A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-10, jul. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05051-5>.

GHAJ, M. *et al.* A rapid and visual loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* targeting a transposase gene. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 648-657, out. 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12327>.

GILLASPIE, A. G.; DAVIS, R. E.; WORLEY, J. F. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific micro-organism. **Plant Disease Reporter**, v. 57, n. 12, p. 987-990, 1973.

GILLASPIE, A. G.; TEAKLE, D. S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C. *et al* (Ed.). **Diseases of Sugarcane: major diseases**. New York: Elsevier Science, 1989. p. 59-80. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-01139-8>.

GILLET, L. C.; LEITNER, A.; AEBERSOLD, R. Mass spectrometry applied to bottom-up proteomics: entering the high-throughput era for hypothesis testing. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 449-472, jun. 2016. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041535>.

GIMENEZ, E.; SALINAS, M.; MANZANO-AGUGLIARO, F. Worldwide research on plant defense against biotic stresses as improvement for sustainable agriculture. **Sustainability**, v. 10, n. 2, p. 391-409, fev. 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/su10020391>.

GIRARD, J. C. *et al.* First report of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causing sugarcane red stripe in Gabon. **Plant Disease**, v. 98, n. 5, p. 684-684, maio 2014. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-09-13-0914-pdn>.

GOEZ, M. M. *et al.* Preprocessing of 2-dimensional gel electrophoresis images applied to proteomic analysis: a review. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p.63-72, fev. 2018.

GONG, F.; HU, X.; WANG, W. Proteomic analysis of crop plants under abiotic stress conditions: where to focus our research? **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 418, p. 1-5, jun. 2015. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00418>.

GÖTZ, S. *et al.* High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 10, p. 3420-3435, jun. 2008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn176>.

GRECO, V. *et al.* Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. **Expert Review of Proteomics**, v. 15, n. 8, p. 683-696, ago. 2018. <http://dx.doi.org/10.1080/14789450.2018.1505510>.

GRISHAM, M. P.; PAN, Y. B.; RICHARD, E. P. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Disease**, v. 91, n. 4, p. 430-434, abr. 2007. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-91-4-0430>.

GUO, Y. *et al.* Activities of key enzymes in the C4 pathway and anatomy of sugarcane infected by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 6, p. 1790-1800, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14444>.

GUTIERREZ, A.; GARCES, F. F.; HOY, J. W. Evaluation of resistance to leaf scald by quantitative PCR of *Xanthomonas albilineans* in sugarcane. **Plant Disease**, v. 100, n. 7, p. 1331-1338, jul. 2016. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-09-15-1111-re>.

HAAG, A. M. Mass analyzers and mass spectrometers. In: MIRZAEI, H.; CARRASCO, M. (Ed.). **Modern proteomics: sample preparation, analysis and practical applications**. Cham: Springer, 2016. p. 157-169. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_7).

HAAPALAINEN, M.; MATTINEN, J.; METZLER, M. C. The growth of a plant-parasitic bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, is enhanced by xylem fluid components. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, n. 4, p. 147-155, abr. 2000. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0260>.

HE, T. Implementation of proteomics in clinical trials. **Proteomics Clinical Applications**, v. 13, n. 2, p. 1800198, fev. 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/prca.201800198>.

HEINRICHS, R. *et al.* Importance of sugarcane in Brazilian and world bioeconomy. In: DABBERT, S. *et al.* (Ed.). **Knowledge-driven developments in the bioeconomy**. Springer International Publishing, 2017. p. 205-217. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-58374-7\\_11](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-58374-7_11).

HOU, S. *et al.* Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 646, p. 1-16, maio 2019. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00646>.

HOU, T. Y.; CHIANG-NI, C.; TENG, S. H. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 2, p. 404-414, abr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>.

HOY, J. W.; GRISHAM, M. P.; DAMANN, K. E. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods. **Plant Disease**, v. 83, n. 12, p. 1170-1175, dez. 1999. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.1999.83.12.1170>.

HU, J.; RAMPITSCH, C.; BYKOVA, N. V. Advances in plant proteomics toward improvement of crop productivity and stress resistance. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 209, p. 1-15, abr. 2015. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00209>.

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology**, v. 81, n. 3, p.802-806, jul. 1986. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.802>.

JAIN, A.; SINGH, H. B.; DAS, S. Deciphering plant-microbe crosstalk through proteomics studies. **Microbiological Research**, v. 242, n. 126590, p. 1-11, jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2020.126590>.

JAVED, T. *et al.* Transcription factors in plant stress responses: challenges and potential for sugarcane improvement. **Plants**, v. 9, n. 4, p. 491-508, abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/plants9040491>.

JORRÍN-NOVO, J. V. *et al.* Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. **Proteomics**, v. 15, n. 5-6, p. 1089-1112, 13 fev. 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201400349>.

