

**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética**

**Renata Rodrigues de Almeida**

Proteômica da interação planta-patógeno/simbionte em cana-  
de-açúcar (*Saccharum* spp.)

**Recife**  
**2015**

**Renata Rodrigues de Almeida**

**Proteômica da interação planta-patógeno/simbionte em  
cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética da Universidade Federal de  
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para  
obtenção do título de Doutor em Genética.

**Orientador:** Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

**Recife**

**2015**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Almeida, Renata Rodrigues de**  
**Proteômica da interação planta-patógeno/simbionte em cana-de-açúcar**  
**Saccharum spp.)/ Renata Rodrigues de Almeida – Recife: O Autor, 2015.**

**234 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Tercilio Calsa Junior**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2015.**

**Inclui bibliografia**

**1. Cana-de-açúcar 2. Carboidratos 3. Proteínas 4. Estresse biótico I.**  
**Calsa Junior, Tercilio (orientador) II. Título**

**681.35**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2015-154**

**Renata Rodrigues de Almeida**

**Proteômica da interação planta-patógeno/simbionte em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**

**Aprovada em 30/07/2015**

**Banca Examinadora:**

---

**Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Profa. Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Profa. Dra. Andrea Chaves**  
**Universidade Federal Rural de Pernambuco**

---

**Profa. Dra. Marcia Vanusa da Silva**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Profa. Dra. Maria Clara Pestana Calsa**  
**Faculdade Maurício de Nassau**

**Recife**  
**2015**

*Agradeço aos meus pais, Seu Bernardo e Dona Ivone, pela vida e por todos os caminhos que eles indicaram e, muitas vezes, abriram para que eu pudesse continuar. A eles minha total gratidão. Aos meus avós Joaquim e Maria Luiza (in memoriam) por me ensinarem os valores da vida. À tia Ilda minha eterna gratidão. Aos meus irmãos Fernanda e André meus grandes amigos.*

*Sem eles, não seria capaz de concluir esse trabalho e por isso,*

**DEDICO**

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus pela oportunidade de viver, pela força nos momentos difíceis.

Aos meus pais, irmãos, avós e a minha tia pelo incentivo, paciência e participação.

Ao orientador Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior, antes de tudo, pela sua amizade construída ao longo de 14 anos de convivência. O mais sincero agradecimento por estes anos de orientação, apoio, conselhos para meu desenvolvimento pessoal e profissional na pesquisa científica. Muito obrigada.

Aos nossos colaboradores da EECAC - UFRPE Profa. Dra. Andrea Chaves e o Técnico de Laboratório Walber Douglas pela realização do experimento em casa-de-vegetação e análises morfofisiológicas, CETENE – Central Analítica Dra Júlia Furtado Campos pela realização das análises de Espectrometria de Massas, RIDESA/EECAC (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro/Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina-UFRPE), Departamento de Fitopatologia e Nematologia-ESALQ/USP (Piracicaba-SP), CENA/USP (Centro de Energia Nuclear na Agricultura/ Universidade São Paulo) e ao Prof. Dr. Fábio César Gozzo do Laboratório de Espectrometria de Massas (UNICAMP) Universidade Estadual de Campinas, pela disponibilização do banco de dados.

BIOGENE – Senhor Emanuel Sérgio Coqueiro dos Santos pelo auxílio financeiro ao projeto. Muito obrigada.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Lilia Gomes Willadino pela gentileza em auxiliar a realização do experimento *in vitro* no Laboratório de Pesquisa Cultura de Tecidos Vegetais – (UFRPE). Muito obrigada.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Clara Pestana Calsa, por ser a grande amiga que é e sempre levarei no meu coração. Muito obrigada por fazer parte da minha vida.

Agradeço aos doutorandos Adauto Gomes Barbosa Neto (LGPP) e Taciana Conceição Manso (UFMG) pela participação vital deste trabalho. Muito obrigada.

Aos meus amigos do Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas – LGPP - Doutorandos: Amanda Emanuella Rocha de Souza, Marciana Bizerra de Moraes, Melquesedec de Sousa Oliveira, Paulo Geovani Silva Martins, Romel Vilela e à Dra Fabiana Aparecida Cavalcante Silva Mestrandos: Elton Nunes, Juliana Souza que nunca deixaram de acreditar na minha capacidade. Muito obrigada.

Aos egressos do LGPP – Doutoranda Cinthya Pacheco (UFRPE), Dr. João Dutra, Doutoranda Nayara De Lira (UNICAMP), Mestre Luiza Lima, Mestre Regina Folha e Mestre Raul Felipe, meu agradecimento pelas alegrias vividas nessa minha jornada.

Ao doutorando Túlio Diego da Silva – Laboratório de Biologia Molecular (UFPE) pela gentileza em auxiliar nas análises proteômicas. Muito Obrigada.

A técnica do LGPP – Celuza Castro dos Santos, pelos bate-papos, risadas e dasabafos durante todo esse tempo. Muito obrigada.

Aos amigos Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida e Dr. Adiles Paulo de Lima, pelo incentivo, atenção e auxílio sempre que precisei em todas as fases dessa caminhada. Muito Obrigada.

Ao amigo Nielton Araujo Souza, pelo incentivo e auxílio em algumas etapas do trabalho. Muito Obrigada FERA!!!!

Aos amigos Haroldo Roberto Coelho e Klayton Marcelino de Paula pela amizade conquistada nessa minha caminhada e que permanecerá para sempre.

Ao meu mais novo amigo Sávio Costa Guarino Torres, nossa amizade não foi e não é por acaso.

Aos meus amigos Piracicabanos, que me apoiaram e sempre estiveram presentes. Muito Obrigada.

Aos amigos que viveram junto comigo, me ouviram quando eu precisava falar, me fizeram rir quando eu precisava descansar, palavras são poucas para dizer quão importante cada um de vocês foram! **Alessandra, Ana Luisa, Karen, Geovana, Bruno, Dayanne, Carolina, Guilherme, Rafael, Ricardo e Levino**, pelo acolhimento (necessário) fundamental durante o ano que morei em Recife.

À família Ferreira, Dona Francisca, Miriam, Rômulo e Remo pela gentileza em me acolher durante os últimos meses do Doutorado. Vocês foram vitais na finalização desse trabalho. Muito Obrigada.

Ao meu amigo, companheiro Rômulo Alves Ferreira meu maior incentivador, pelo amor, apoio, compreensão e participação integral em todos os momentos. Obrigada por tudo!

A CAPES pelo fornecimento da bolsa de Doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética (UFPE).

A todos que um dia fizeram parte dessa equipe!

Muito Obrigada.

**“Quando todos te culpam....Deus te Elogia”**  
***Alan Bezerra***

## Resumo

A cana-de-açúcar tem papel relevante na economia brasileira, apesar de estar suscetível a fatores bióticos e abióticos que influenciam para redução de produtividade agrícola e industrial. Apesar de existirem organismos como agentes causais de doenças que contribuam com danos à cana-de-açúcar, micro-organismos simbiotes interagem com a cultura conferindo benefícios no processo, tais como a fixação de Nitrogênio. Dessa forma, a análise das proteínas envolvidas na resposta a fatores bióticos pode auxiliar no desenvolvimento de novas variedades. No presente trabalho, foi analisado o proteoma da interação da cana-de-açúcar com patógeno (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; Lxx) e/ou com o simbiote (*Gluconacetobacter diazotrophicus*; Gd) por 2-DE (Eletroforese bidimensional) seguida de MS (Espectrometria de massa). Os resultados da eletroforese bidimensional com a interação cana-de-açúcar/Gd mostraram que 173 *spots* foram diferencialmente expressos. A análise por espectrometria de massa identificou 65 proteínas. Tais proteínas foram principalmente associadas com produção de energia, componentes de fotossistemas e indução de resposta a estímulos ambientais. Na interação cana-de-açúcar/Lxx, em análise da eletroforese bidimensional, se observou 138 *spots* com expressão diferenciada. A análise por espectrometria de massa identificou 56 proteínas responsivas a estresses bióticos, defesa e metabolismo de carboidratos. Durante a interação simultânea com Gd e Lxx, o proteoma da cana-de-açúcar a análise da eletroforese bidimensional mostrou que 142 *spots* apresentaram nível de expressão alterada. A análise por espectrometria de massa identificou 30 proteínas associadas com metabolismo de carboidratos e defesa contra estresses bióticos. Os resultados obtidos compõem um conjunto de proteínas (e genes codificantes) com provável utilidade como marcadores funcionais auxiliares no melhoramento genético, na seleção de variedades com interação benéfica de crescimento/fixação biológica de nitrogênio com Gd, e/ou maior resistência à patogenicidade de Lxx.