JORRÍN-NOVO, J. V. *et al.* Gel electrophoresis-based plant proteomics: past, present, and future. Happy 10th anniversary Journal of Proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 198, n. 1, p. 1-10, abr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2018.08.016>.

KANDEL, R. *et al.* Potentials, challenges, and genetic and genomic resources for sugarcane biomass improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 151, p. 1-14, fev. 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00151>.

KHAN, M.; SUBRAMANIAM, R.; DESVEAUX, D. Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. **Current Opinion in Microbiology**, v. 29, p. 49-55, fev. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.10.006>.

KHAN, M. T.; KHAN, I. A.; YASMEEN, S. Genetically modified sugarcane for biofuels production: status and perspectives of conventional transgenic approaches, RNA interference, and genome editing for improving sugarcane for biofuels. In: KHAN, M. T.; KHAN, I. A. (Ed.). **Sugarcane Biofuels: status, potential, and prospects of the sweet crop to fuel the world**. Basel: Springer, 2019. p. 67-96. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-18597-8>.

KUSHALAPPA, A. C.; GUNNAIAH, R. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 9, p. 522-531, set. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2013.05.002>.

KUSHALAPPA, A. C.; YOGENDRA, K. N.; KARRE, S. Plant innate immune response: qualitative and quantitative resistance. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 35, n. 1, p. 38-55, mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/07352689.2016.1148980>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, ago 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

LI, N. *et al.* Signaling crosstalk between salicylic acid and ethylene/jasmonate in plant defense: do we understand what they are whispering? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 671-685, fev. 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20030671>.

LI, Q.; WANG, C.; MOU, Z. Perception of damaged self in plants. **Plant Physiology**, v. 182, n. 4, p. 1545-1565, abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.19.01242>.

LI, W. F. *et al.* PCR detection of ratoon stunting disease pathogen and natural resistance analysis in sugarcane core germplasms. **Crop Protection**, v. 53, n. 1, p. 46-51, nov. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.06.011>.

LI, W. F. *et al.* Incidence of sugarcane ratoon stunting disease in the major cane-growing regions of China. **Crop Protection**, v. 60, n. 7, p. 44-47, jun. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.02.011>.

LI, X. Y. *et al.* Molecular identification and prevalence of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causing red stripe of sugarcane in China. **Plant Pathology**, v. 67, n. 4, p. 929-937, dez. 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12811>.

LIU, G. T. *et al.* Proteomic analysis of early-stage incompatible and compatible interactions between grapevine and *P. viticola*. **Horticulture Research**, v. 8, n. 100, p. 1-21, maio 2021. <http://dx.doi.org/10.1038/s41438-021-00533-y>.

LIU, J. *et al.* Development of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane. **Biomed Research International**, v. 2013, n. 357692, p. 1-8, abr. 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/357692>.

LIU, Y. *et al.* Proteomics: a powerful tool to study plant responses to biotic stress. **Plant Methods**, v. 15, n. 1, p. 135-154, nov. 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s13007-019-0515-8>.

LU, J. J. *et al.* Comparative genomics reveals insights into genetic variability and molecular evolution among sugarcane yellow leaf virus populations. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 7149-7159, mar. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86472-z>.

MALIK, N. A. A.; KUMAR, I. S.; NADARAJAH, K. Elicitor and receptor molecules: orchestrators of plant defense and immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 963-996, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21030963>.

MANECHINI, J. R. V. *et al.* Unraveling the genetic structure of Brazilian commercial sugarcane cultivars through microsatellite markers. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195623, abr. 2018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0195623>.

MAGDELDIN, S. *et al.* Basics and recent advances of two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis. **Clinical Proteomics**, v. 11, n. 1, p.16-25, abr. 2014.

MANNERS, J. M. Functional genomics of sugarcane. In: KADER, J. C.; DELSENY, M. (Ed.). **Advances in Botanical Research**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2011. p. 91-146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385851-1.00003-2>.

- MARAMOROSCH, K. *et al.* Electron microscopy of ratoon stunted sugar cane: microorganisms in xylem. **Journal of Phytopathology**, v. 77, n. 3, p. 270-273, jul. 1973. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.1973.tb04133.x>.
- MARCUS, K.; LELONG, C.; RABILLOUD, T. What room for two-dimensional gel-based proteomics in a shotgun proteomics world? **Proteomes**, v. 8, n. 3, p. 17-42, ago. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/proteomes8030017>.
- MEHTA, A.; SILVA, L. P. MALDI-TOF MS profiling approach: how much can we get from it. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 184, p. 1-3, mar. 2015. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00184>.
- MELEADY, P. Two-dimensional gel electrophoresis and 2D-DIGE. In: OHLENDIECK, Kay. (Ed.). **Difference gel electrophoresis: methods and protocols**. Nova lorque: Humana Press, 2018. p.3-14.
- MENG, J. Y. *et al.* Identification of differentially expressed proteins in sugarcane in response to infection by *Xanthomonas albilineans* using iTRAQ quantitative proteomics. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 76-96, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8010076>.
- METZLER, M. C; LAINE, M. J; BOER, S. H. The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150, n. 1, p. 1-8, maio 1997. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10342.x>.
- MILLER, R. N. G.; ALVES, G. S. C.; VAN SLUYS, M. A. Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. **Annals of Botany**, v. 119, n. 5, p. 681-687, mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcw284>.
- MILLS, L. *et al.* *Leifsonia xyli*-like bacteria are endophytes of grasses in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 145-151, jun. 2001. <http://dx.doi.org/10.1071/ap01003>.
- MIRAJKAR, S. J. *et al.* Sugarcane (*Saccharum* spp.): breeding and genomics. In: AL-KHAYRI, J. M.; JAIN, S. M.; JOHNSON, D. V. (Ed.). **Advances in Plant Breeding Strategies: industrial and food crops**. Basel: Springer, 2019. Cap. 11. p. 363-406. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8>.
- MOHAN, C. Genome Editing in Sugarcane: challenges ahead. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1542, p. 1-5, out. 2016. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.01542>.
- MONTEIRO-VITORELLO, C. B. *et al.* The genome sequence of the gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 8, p. 827-836, ago. 2004. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi.2004.17.8.827>.
- MONTEIRO-VITORELLO, C. B. *et al.* Genome sequence-based insights into the biology of the sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. In: JACKSON, R. W. (Ed.). **Plant Pathogenic Bacteria: genomics and molecular biology**. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. Cap. 6. p. 135-146.

MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. **Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology**. Nova Delhi: Wiley, 2014. <https://doi.org/10.1002/9781118771280>.

MORAES, M. C. P.; MELLO, K.; TOPPA, R. H. Protected areas and agricultural expansion: biodiversity conservation versus economic growth in the Southeast of Brazil. **Journal of Environmental Management**, v. 188, p. 73–84, mar. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.075>.

MORAIS, L. K. *et al.* Breeding of Sugarcane. In: CRUZ, Von Mark V.; DIERIG, David A. (Ed.). **Industrial Crops: breeding for bioenergy and bioproducts**. New York: Springer, 2015. p. 29-42. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1447-0>.

MOREIRA, J. R.; GOLDEMBERG, J. The alcohol program. **Energy Policy**, v. 27, n. 4, p. 229-245, abr. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0301-4215\(99\)00005-1](https://doi.org/10.1016/S0301-4215(99)00005-1).

NADLER, W. M. *et al.* MALDI versus ESI: the impact of the ion source on peptide identification. **Journal of Proteome Research**, v. 16, n. 3, p. 1207-1215, fev. 2017. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00805>.

NARYZHNY, S. Towards the full realization of 2DE power. **Proteomes**, v. 4, n. 4, p. 33-47, nov. 2016. <http://dx.doi.org/10.3390/proteomes4040033>.

NELSON, R. *et al.* Navigating complexity to breed disease-resistant crops. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 1, p. 21-33, jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2017.82>.

NERKAR, G. A. *et al.* Biotechnological approach: a new dimension for sugarcane improvement. In: SENGAR, K. (Ed.). **Biotechnology to enhance sugarcane productivity and stress tolerance**. Boca Raton: CRC Press, 2018. p. 1-23. <https://doi.org/10.1201/9781315152776>.

NICE, E. C. The separation sciences, the front end to proteomics: an historical perspective. **Biomedical Chromatography**, v. 35, n. 1, p. 1-14, jan. 2021. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.4995>.

NING, F.; WU, X.; WANG, W. Exploiting the potential of 2DE in proteomics analyses. **Expert Review of Proteomics**, v. 13, n. 10, p. 901-903, set. 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/14789450.2016.1230498>.

NOMAN, A. *et al.* Plant-insect-microbe interaction: a love triangle between enemies in ecosystem. **Science of The Total Environment**, v. 699, n. 134181, p. 1-11, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134181>.

NOOR, Z. *et al.* Mass spectrometry-based protein identification in proteomics: a review. **Briefings in Bioinformatics**, v. 21, n. 1, p. 1-19, 11 fev. 2020. <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbz163>.

NTAMBO, M. S. *et al.* Comparative transcriptome profiling of resistant and susceptible sugarcane cultivars in response to infection by *Xanthomonas albilineans*.

**International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 6138-6157, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20246138>.

OECD/FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028**. OECD Publishing, Paris / Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, p. 1-81, jul. 2019.

PACHECO, C. M. *et al.* Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 12, p. 5681-5695, nov. 2013. <http://dx.doi.org/10.1021/pr400654a>.