**Palavras-chave:** Espectrometria de Massas; *Gluconacetobacter diazotrophicus*; *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; Estresse biótico; Fixação de Nitrogênio.

## Abstract

The sugarcane has an important role in the Brazilian economy, despite its susceptibility to biotic and abiotic factors that decrease agricultural and industrial productivity. Although there are parasitic organisms that contribute to damage sugarcane, symbiotic microorganisms interact with the culture, providing benefits in the process, such as nitrogen fixation. Thus, the analysis of proteins involved in the response to biotic factors may assist the developing new sugarcane varieties. In this study, we analyzed the proteome of the interaction of sugarcane with pathogen (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; Lxx) and / or symbiont (*Gluconacetobacter diazotrophicus*; Gd) by 2-DE (Two-dimensional electrophoresis) followed by MS (Mass Spectrometry). The results of two-dimensional electrophoresis with sugarcane / Gd interaction showed that 173 spots showed altered expression level. Analysis by mass spectrometry identified 65 proteins. These differentially expressed proteins were primarily associated with energy production, and induction components photosystems response to environmental stimuli. Since the sugarcane interaction / Lxx the analysis of two-dimensional electrophoresis demonstrated that 138 spots showed altered expression level. The analysis by mass spectrometry identified 56 proteins responsive to biotic stresses, defense and carbohydrate metabolism. During simultaneous interaction with Gd and Lxx, the proteome analysis of sugarcane showed that 142 spots with altered expression level. Analysis by mass spectrometry identified 30 proteins associated with carbohydrate metabolism and protection against biotic stresses. The results obtained in this work comprise a set proteins (and encoding genes) with probable utility as auxiliary functional markers in plant breeding, in the selection of varieties with beneficial interaction for growth/biological nitrogen fixation with Gd, and/or increased resistance to pathogenic Lxx.

**Keywords:** Mass Spectrometry; *Gluconacetobacter diazotrophicus*; *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; Biotic stress; Nitrogen Fixation.

## Lista de Ilustrações

### Revisão Bibliográfica

- Figura 1.** Mapa de distribuição geográfica das áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Brasil. ....24
- Figura 2.** Mecanismo de indução de resistência em plantas frente ao ataque de patógenos.....28
- Figura 3.** Comparação esquemática de duas formas de indução de resistência em plantas. Resistência Sistêmica Adquirida (A), Resistência Sistêmica Induzida (B). Ambas levam a respostas fenotípicas semelhantes.....29
- Figura 4.** Sintomas da cana-de-açúcar contaminada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). (A) Corte dos vasos do xilema de uma planta saudável. (B) Corte dos vasos do xilema de uma planta infectada por Lxx. A seta preta indica os vasos do xilema ocupados pela Lxx. (C) Comparação entre duas plantas em campo evidenciando a diferença de tamanho entre uma planta saudável (planta mais alta) de uma planta infectada por Lxx (planta menor, indicada pela seta vermelha).....33
- Figura 5.** *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em solução aquosa de ácido fosfotúngstico 1%, aumento de 30.000 x em microscopia eletrônica.. ....35
- Figura 6.** Micrografia da bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus*.....39
- Figura 7.** Células do colmo da cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Corte de uma planta com cinco meses crescendo em meio pobre em nitrogênio. (A) Corte das células parenquimatosas armazenadoras de sacarose localizadas próximas do córtex. (B) Corte do tecido vascular, elemento traqueídeo (ponto vermelho), rodeado pelas células do parênquima (pontos amarelos). O círculo branco mostra as bactérias em ambos os cortes (A e B).. ....39
- Figura 8.** Possíveis locais de colonização de endófitos diazotróficos na raiz do hospedeiro.....40

### Capítulo I

- Figura 1.** Montagem do experimento *in vivo* em casa de vegetação, mostrando o tratamento térmico dos colmos de cana-de-açúcar (A). Inoculação dos colmos com a bactéria *G. diazotrophicus* (Gd) (B). Colmos inoculados colocados para brotação em bandejas (C). Plantas já desenvolvida após dois meses de transplântio (D). ....60
- Figura 2.** Fluxograma da análise de identificação dos DEPs/MS (Proteínas diferencialmente expressas/Espectrometria de massa); PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*); MS/MS (Espectrometria de massa em *Tandem*). A base de dados de plantas refere-se sequencialmente ao banco de dados de cana-de-açúcar (Saccharum\_7061, Laboratório MS Dalton - <http://daltonlab.iqm.unicamp.br>, IQ-Unicamp) e Viridiplantae/Swissprot. A base de dados de Gd refere-se sequencialmente ao banco de dados de *G. diazotrophicus* (Gd\_proteome,

Laboratório MS Dalton - <http://daltonlab.iqm.unicamp.br> , IQ-Unicamp) e Proteobacteria/Swissprot.....69

**Figura 3.** Quantificação relativa por PCR em tempo real (qPCR) das amostras de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GD) em relação ao controle de plantas não inoculadas (C). .....71

**Figura 4.** SDS-PAGE de proteínas solúveis totais de amostras de folha de cana-de-açúcar não inoculadas (C) e inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd). Marcador de alto peso molecular (MM), em KDa.....73

**Figura 5.** Imagens de géis 2D-PAGE com localização de *spots* utilizando extrato de proteínas totais de folha da variedade RB867515. A) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar não inoculadas (Controle), B) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd).....74

**Figura 6.** Imagens de 2D-PAGE digitalizadas e após determinação de *spots* comuns (verdes) e exclusivos (vermelhos) em análise no programa ImageMaster Platinum 7.05. A, B e C: 2D-PAGE de amostras não inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus*; D, E e F: 2D-PAGE de amostras inoculadas com Gd. ....76

**Figura 7.** Diagrama de Venn representando as anotações de *spots* diferencialmente expressos na folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 nos tratamentos controle (não inoculado, A) ou inoculado com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (B), e identificados como proteínas da planta hospedeira. As quatro anotações comuns no diagrama (C) referem-se às mesmas anotações para *spots* diferentes (proteínas Q6ENV5, J9QE65, Q6ENV6, P0C1M0). Os conjuntos A, B e C correspondem às identificações na Tabela 5.....79

**Figura 8.** Categorização da ontologia gênica das *DEPs* de cana-de-açúcar expressas sob inoculação com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) e não inoculado (C). CxGd\_C (controle x *Gluconacetobacter diazotrophicus* plantas controle), CxGd\_G (controle x *G.diazotrophicus* plantas inoculadas). Os números ligados aos setores do gráfico são identificadores das categorias raiz de processo biológico, também representados nos respectivos quadros; nestes, é indicada a frequência (%) de cada processo biológico conforme o número de termos de GO, encontrado para cada conjunto de *DEPs*, de cada tratamento. Categoria *OPP* (*Oxidative pentose phosphate pathway*). .....88

**Figura 9.** Distribuição dos *DEPs* de acordo com as categorias funcionais de cana-de-açúcar expressos sob inoculação com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) e não inoculados (C). .....89

**Figura 10.** Modelo esquemático dos processos de regulação protéica foliar em plantas de cana-de-açúcar associados à *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd). Proteínas em verde mais abundante nas plantas controle e proteínas em vermelho mais abundante nas plantas inoculadas com a bactéria. ....106

## Capítulo II

**Figura 1.** Montagem do experimento *in vivo* em casa de vegetação, mostrando o tratamento térmico dos colmos de cana-de-açúcar. (A) Inoculação dos colmos com a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). (B) Colmos inoculados colocados para brotação em bandejas. (C) Plantas já desenvolvida após dois meses de transplante (D). .....122

**Figura 2.** Fluxograma da análise de identificação dos DEPs/MS (Proteínas diferencialmente expressas/Espectrometria de massas); PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*); MS/MS (Espectrometria de massas em *Tandem*) A base de dados de plantas refere-se sequencialmente ao banco de dados de cana-de-açúcar (*Saccharum\_7061*, Laboratório MS Dalton - <http://daltonlab.iqm.unicamp.br> , IQ-Unicamp) e Viridiplantae/Swissprot. A base de dados de Lxx refere-se sequencialmente ao banco de dados de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx\_proteome, Laboratório MS Dalton - <http://daltonlab.iqm.unicamp.br> , IQ-Unicamp) e Actinobacteria/Swissprot. ....130

**Figura 3.** Quantificação Relativa por PCR em tempo real das amostras de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) em relação ao controle (C).....132

**Figura 4.** SDS-PAGE com proteínas totais de amostras de folha de cana-de-açúcar não inoculadas (C) e inoculadas com a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). Marcador molecular de alto peso (MM), em KDa. ....134

**Figura 5.** Imagens de géis 2D-PAGE utilizando extrato de proteínas totais de folha. A) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar não inoculado (Controle). B) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). .....135

**Figura 6.** Imagens de 2D-PAGE digitalizadas e após determinação de spots comuns (verdes) e exclusivos (vermelhos) em análise no programa ImageMaster Platinum 7.05. A, B e C: 2D-PAGE de amostras não inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx); D, E e F: 2D-PAGE de amostras inoculadas com Lxx. ....137

**Figura 7.** Diagrama de Venn representando as anotações de *spots* diferencialmente expressos na folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 nos tratamentos controle (não inoculado, A) ou inoculado com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (B), e identificados como proteínas da planta hospedeira. As duas anotações comuns no diagrama (C) referem-se à mesmas anotações para *spots* diferentes (proteínas Q40677, Q8H1X3). Os conjuntos A, B e C correspondem às identificações na Tabela 5. ....140

**Figura 8.** Categorização da ontologia gênica das *DEPs* de cana-de-açúcar expressas sob inoculação com a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e não inoculado. CxLxx\_C (controle x *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* plantas controle), CxLxx\_L (controle x *L. xyli* subsp. *xyli* plantas inoculadas). Os números ligados aos setores do gráfico são identificadores das categorias raiz de processo biológico, também representados nos respectivos quadros; nestes, é indicada a frequência (%) de cada processo biológico conforme o número de termos de GO encontrados para cada conjunto de DEPs, de cada tratamento. ....147

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 9.</b> Distribuição dos DEPs de acordo com as categorias funcionais de cana-de-açúcar expressos sob inoculação com a bactéria <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx) e não inoculado (C). .....                                                                                                  | 148 |
| <b>Figura 10.</b> Modelo Esquemático dos processos de regulação protéica foliar em plantas de cana-de-açúcar associados à <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx). Proteínas em verde mais abundante nas plantas controle e proteínas em vermelho mais abundante nas plantas inoculadas com a bactéria..... | 166 |

### Capítulo III

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 1.</b> Montagem do experimento <i>in vivo</i> em casa de vegetação, mostrando o tratamento térmico dos colmos de cana-de-açúcar. (A) Inoculação dos colmos com as bactérias <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (Gd) e <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx). (B) Colmos inoculados colocados para brotação em bandejas (C). Plantas já desenvolvidas após dois meses de transplantio (D). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 181 |
| <b>Figura 2.</b> Fluxograma da análise de identificação dos DEPs/MS (proteínas diferencialmente expressas/ Espectrometria de massa); PMF ( <i>Peptide mass Fingerprinting</i> ); MS/MS (Espectrometria de massas em <i>Tandem</i> ). A base de dados de plantas refere-se sequencialmente ao banco de dados de cana-de-açúcar (Saccharum_7061, Laboratório MS Dalton - <a href="http://daltonlab.iqm.unicamp.br">http://daltonlab.iqm.unicamp.br</a> , IQ-Unicamp) e Viridiplantae/Swissprot. A base de dados de Lxx e Gd refere-se sequencialmente ao banco de dados de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> e <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (Lxx_proteome, Gd_proteome Laboratório MS Dalton - <a href="http://daltonlab.iqm.unicamp.br">http://daltonlab.iqm.unicamp.br</a> , IQ-Unicamp) e Proteobacteria/Actinobacteria/Swissprot. M refere-se à inoculação mista de Lxx e Gd. .... | 190 |
| <b>Figura 3.</b> Quantificação relativa por PCR em tempo real das amostras de cana-de-açúcar inoculadas com ambas as bactérias <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx) e <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (Gd) em relação ao controle (C). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 192 |
| <b>Figura 4.</b> SDS-PAGE com proteínas totais de amostras de folha de cana-de-açúcar inoculadas com as bactérias <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> e <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (M) e não inoculadas (C). Marcador molecular de alto peso (MM)..                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 194 |
| <b>Figura 5.</b> Imagens de géis 2D-PAGE utilizando extrato de proteínas totais de folha. A) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar não inoculado (Controle), B) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> e <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 195 |
| <b>Figura 6.</b> Imagens de 2D-PAGE digitalizadas e após determinação de spots comuns e exclusivos em análise no programa ImageMaster Platinum 7.05. A, B e C: 2D-PAGE de amostras não inoculadas com Lxx+Gd; D, E e F: 2D-PAGE de amostras inoculadas com Lxx+Gd. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 197 |
| <b>Figura 7.</b> Diagrama de Venn representando as anotações de <i>spots</i> diferencialmente expressos na folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 nos tratamentos controle (não inoculado, A) ou inoculado com Lxx+Gd (B), e identificados como                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |

proteínas da planta hospedeira. As duas anotações comuns no diagrama (C) referem-se à mesmas anotações para *spots* diferentes (proteínas K4FC67, S4WDN5). Os conjuntos A, B e C correspondem às identificações na Tabela 5. ...200

**Figura 8.** Categorização da ontologia gênica das *DEPs* de cana-de-açúcar expressas sob inoculação com as bactérias Lxx+Gd (M) e não inoculado (C). CxM\_C (controle x Lxx+Gd plantas controle), CxM\_M (controle x Lxx+Gd plantas inoculadas). Os números ligados aos setores do gráfico são identificadores das categorias raiz de processo biológico, também representados nos respectivos quadros; nestes, é indicada a frequência (%) de cada processo biológico conforme o número de termos de GO encontrados para cada conjunto de *DEPs*, de cada tratamento. ....207

**Figura 9.** Distribuição dos *DEPs* de acordo com as categorias funcionais de cana-de-açúcar expressos sob inoculação com as bactérias Lxx+Gd (M) e não inoculado (C). ....208

**Figura 10.** Modelo Esquemático dos processos de regulação protéica foliar em plantas de cana-de-açúcar associados à *Leifsonia xyli* subsp *xyli* (Lxx) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd). Proteínas em verde mais abundante nas plantas controle e proteínas em vermelho mais abundante nas plantas inoculadas Lxx/Gd. ....217