PADULA, M. *et al.* A Comprehensive guide for performing sample preparation and top-down protein analysis. **Proteomes**, v. 5, n. 4, p. 11-41, abr. 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/proteomes5020011>.

PARAMESWARI, B. *et al.* Genome wide association studies in sugarcane host pathogen system for disease resistance: an update on the current status of research. **Indian Phytopathology**, v. , n. , p., abr. 2021. <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00323-5>.

PELOSI, C. S. *et al.* Development of a Taqman real-time PCR assay for detection of *Leifsonia xyli* subsp *xyli*. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 4, p. 343-345, ago. 2013. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013005000013>.

PENG, Y.; VAN WERSCH, R.; ZHANG, Y. Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 31, n. 4, p. 403-409, abr. 2018. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-06-17-0145-cr>.

PERGANDE, M.; COLOGNA, S. Isoelectric point separations of peptides and proteins. **Proteomes**, v. 5, n. 4, p. 4-17, jan. 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/proteomes5010004>.

PESSOA-JR, A. *et al.* Perspectives on bioenergy and biotechnology in Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, n. 1-3, p. 59-70, mar. 2005. <https://doi.org/10.1385/ABAB:121:1-3:0059>.

PETIT-HOUDENOT, Y.; FUDAL, I. Complex interactions between fungal avirulence genes and their corresponding plant resistance genes and consequences for disease resistance management. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 1072, p. 1-8, jun. 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.01072>.

PHANSE, S.; EMILI, A. Proteomics and protein identification by mass spectrometry. In: BAXEVANIS, A. D.; BADER, G. D.; WISHART, D. S. (Ed.). **Bioinformatics**. Hoboken: Wiley, 2020. p. 315-362.

PIERRE, J. S.; RAE, A. L.; BONNETT, G. D. Abiotic limits for germination of sugarcane seed in relation to environmental spread. **Tropical Plant Biology**, v. 7, n. 3-4, p. 100-110, set. 2014. <https://doi.org/10.1007/s12042-014-9141-9>.

PONTE, E. C. *et al.* Incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar no Espírito Santo, sul da Bahia e oeste de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 4, p. 313-321, dez. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-54052010000400006>.

QUECINE, M. C. *et al.* A stable *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* GFP-tagged strain reveals a new colonization niche in sugarcane tissues. **Plant Pathology**, v. 65, n. 1, p. 154-162, jun. 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12397>.

RANF, S. Pattern Recognition Receptors: versatile genetic tools for engineering broad-spectrum disease resistance in crops. **Agronomy**, v. 8, n. 8, p. 170-182, ago. 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy8080134>.

RINSCHEN, M. M. *et al.* Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 6, p. 353-367, fev. 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0108-4>.

RODY, H. V. S. *et al.* Genome survey of resistance gene analogs in sugarcane: genomic features and differential expression of the innate immune system from a smut-resistant genotype. **BMC Genomics**, v. 20, n. 809, p. 1-17, nov. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6207-y>.

ROTT, P. *et al.* (Ed.). **A Guide to Sugarcane Diseases**. Montpellier: Cirad, 2000. 339 p.

RULLI, M. C. *et al.* The water-land-food nexus of first-generation biofuels. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 22521-22531, mar. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep22521>.

SADHU, A. *et al.* Nitric oxide and ROS mediate autophagy and regulate *Alternaria alternata* toxin-induced cell death in tobacco BY-2 cells. **Scientific Reports**, v. 9, n. 8973, p. 1-14, jun. 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-45470-y>.

SANTA-BRIGIDA, A. B. *et al.* Sugarcane transcriptome analysis in response to infection caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. e0166473, dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0166473>.

SANTOS, E. C. *et al.* The pathogen *Moniliophthora perniciosa* promotes differential proteomic modulation of cacao genotypes with contrasting resistance to witches' broom disease. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 1-21, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-019-2170-7>.

SANTOS, F. *et al.* By-products of the sugarcane industry. In: SANTOS, F. *et al.* (Ed.). **Sugarcane biorefinery, technology and perspectives**. Londres: Academic Press, 2020. p. 21-48. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814236-3.00002-0>.

SCHIRAWSKI, J.; PERLIN, M. Plant-microbe interaction 2017: the good, the bad and the diverse. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1374, p. 1-6, maio 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19051374>.



SOCCOL, C. R. *et al.* Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, jul. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.067>.

SOUZA, G. M. *et al.* Assembly of the 373k gene space of the polyploid sugarcane genome reveals reservoirs of functional diversity in the world's leading biomass crop. **GigaScience**, v. 8, n. 12, p. 1-18, nov. 2019. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz129>.

SOUZA, G. M.; VAN-SLUYS, M. A. Sugarcane genomics and biotechnology: state of the art, challenges and actions. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed.). **Sugarcane bioethanol: R&D for productivity and sustainability**. São Paulo: Edgard Blücher, 2014. p.325-332. <https://doi.org/10.5151/BlucherOA-Sugarcane>.