## Discussão Geral

**Figura 1.** Distribuição dos *DEPs* de acordo com a razão entre a frequência das categorias de ontologia gênica de cana-de-açúcar expressos sob inoculação com as bactérias *Leifsonia xyli* subsp *xyli*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e Mista (Gd+Lxx) e a respectiva frequência no tratamento controle (não inoculado, C). Escala logarítmica indicando inibição (<1) ou indução (>1) relativas. ....223

**Figura 2.** *Heat Map* do padrão de expressão das *DEPs* identificadas nos tratamentos em relação à abundância média no controle (não inoculado). ....224

## Lista de Tabelas

### Capítulo I

- Tabela 1.** Médias das variáveis morfométricas de cana-de-açúcar aos 120 dias após inoculação ou não com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd). Valores acompanhados pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).....72
- Tabela 2.** Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol  $\geq 1,5$  para cada tratamento controle (não inoculado) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (inoculado).....77
- Tabela 3.** Tabela de eficiência da análise em espectrometria de massas para os DEPs selecionados para identificação. ....78
- Tabela 4.** Distribuição da identificação obtida para as DEPs selecionadas, conforme táxon de maior similaridade pela análise no programa Mascot. ....80
- Tabela 5.** Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE. ....81
- Tabela 6.** Anotação presumível das DEPs de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e outras proteobactérias, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado (Gd) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE. ....85
- Tabela 7.** Tabela descritiva das DEPs sem anotação presumível ou similaridade encontrada por identificação via PMF/MS/MS/Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) observados na 2D-PAGE. ....86
- Tabela 8.** Teste de super-representação no enriquecimento de termos de ontologia gênica para processo biológico via ortologia com *A. thaliana*, com uso do programa Panther.....90

## Capítulo II

- Tabela 1.** Médias dos parâmetros morfométricos de cana-de-açúcar aos 120 dias após inoculação ou não com Lxx. Valores acompanhados pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ...133
- Tabela 2.** Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol  $\geq 1,5$  para cada tratamento controle (não inoculado) e Lxx (inoculado). .....138
- Tabela 3.** Tabela de eficiência da análise em espectrometria de massas para as DEPs selecionadas para identificação. ....139
- Tabela 4.** Distribuição da identificação obtida para as DEPs selecionadas, conforme táxon de maior similaridade pela análise no programa Mascot. ....141
- Tabela 5.** Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE. ....142
- Tabela 6.** Anotação presumível das DEPs de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado (Lxx) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE. ....145
- Tabela 7.** Tabela descritiva das DEPs sem anotação presumível ou similaridade encontrada por identificação via PMF/MS/MS/Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado (Lxx) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) observados na 2D-PAGE. ....146
- Tabela 8.** Teste de super-representação no enriquecimento de termos de ontologia gênica para processo biológico via ortologia com *A. thaliana*, com uso do programa Panther. ....149

### Capítulo III

**Tabela 1.** Médias dos parâmetros morfométricos de cana-de-açúcar aos 120 dias após inoculação ou não com Lxx+Gd. . Valores acompanhados pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ...193

**Tabela 2.** Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol  $\geq 1,5$  para cada tratamento controle (não inoculado) e Lxx+Gd (inoculado). .....198

**Tabela 3.** Tabela de eficiência da análise em espectrometria de massas para as DEPs selecionadas para identificação. ....199

**Tabela 4.** Distribuição da identificação obtida para as DEPs selecionadas, conforme táxon de maior similaridade pela análise no programa Mascot. ....201

**Tabela 5.** Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do spot no tratamento inoculado (Lxx+Gd) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor  $p$  calculado para significância estatística da diferença na %vol do spot entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada spot são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE. ....202

**Tabela 6.** Anotação presumível das DEPs de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* ou *Gluconacetobacter diazotrophicus*, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do spot no tratamento inoculado (Lxx+Gd) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor  $p$  calculado para significância estatística da diferença na %vol do spot entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada spot são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE. ....205

**Tabela 7.** Tabela descritiva das DEPs sem anotação presumível ou similaridade encontrada por identificação via PMF/MS/MS/Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do spot no tratamento inoculado (Lxx+Gd) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor  $p$  calculado para significância estatística da diferença na %vol do spot entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada spot são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) observados na 2D-PAGE. ....206

**Tabela 8.** Teste de super-representação no enriquecimento de termos de ontologia gênica para processo biológico via ortologia com *A. thaliana*, com uso do programa Panther. ....209

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

| Item    | Definição                                                                                       |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| cDNA    | Ácido Desoxirribonucleico complementar                                                          |
| CONAB   | Companhia Nacional de Abastecimento                                                             |
| Ct      | Ciclo de detecção ( <i>threshold</i> )                                                          |
| CTC     | Centro de Tecnologia Canavieira                                                                 |
| DNA     | Ácido Desoxirribonucleico                                                                       |
| FAO     | <i>Food and Agricultural Organization of the United Nations</i>                                 |
| FAOSTAT | <i>Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database</i>                         |
| FAPESP  | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo                                            |
| FBN     | Fixação Biológica de Nitrogênio                                                                 |
| Gd      | <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>                                                         |
| HR      | <i>Hypersensitive Response</i> (Resposta hipersensitiva)                                        |
| ISR     | <i>Induced Systemic Resistance</i> (Resistência Sistêmica Induzida)                             |
| ITS     | <i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaçador transcrito interno)                               |
| Lxc     | <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>cynodontis</i>                                                  |
| Lxx     | <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>Xyli</i>                                                        |
| MAMPs   | <i>Microbe-Associated Molecular Patterns</i> (Padrões moleculares associados a microorganismos) |
| MS      | Espectrometria de Massas                                                                        |
| PAMPs   | <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> (Padrões moleculares associados a patógenos)      |
| PCR     | Reação em cadeia da polimerase                                                                  |
| PMF     | <i>Peptide Mass Fingerprinting</i> (Identificação por padrão de massas de peptídeos)            |

|        |                                                                                |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------|
| RIDESA | Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro        |
| RNA    | Ácido Ribonucleico                                                             |
| rRNA   | RNA ribossomal                                                                 |
| RSD    | <i>Ratoon Stunting Disease</i> (Raquitismo de soqueira)                        |
| SAGE   | <i>Serial Analysis of Gene Expression</i> (Análise Serial da Expressão Gênica) |
| SAR    | <i>Systemic Acquired Resistance</i> (Resistência Sistêmica Adquirida)          |
| TB-EIA | <i>Tissue blot enzyme immunoassay</i> (Imunoensaio enzimático)                 |
| tRNA   | RNA transportador                                                              |

## Sumário

|                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Introdução .....                                         | 21  |
| 2. Revisão da Literatura .....                              | 23  |
| 2.1 A CANA-DE AÇÚCAR: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA .....           | 23  |
| 2.2 ESTRESSES BIÓTICOS .....                                | 26  |
| 2.2.1 Defesa de plantas .....                               | 28  |
| 2.3 DOENÇAS DA CANA-DE-AÇÚCAR: RAQUITISMO DA SOQUEIRA ..... | 32  |
| 2.3.1 <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (Lxx) .....  | 34  |
| 2.3.2 Diagnose .....                                        | 36  |
| 2.4 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CANA-DE-AÇÚCAR ..... | 37  |
| 2.4.1 Bactérias diazotróficas .....                         | 37  |
| 2.4.2 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....         | 38  |
| 2.5 PROTEÔMICA.....                                         | 44  |
| 2.5.1 Eletroforese bidimensional .....                      | 45  |
| 2.5.2 Espectrometria de massas.....                         | 47  |
| 2.5.3 Proteômica da interação planta-microrganismo .....    | 48  |
| 3. Objetivos .....                                          | 51  |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....                                    | 51  |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                              | 51  |
| 4. Capítulo I .....                                         | 52  |
| 5. Capítulo II .....                                        | 114 |
| 6. Capítulo III .....                                       | 173 |
| 7. Discussão Geral .....                                    | 222 |
| 8. Conclusões Gerais .....                                  | 225 |
| 9. Referências Bibliográficas .....                         | 226 |
| 9. Curriculum vitae ( <i>Lattes</i> ) .....                 | 233 |

## 1. Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, cultivando pouco mais de 9 milhões de hectares para obtenção de biomassa a partir da qual é extraída sacarose utilizada para produção de, principalmente, açúcar, etanol e biodiesel além de diversos subprodutos tais como cachaça, melaço, dióxido de carbono, bioeletricidade e bioplástico. A participação dos produtos e subprodutos da cana-de-açúcar na economia nacional tem sido acompanhada de novas frentes de desenvolvimento tecnológico para diversos setores da cadeia agroindustrial.