STACHNIUK, A.; FORMAL, E. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 1654-1665, jun. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-015-0342-0>.

SZKLARCZYK, D. *et al.* The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 1, p. 605-612, jan. 2021.

SUN, S. R. *et al.* Improved primers for the specific detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane using a conventional PCR assay. **Plant Disease**, v. 103, n. 12, p. 3251-3258, dez. 2019. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-12-18-2221-re>.

SUSNEA, I. *et al.* Application of MALDI-TOF-mass spectrometry to proteome analysis using stain-free gel electrophoresis. In: CAI, Z.; LIU, S. (Ed.). **Application of MALDI-TOF Spectroscopy**. Heidelberg: Springer, 2013. p. 37-54. [https://doi.org/10.1007/128\\_2012\\_321](https://doi.org/10.1007/128_2012_321).

TAN, B. C.; LIM, Y. S.; LAU, S. E. Proteomics in commercial crops: an overview. **Journal of Proteomics**, v. 169, p. 176-188, out. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.05.018>.

TAVARES, R. G. *et al.* ScGAI is a key regulator of culm development in sugarcane. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 16, p. 3823-3837, maio 2018. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ery180>.

TEAKLE, D. S.; SMITH, P. M.; STEINDL, D. R. L. Association of a small coryneform bacterium with the ratoon stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 24, n. 6, p. 869-874, jan. 1973. <http://dx.doi.org/10.1071/ar9730869>.

THIND, B. S. **Phytopathogenic Bacteria and Plant Diseases**. Boca Raton: CRC Press, 2020. 398 p. <https://doi.org/10.1201/9780429242786>.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. A holistic view on plant effector-triggered immunity presented as an iceberg model. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 7, p. 1-14, abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-020-03515-w>.

TIMP, W.; TIMP, G. Beyond mass spectrometry, the next step in proteomics. **Science Advances**, v. 6, n. 2, p. 8978-8993, jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.aax8978>.

TOKESHI, H.; RAGO, A. M. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H. et al (Ed.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2016. v. 2, p.185-196.

TSAI, Y. H. *et al.* Ionization sources and mass analyzers in MS imaging. **Bioanalysis**, v. 7, n. 20, p.2629-2637, out. 2015. <https://doi.org/10.4155/bio.15.187>.

TYANOVA, S. *et al.* The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature Methods**, v. 13, n. 9, p. 731-740, jun. 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3901>.

URASHIMA, A. S. *et al.* Incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em variedades de cana-de-açúcar a serem empregados para multiplicação no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 4, p. 322-328, dez. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-54052010000400007>.

URASHIMA, A. S.; GRACHET, N. G. Métodos de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e efeito da termoterapia na brotação das gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 1, p. 57-64, fev. 2012. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000100007>.

URASHIMA, A. S.; MARCHETTI, L. B. L. Incidence and severity of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infection of sugarcane in São Paulo state, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 161, n. 7-8, p. 478-484, fev. 2013. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12093>.

URASHIMA, A. S. *et al.* Prevalence and severity of ratoon stunt in commercial Brazilian sugarcane fields. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 815-821, maio 2017. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-07-16-1030-re>.

URASHIMA, A. S. *et al.* Temporal incidence of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane propagating materials of Brazilian cultivars. **Crop Protection**, v. 128, n. 104976, p. 1-7, fev. 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104976>.

VADIVEL, A. K. A. Gel-based proteomics in plants: time to move on from the tradition. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 369, p. 1-4, maio 2015. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00369>.

VILELA, M. M. *et al.* Analysis of three sugarcane homo/homeologous regions suggests independent polyploidization events of *Saccharum officinarum* and *Saccharum spontaneum*. **Genome Biology and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 266-278, fev. 2017. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw293>.

VISWANATHAN, R. Serodiagnosis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* causing ratoon stunting disease in sugarcane. In: RAO, G. P.; SAUMTALLY, A. S.; ROTT, P. (Eds.).

**Sugarcane Pathology: bacterial and nematode diseases.** Enfield: Science Publishers, 2004. v. 3, p. 153-173.

VISWANATHAN, R.; RAO, G. P. Disease scenario and management of major sugarcane diseases in India. **Sugar Tech**, v. 13, n. 4, p. 336-353, nov. 2011. <https://doi.org/10.1007/s12355-011-0102-4>.

WANG, D. *et al.* A class III WRKY transcription factor in sugarcane was involved in biotic and abiotic stress responses. **Scientific Reports**, v. 10, n. 20964, p. 1-15, dez. 2020. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-78007-9>.

WANG, J.; CHAI, J. Structural insights into the plant immune receptors PRRs and NLRs. **Plant Physiology**, v. 182, n. 4, p. 1566-1581, abr. 2020. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.19.01252>.

WANG, Y.; LOAKE, G. J.; CHU, C. Crosstalk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 314, p. 1-7, ago. 2013. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00314>.

WANG, Y. *et al.* Development of N,S-doped carbon dots as a novel matrix for the analysis of small molecules by negative ion MALDI-TOF MS. **RCS Advances**, v. 6, n. 82, p. 79043-79049, ago. 2016. <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra12131d>.

WASINGER, V. C. *et al.* Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, n. 1, p.1090-1094, jul. 1995. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.11501601185>.

WILKINS, M. R. *et al.* Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p.19-50, dez. 1996. <http://dx.doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>.

WU, Q. *et al.* A comparative study of three detection techniques for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, the causal pathogen of sugarcane ratoon stunting disease. **Biomed Research International**, v. 2018, n. 2786458, p. 1-11, maio 2018. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/2786458>.

YADAV, S. *et al.* Comparison and optimization of protein extraction and two-dimensional gel electrophoresis protocols for liverworts. **BMC Research Notes**, v. 13, n. 60, p. 1-7, fev. 2020. <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-020-4929-1>.

YAMAGUCHI, Y.; HUFFAKER, A. Endogenous peptide elicitors in higher plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 351-357, ago. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2011.05.001>.

YATES, J. R. Mass spectral analysis in proteomics. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 33, n. 1, p. 297-316, jun. 2004. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.33.111502.082538>.

YOUNG, A. J. *et al.* Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 503-511, set. 2006. <http://dx.doi.org/10.1071/ap06055>.

YOUNG, A. J. *et al.* Novel diagnostic method for ratoon stunting disease: development and implications for RSD management. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, v. 36, p. 237-243, abr. 2014.

YOUNG, A. J. *et al.* Efficient diagnosis of ratoon stunting disease of sugarcane by quantitative PCR on pooled leaf sheath biopsies. **Plant Disease**, v. 100, n. 12, p. 2492-2498, dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-06-16-0848-re>.

YOUNG, A. J. Possible origin of ratoon stunting disease following interspecific hybridization of *Saccharum* species. **Plant Pathology**, v. 65, n. 9, p. 1403-1410, maio 2016. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12545>.

YOUNG, A. J. Turning a blind eye to ratoon stunting disease of sugarcane in Australia. **Plant Disease**, v. 102, n. 3, p. 473-482, mar. 2018. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-06-17-0911-fe>.

YOUNG, A. J.; BRUMBLEY, S. M. Ratoon Stunting Disease of Sugarcane: history, management and new research. In: RAO, G. P.; SAUMTALLY, A. S.; ROTT, P. (Eds.). **Sugarcane Pathology: bacterial and nematode diseases**. Enfield: Science Publishers, 2004. v. 3, p. 97-124.

YOUNG, A. J.; NOCK, C. J. Molecular detection of diverse *Leifsonia* strains associated with sugarcane. **Plant Disease**, v. 101, n. 8, p. 1422-1431, ago. 2017. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-01-17-0016-re>.

ZAPALSKA-SOZONIUK, M. *et al.* Is it useful to use several “omics” for obtaining valuable results? **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 3, p. 3597-3606, abr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-019-04793-9>.

ZAVAGLIA, A. C. *et al.* No alternative hosts of the sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* were identified among grass and non-grass species using novel PCR primers. **Tropical Plant Pathology**, v. 41, n. 5, p. 336-339, out. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-016-0107-3>.

ZHANG, H. *et al.* *Arabidopsis* proteome and the mass spectral assay library. **Scientific Data**, v. 6, n. 278, p. 1-11, nov. 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41597-019-0294-0>.

ZHANG, J. *et al.* Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. **Nature Genetics**, v. 50, n. 11, p. 1565-1573, out. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0237-2>.

ZHANG, X. *et al.* Morphological and physiological responses of sugarcane to *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infection. **Plant Disease**, v. 100, n. 12, p. 2499-2506, dez. 2016a. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-10-15-1134-re>.

ZHANG, X. Q. *et al.* Influence of inoculation of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* on photosynthetic parameters and activities of defense enzymes in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 19, n. 4, p. 394-401, set. 2016b. <http://dx.doi.org/10.1007/s12355-016-0479-1>.

ZHANG, Y. *et al.* Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2343-2394, fev. 2013. <http://dx.doi.org/10.1021/cr3003533>.

ZHOU, J. R. *et al.* Quantitative proteomic analysis of the sugarcane defense responses incited by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causing red stripe. **Industrial Crops and Products**, v. 162, n. 113275, p. 1-11, abr. 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113275>.

ZHU, K. *et al.* A transcriptomic analysis of sugarcane response to *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* infection. **PLOS ONE**, v. 16, n. 2, p. e0245613, fev. 2021. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0245613>.