A necessidade de aumentar a produtividade do cultivo da cana-de-açúcar no Brasil representa um grande desafio principalmente para os programas de melhoramento genético, já que, para atender o mercado é imprescindível a obtenção de variedades mais produtivas e resistentes a doenças que as atuais disponíveis atualmente, apesar do *pool* gênico restrito no complexo *Saccharum*.

A cana-de-açúcar possui vários patógenos que vão influenciar na produção, entre eles os fungos: *Sporisorium scitamineum* – agente causal do carvão e a *Puccinia kuehnii* - ferrugem alaranjada; o vírus SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) – causador do mosaico; as bactérias *Xanthomonas albilineans*, que causa a escaldadura das folhas e a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, o raquitismo da soqueira. Esta bactéria coloniza os vasos do xilema da planta, causando obstrução física ao fluxo de seiva e provavelmente liberando toxinas.

Associações de planta com micro-organismos endofíticos como, por exemplo, gêneros frequentemente encontrados associados à cultura da cana-de-açúcar como *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* podem beneficiar várias culturas. Na maioria dos casos essas relações são simbióticas e mutualísticas, onde os micro-organismos endofíticos recebem nutrientes e proteção

do hospedeiro e propiciam resistência deste a vários patógenos, através da produção de antibióticos ou colonização de nicho ecológico igual ao dos fitopatógenos, além de auxiliar no crescimento/desenvolvimento vegetal e adaptação a condições adversas.

Seja pela interação com um patógeno ou simbiote, percebeu-se a capacidade das plantas em alterar o perfil de expressão gênica, combinando mecanismos de defesa constitutivos que, quando induzidos, desencadeiam respostas de hipersensibilidade para limitar o crescimento do patógeno. Estudos da expressão gênica por técnicas como microarranjos de cDNA, Análise Seriada da Expressão Gênica (SAGE, do inglês *Serial Analysis of Gene Expression*) e de sequenciamento em larga escala, fornecem um perfil molecular e revelam oportunidades para identificação das alterações que ocorrem a nível de RNA. Porém, a análise dos transcritos é prejudicada pela susceptibilidade à degradação e falta de concordância entre sua concentração e a de proteína traduzida.

Como as proteínas são os efetores diretos da resposta ao estresse e por estarem próximas da resposta fenotípica, é importante conhecer o conjunto de proteínas expresso, definido como proteoma. Em geral, a análise proteômica de cana-de-açúcar é baseada no estresse abiótico, como seca, salinidade e oxidativo. Poucos estudos abordaram a interação planta-patógeno/simbiote a nível proteômico. As pesquisas nessa área permitem encontrar proteínas que servem de marcadores moleculares funcionais, sob interação com patógenos e simbiotes, auxiliando o melhoramento genético e contribuindo para o manejo da cultura.

Este trabalho objetivou analisar o proteoma da cana-de-açúcar, quando inoculadas com as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* (simbiossistema) ou *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (patossistema), de forma a contribuir para o entendimento

das vias metabólicas ativadas na planta durante a interação, auxiliando o melhoramento genético da cana-de-açúcar.

## **2. Revisão da Literatura**

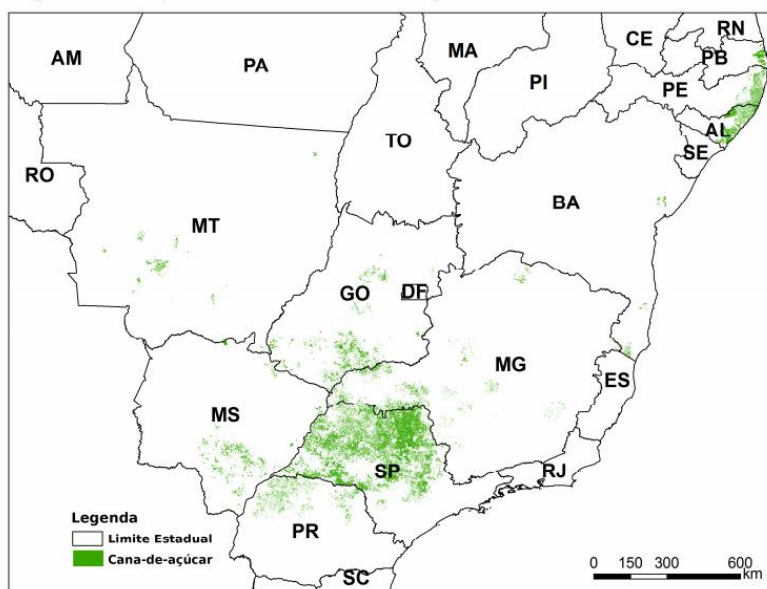
### **2.1 A CANA-DE AÇÚCAR: IMPORTÂNCIA ECONÔMICA**

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) pertence à família Poaceae e teve sua origem no Sudeste asiático (Daniels e Roach 1987). Esta cultura sofreu ao longo da história várias modificações originando híbridos e variedades que hoje dificultam a taxonomia do grupo a que pertence (Amalraj e Balasundaram, 2006).

Importante cultura agrícola, a cana-de-açúcar é cultivada em mais de 127 países e, de acordo com os dados da *Food and Agricultural Organization of the United Nations* (Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas; FAO, 2013) está entre as mais cultivadas no mundo. A crescente busca por combustíveis menos poluentes e de origem renovável transformou o mercado de cana-de-açúcar em um dos mais promissores do agronegócio mundial, favorecendo a expansão do setor canavieiro. A partir da cultura da cana-de-açúcar, é possível obter diversos subprodutos da produção do açúcar, como o melaço. Há também o aproveitamento do bagaço e da palha para produção da bioeletricidade (UNICA, 2011), a qual é utilizada para abastecer a própria usina ou mesmo a rede elétrica. Além disso, há a produção de dióxido de carbono que atende a atual demanda da indústria de bebidas, e a recente exploração de bioplástico, o qual tem

sido usado para a fabricação de vasos, colheres e sacolas plásticas (Telles *et al.*, 2011).

Embora, grande produtor de açúcar desde o final do século XVI, o Brasil expandiu significativamente a cultura da cana-de-açúcar, a partir da década de 1970. Criado pelo governo brasileiro em 1975, o programa PROÁLCOOL teve como propósito inicial deixar o Brasil menos dependente do petróleo, proporcionando enormes ganhos econômicos, ambientais e tecnológicos através da produção do etanol combustível (Rodrigues, 2010). Atualmente, o Brasil lidera a produção mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia e China (FAOSTAT, 2012). Segundo estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção nacional para a safra 2013/2014 foi de 659 milhões de toneladas, ocupando uma área total de 9 milhões de hectares distribuídas em todos os Estados produtores (Figura 1) (CONAB, 2015).



**Figura 1.** Mapa de distribuição geográfica das áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Brasil (CONAB, 2015).

A produção total de cana-de-açúcar na safra 2014/15 foi de 634,8 milhões de toneladas, 3,7% menor que a da safra 2013/14. A produção na Região Centro-

Sul foi de 575,4 milhões de toneladas, apresentando redução de 4,4% em relação à safra anterior. Já na Região Norte/Nordeste houve aumento de 4,7% na produção de cana-de-açúcar, chegando a 59,4 milhões de toneladas na safra 2014/15. Os principais estados produtores de cana-de-açúcar incluem São Paulo (53,8%), Goiás (10,4%), Minas Gerais (9,4%), Paraná (6,8%), Mato Grosso do Sul (6,8%), Alagoas (3,5%) e Pernambuco (2,3%) (CONAB, 2015).

A cana-de-açúcar está exposta a fatores bióticos e abióticos que podem influenciar negativamente sua produtividade causando grandes impactos no mercado nacional e internacional. (Carneiro Jr. *et al.*, 2006; Marin, 2007). Devido à importância desta cultura, o Brasil tem investido cada vez mais no desenvolvimento de novas variedades através do melhoramento genético em diversos programas de instituições públicas, dentre as quais se destaca a RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro), CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), IAC (Instituto Agrônomo de Campinas) entre outros e também de empresas privadas, tais como a Monsanto, com o objetivo de desenvolver variedades mais ricas, produtivas, adaptadas às diversas condições edafoclimáticas e resistentes a pragas e doenças.

Neste contexto, o estudo da diversidade microbiana associada à planta apresenta-se como importante alternativa para melhorar suas características de desempenho agrônomo e produtividade (Luvizotto, 2008). Com isso, podem ser identificadas e obtidas através de melhoramento genético variedades melhor adaptadas à interação com microrganismos benéficos, as quais podem apresentar maior tolerância a fatores de estresse e contribuir para impulsionar a produtividade canavieira nas diversas regiões produtoras.

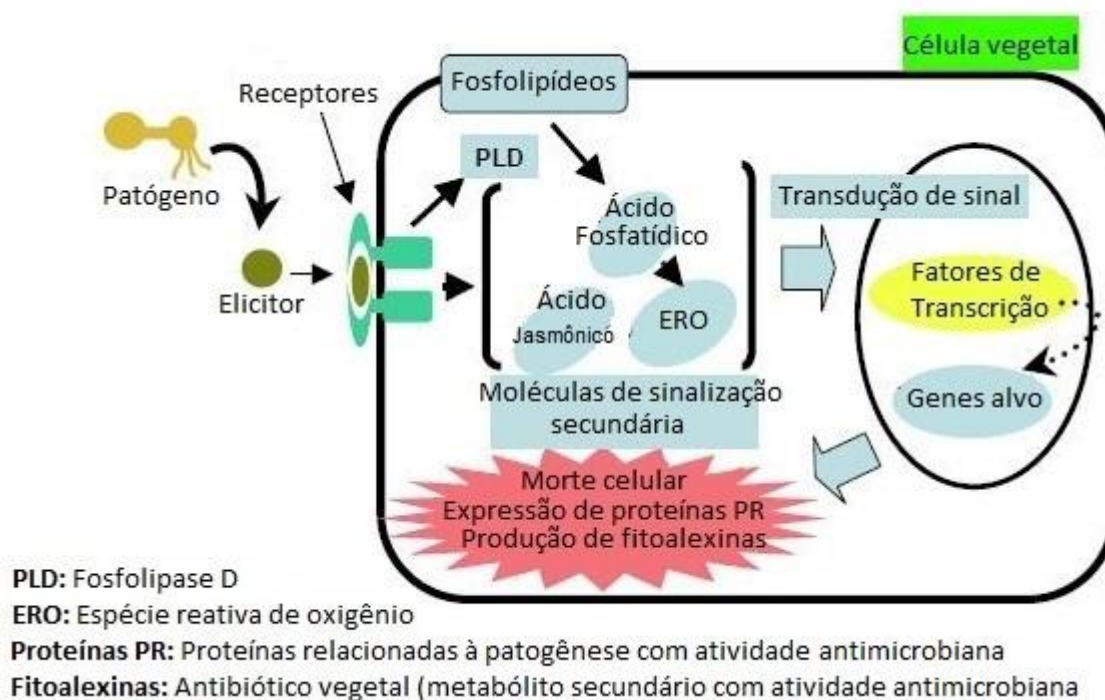
A proximidade entre a sustentabilidade e a produtividade da cana-de-açúcar acontece por meio de novas variedades de plantas resistentes a doenças e/ou mais adaptadas às condições de cada região. Neste contexto, a sustentabilidade da produção agrícola da cana-de-açúcar no Brasil está fundamentada na capacidade de responder a pragas, doenças e variações climáticas, o que tem sido possível com o suprimento contínuo de variedades resistentes (Macedo, 2007).

## **2.2 ESTRESSES BIÓTICOS**

No ambiente, as plantas são cercadas por um vasto número de fatores que podem prejudicar seu desenvolvimento, crescimento e produtividade. Assim, estão constantemente submetidas a situações de estresses bióticos como patógenos e ataque por insetos e outras pragas; ou abióticos, como temperaturas extremas, déficit hídrico, salinidade, estresse oxidativo, entre outros. Esses estresses afetam o desenvolvimento da planta, impedindo seu crescimento e maturação e, em intensidade extrema, podem resultar na morte do vegetal (Mahajan e Tuteja, 2005).

Durante a ocorrência de estresses bióticos, pode haver ou não a indução da resistência nas plantas através de uma complexa rede de percepção, amplificação a transdução de sinais que incluem o reconhecimento de elicitores produzidos pelo patógeno, cascatas de fosforilação, fluxo diferencial de íons, ativação de compostos oxidativos, geração de sinais secundários e, finalmente a ativação de vários genes de defesa, a fim de tolerar o estresse (Figura 2), embora o custo metabólico e energético destes mecanismos possa, em alguns casos, resultar

em baixa produtividade para a cultura (Nogueira *et al.*, 2003; De Wit, 2007). Neste modelo, o patógeno possui o gene *avr*, e sua expressão induz no patógeno a produção de moléculas sinais (elicitores) que são reconhecidos por receptores codificados por genes *R* das plantas, levando a resposta de defesa, também chamada de resposta de hipersensibilidade (HR) nas plantas que possuem o gene *R* apropriado. O produto do gene *avr* não possui sequência peptídica sinal que seja capaz de direcionar sua exportação para fora da célula. Através de estudos, os principais agentes infecciosos são as bactérias Gram-negativas, que utilizam, pelo menos, seis sistemas de secreção de proteínas diferentes (Tipo I a Tipo VI sistemas de secreção) para o transporte de fatores de virulência da bactéria no meio circundante ou diretamente para dentro da célula hospedeira. Sistemas similares são empregados por bactérias Gram-positivas, mas também contêm um tipo adicional de sistema de secreção de proteínas, designada tipo VII, que foi identificado em micobactérias (Tseng, *et al.*, 2009; Hayes, *et al.*, 2010; Büttner, *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Mecanismo de indução de resistência em plantas frente ao ataque de patógenos. (Fonte: park.itc.u-tokyo.ac.jp).