ZHU, K. *et al.* Functional analysis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* membrane protein gene *Lxx18460* (anti-sigma K). **BMC Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 1-12, jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-018-1378-2>.

ZHU, K. *et al.* The physiological characteristics and associated gene expression of sugar cane inoculated with *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 1, p. 44-52, jan. 2018. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12659>.

ZIPFEL, C. Plant pattern-recognition receptors. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 7, p.345-351, jul. 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>.

## APÊNDICE A - LC-MS/MS

As amostras de colmo de plantas não-inoculadas (controle) ou inoculadas com *Lxx* (estresse) foram provenientes de experimento com cana-de-açúcar variedade RB867515 realizado em casa de vegetação. As proteínas totais foram extraídas, em triplicata, utilizando o método com fenol descrito por Hurkman e Tanaka (1986), modificado por Boaretto (2012) e quantificadas pelo protocolo de Bradford (1976). Posteriormente, 40 µg de proteínas de cada amostra foram submetidas à eletroforese unidimensional em gel SDS-PAGE 12%, em seguida, as bandas foram manualmente excisadas e enviadas para análise proteômica na plataforma de espectrometria de massas RPT02H, no Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ-PR). Após a digestão com a enzima tripsina, os peptídeos foram dessalinizados em *stage-tips* C18 e submetidos à nano-cromatografia líquida de ultra eficiência (nUPLC) acoplada a MS/MS. Os dados gerados foram analisados pelos algoritmos MaxQuant (COX; MANN, 2008) e Perseus (TYANOVA *et al.*, 2016). As proteínas de cada tratamento foram categorizadas funcionalmente através do programa Blast2GO (GÖTZ *et al.*, 2008) e as redes de interações proteína-proteína obtidas com auxílio do software STRING utilizando alto índice de confiança (0,700) (SZKLARCZYK *et al.*, 2021).

Os resultados preliminares da análise por nUPLC-MS/MS revelaram um total de 623 proteínas presumivelmente identificadas nos colmos não-inoculados e inoculados com *Lxx*, destas 408 foram comuns aos tratamentos, enquanto 215 foram exclusivas. Entre as proteínas comuns, 195 foram inibidas e 213 induzidas em resposta à bactéria. Das 215 proteínas exclusivas, 108 foram verificadas apenas na condição controle e 107 no estresse. Os processos biológicos (BP) parciais associados às proteínas do hospedeiro foram distribuídos em 42 e 28 categorias, respectivamente, com aumento na frequência de ontologias relacionadas à infecção por *Lxx* referentes ao metabolismo celular, metabolismo primário, resposta ao estresse, localização, energia e respiração celular, além de transporte (Figura 1). A classificação prévia das proteínas por componente celular (CC), revelou um aumento nas categorias de complexo proteico, citosol, núcleo e mitocôndria, associado à infecção por *Lxx* corroborando com os dados apresentados na análise proteômica bidimensional (Figura 2). Os dados proteômicos obtidos até o momento confirmaram a associação de várias DAPs verificadas via 2DE com o patossistema

cana-de-açúcar x *Lxx*, tais como a fosfolipase D, glutationa S-transferase e endo- $\beta$ -1,3(4)-glucanase. Além disso, os resultados encontrados nas duas abordagens (2DE e nUPLC-MS/MS) são complementares permitindo um entendimento mais aprofundado dos mecanismos envolvidos na interação entre a cana-de-açúcar e *Lxx*.

Figura 1 - Ontologia gênica (GO) por processo biológico (BP) das proteínas caulinares de cana-de-açúcar não-inoculada (controle) e inoculada com *Lxx* (estresse) analisadas por nUPLC-MS/MS.