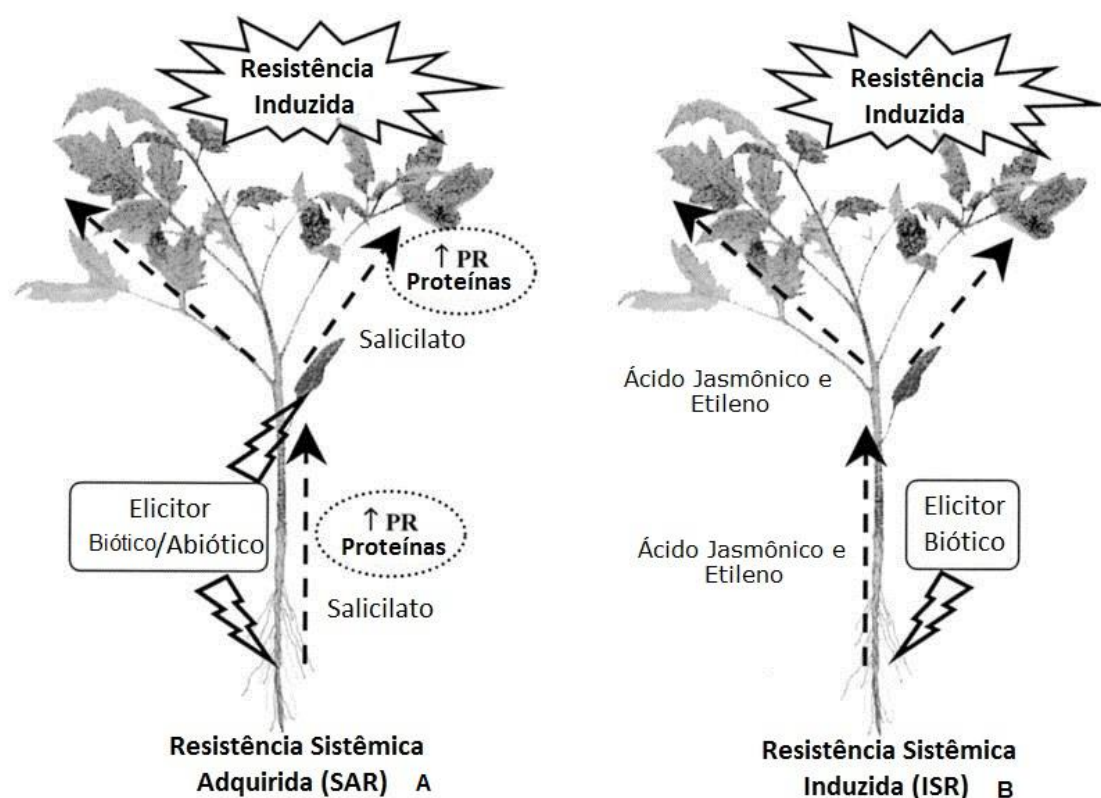
### 2.2.1 Defesa de plantas

As plantas, assim como os animais, estão continuamente expostas à interações com micro-organismos patogênicos e endofíticos. Os micro-organismos endofíticos habitam a planta sem causar nenhum dano ao seu hospedeiro, enquanto os fitopatogênicos são prejudiciais às plantas (Azevedo, 1998). Dessa forma, uma vez infectada a planta percebe a presença de micro-organismos, seja patógeno ou endofítico, mas possui mecanismos de defesa distintos.

Nas plantas, cada célula é capaz de se defender ativando uma combinação de mecanismos de defesa constitutivos e que, quando induzidos, levam a respostas de hipersensibilidade (HR; do inglês *Hypersensitive Response*) para limitar o crescimento do patógeno. Esses mecanismos evoluíram através da coevolução

entre as plantas e seus patógenos. Essa ativação promove uma série de alterações bioquímicas, com o objetivo de adaptar a planta ao estresse, alterando o estado fisiológico ou mesmo estrutural das células (Vallad e Goodman, 2004; Colson e Deverall, 2006; Postel e Kemmerling, 2009).

Para designar os fenômenos pelos quais as plantas ativam seus mecanismos de defesa ao serem expostas a um agente elicitor, não apenas no sítio de indução como também em locais distantes dele e de forma generalizada, são utilizadas as denominações: resistência sistêmica induzida (ISR; do inglês *Induced Systemic Resistance*) e resistência sistêmica adquirida (SAR; do inglês *Systemic Acquired Resistance*) (Figura 3) (Liu *et al.*, 2003).



**Figura 3.** Comparação esquemática de duas formas de indução de resistência em plantas. Resistência Sistêmica Adquirida (A), Resistência Sistêmica Induzida (B). Ambas levam a respostas fenotípicas semelhantes. Fonte: Vallad e Goodman (2004) modificado.

A resistência sistêmica adquirida (SAR) é tipicamente ativada nos tecidos sistêmicos saudáveis de plantas infectadas localmente. Após a infecção

patogênica, um sinal móvel se desloca através do sistema vascular para ativar as respostas de defesa de tecidos distais. O salicilato, ou ácido salicílico, é uma molécula de sinal essencial para o aparecimento de SAR, o qual é necessário para a ativação de um grande conjunto de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PR) com propriedades antimicrobianas (Vallad e Goodman, 2004; Pieterse *et al.*, 2009).

Tal como na SAR, um sinal de longa distância se desloca através do sistema vascular para ativar a imunidade sistêmica em partes das plantas acima do solo. A ISR é comumente regulada pelo jasmonato, ou ácido jasmônico, e pelo etileno. As vias de sinalização dependente normalmente não são associadas com a ativação direta de genes PR. Em vez disso, as plantas apresentando ISR estão prontas para acelerar a expressão gênica dependente de jasmonato e etileno, o que se torna evidente somente após ataque de patógenos (Vallad e Goodman, 2004; Pieterse *et al.*, 2009). Ambas SAR e ISR são eficazes contra um largo espectro de patógenos de plantas (Pieterse *et al.*, 2009). Pode ocorrer a formação de uma barreira física entre a célula e o patógeno através do fortalecimento da parede celular, com a produção e ativação de enzimas ligadas à biossíntese de lignina e à formação de camadas de material suberizado, bem como a formação de calos após o ataque de micro-organismo, constituindo a denominada estratégia física de defesa (Chisholm *et al.*, 2006).

As plantas apresentam resistência à maioria dos micro-organismos potencialmente patogênicos (resistência inata), baseada na ativação de mecanismos de defesa por proteínas especificamente capazes de detectar moléculas elicitoras liberadas pelos patógenos nas fases iniciais de infecção do

hospedeiro. Esta resposta é complexa e variável na capacidade de reconhecimento e resposta aos mais diversos fitopatógenos (Heath, 1991).

De acordo com Salvaudon e colaboradores (2005) a produção de metabólitos secundários com componentes antimicrobiano seriam a segunda estratégia para se defenderem das doenças, chamadas desta vez de resistência não específica. Tais componentes seriam produzidos a partir do momento em que a planta detectasse a presença de padrões moleculares associados a micróbios (MAMPs; *Microbe-Associated Molecular Patterns*) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs; *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (Miya *et al.*, 2007). Estes padrões também são responsáveis pela existência da relação de simbiose entre alguns microrganismos e seus hospedeiros, pois a mesma só se torna possível uma vez que ocorra o reconhecimento das moléculas sinalizadoras da planta por parte do patógeno (Brencic e Winans, 2005).

Nos últimos anos, vários aspectos da SAR vêm sendo elucidados. Entretanto, considera-se que a resposta de hipersensibilidade (HR) se constitui no principal mecanismo utilizado pelas plantas. Após ser infectada por um patógeno, a planta disponibiliza um amplo espectro de defesa contra o micro-organismo invasor, sendo desencadeada pela ativação de genes R onde as células adjacentes ao local de infecção morrem rapidamente, privando o patógeno de nutrientes e impedindo a sua propagação (Meyers *et al.*, 2005).