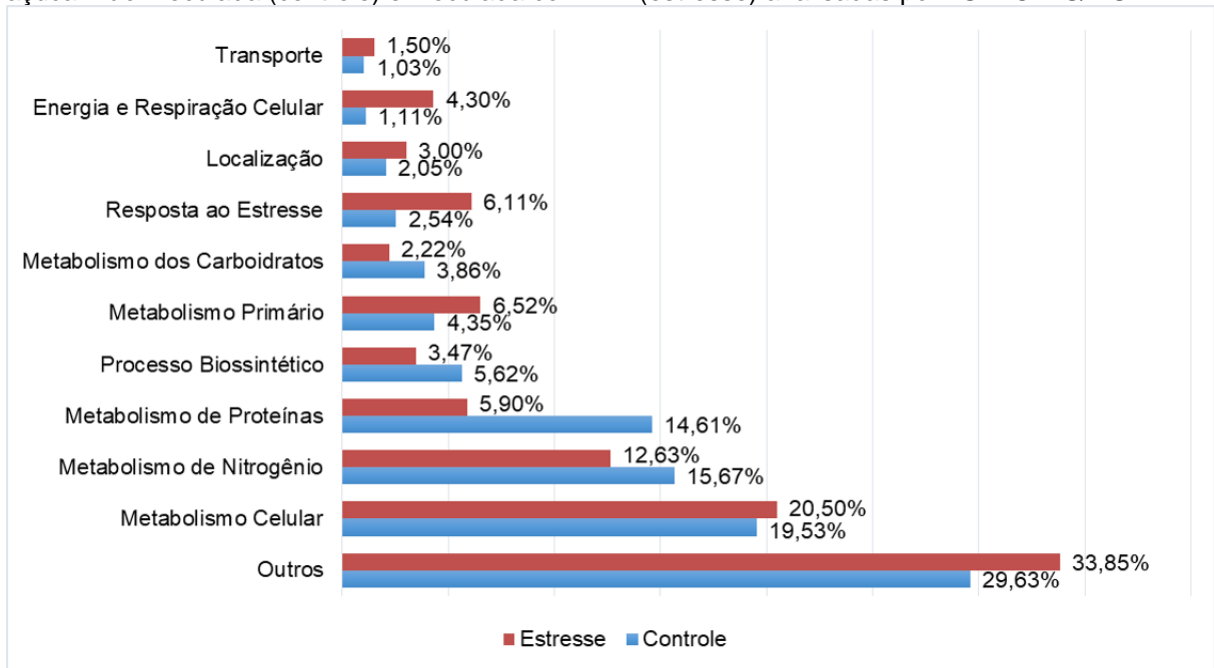


Figura 2 - Ontologia gênica (GO) por componente celular (CC) das proteínas caulinares de cana-de-açúcar não-inoculada (controle) e inoculada com *Lxx* (estresse) analisadas por nUPLC-MS/MS.

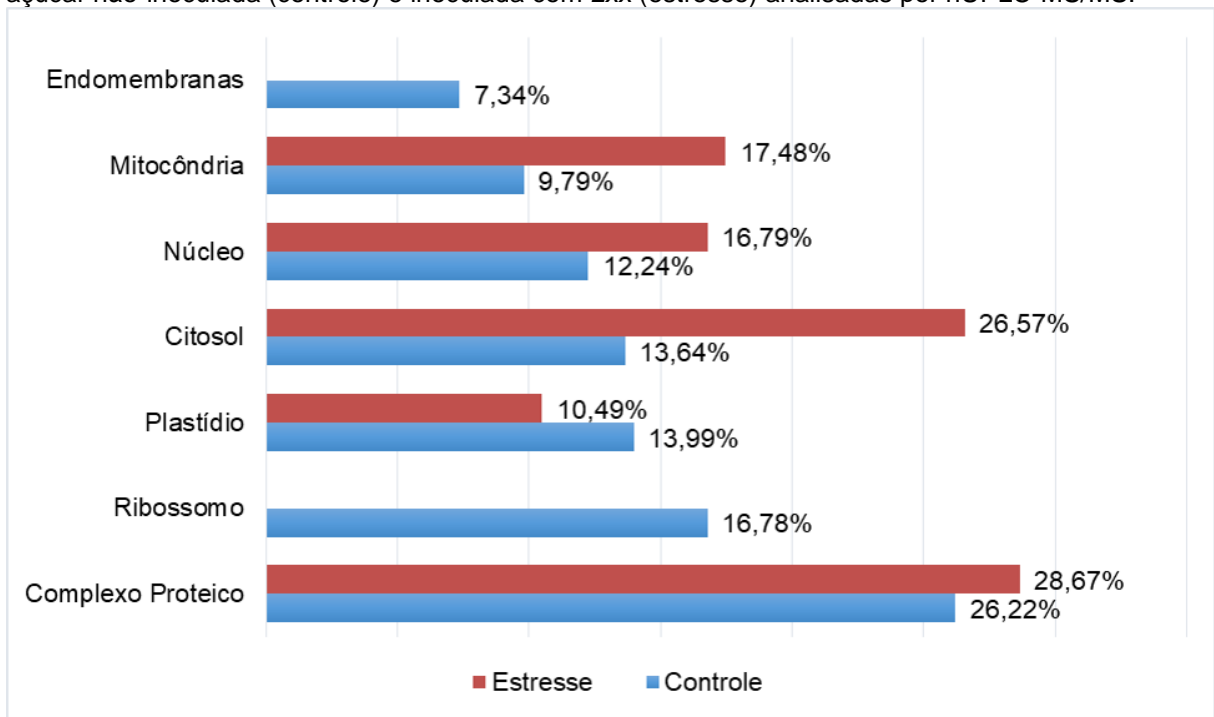


Figura 3 - Redes parciais das interações proteína-proteína de colmo da cana-de-açúcar (RB867515) não-inoculado (A) e inoculado com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (B).