Pesquisas de expressão diferencial apontam que alterações substanciais na expressão gênica do hospedeiro são detectadas após o contato com diversos tipos de micro-organismos, patogênicos ou não, e que a indução dessa ampla gama de estratégias de defesa demanda uma redistribuição massiva de energia e de metabólitos durante todo o processo (Bolton, 2009; Soto *et al.*, 2009). Contudo,

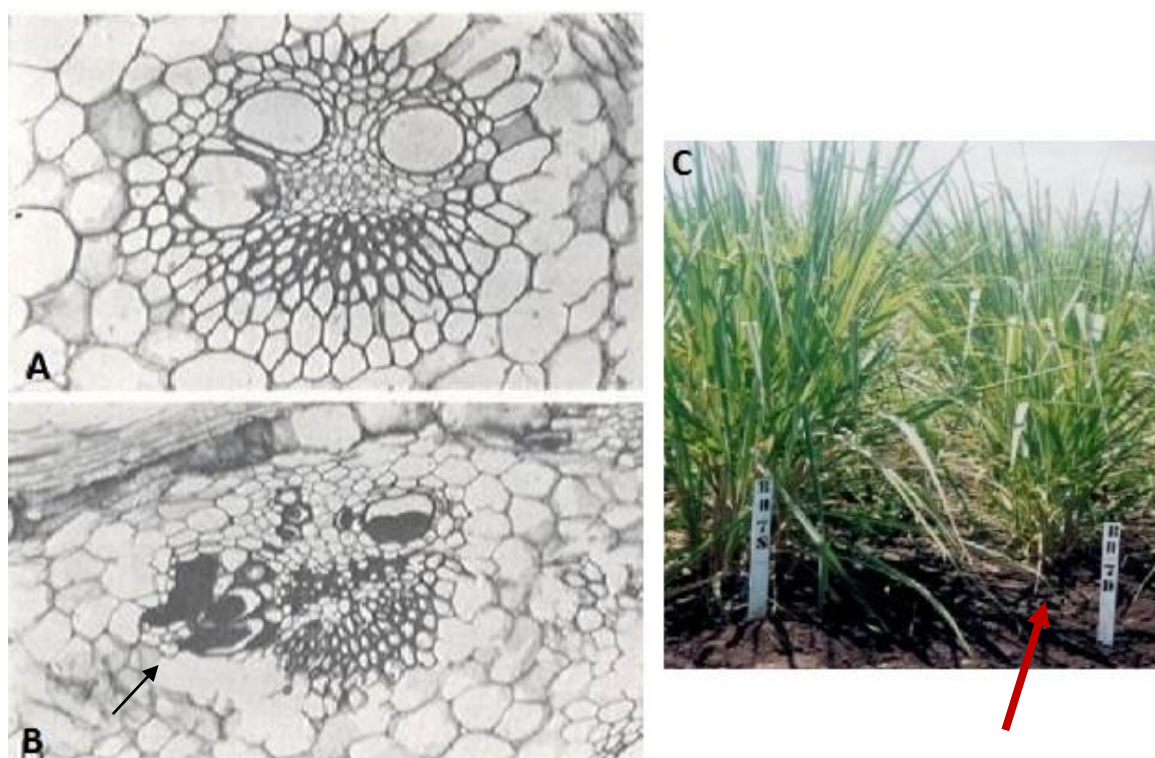
mais estudos são necessários sobre a ação das proteínas relacionadas a interações com micro-organismos e defesa, as quais podem ser utilizadas no melhoramento genético da cana-de-açúcar.

### 2.3 DOENÇAS DA CANA-DE-AÇÚCAR: RAQUITISMO DA SOQUEIRA

Diversos fatores reduzem a produtividade na cultura de cana-de-açúcar. Além das influências econômicas e sociais os aspectos fitossanitários também têm mostrado grande relevância nos anos recentes. As principais doenças que afetam a cana-de-açúcar são: raquitismo-da-soqueira, escaldadura das folhas e ferrugem (Rossetto e Santiago, 2007). A doença raquitismo da soqueira (RSD – “*Ratoon Stunting Disease*”) foi noticiada pela primeira vez em 1944-45 na Austrália em Queensland, após uma primavera bastante seca, onde alguns canaviais da cultivar Q 28 apresentavam soqueiras subdesenvolvidas. A doença, que na época foi chamada de “Q 28 disease”, foi associada a um vírus, pelo fato de não se conseguir isolar e cultivar o patógeno (Brumbley *et al.*, 2006). Apenas em 1984 o agente causal foi descrito como sendo a bactéria *Clavibacter xyli subsp. xyli* (Davis *et al.*, 1984), hoje denominada *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) (Evtushenko *et al.*, 2000). A RSD é considerada uma das mais graves doenças para a cultura de cana-de-açúcar, podendo causar prejuízos de 30% na produtividade e infectar até 100% do canavial em variedades susceptível. (Rossetto e Santiago, 2007).

A Lxx é considerada um patógeno oculto, já que os sintomas provocados em cana-de-açúcar são discretos, quando comparados aos sintomas causados por bactérias necrogênicas (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2009). O sintoma externo

observável é o raquitismo (encurtamento dos entrenós), não sendo facilmente reconhecido no campo, uma vez que este diagnóstico pode ser confundido com outros fatores, incluindo práticas culturais inadequadas, déficit hídrico e deficiência nutricional. Internamente, podem ser observadas manchas avermelhadas pontuais próximas aos meristemas apical e laterais de plantas jovens, enquanto os entrenós não sofrem descoloração (Figura 4) (Metzler *et al.*, 1997).



**Figura 4.** Sintomas da cana-de-açúcar contaminada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). (A) Corte dos vasos do xilema de uma planta saudável. (B) Corte dos vasos do xilema de uma planta infectada por Lxx. A seta preta indica os vasos do xilema ocupados pela Lxx. (C) Comparação entre duas plantas em campo evidenciando a diferença de tamanho entre uma planta saudável (planta mais alta) de uma planta infectada por Lxx (planta menor, indicada pela seta vermelha). Fonte: Chaves *et al.* (2002).

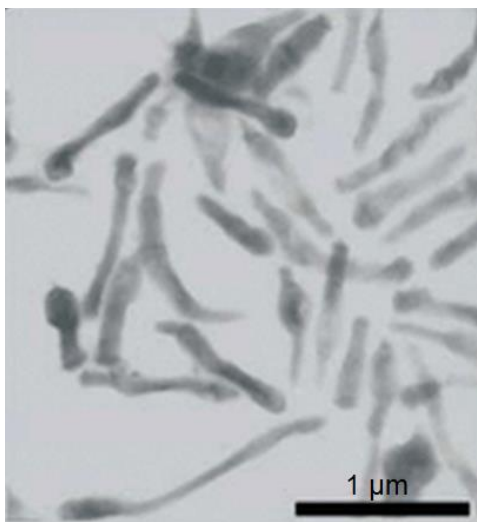
A disseminação da Lxx é antrópica, ocorrendo através do corte do canavial, onde a seiva de uma planta infectada entra em contato com plantas saudáveis através de facões ou maquinário de corte utilizado. O controle da doença pode ser feito com a utilização de variedades tolerantes, implementação de medidas

sanitárias e esterilização dos materiais utilizados na colheita (Rossetto e Santiago, 2007). No Brasil, essa doença está distribuída em todos os Estados produtores (Tokeshi e Rago, 2005). A importância da RSD pode ser evidenciada pelo fato de ter sido um dos primeiros fitopatógenos a ter seu genoma sequenciado pela rede ONSA da FAPESP (FAPESP, 2000).

O relato da doença coincide com a produção de híbridos de cana-de-açúcar por cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, na década de 1940. Portanto, o surgimento da doença pode ter sido favorecido pela intervenção humana, através da criação dos híbridos genitores da maioria das variedades atuais de cana-de-açúcar comercial (Brumbley *et al.*, 2006). Considerando análises de *fingerprinting*, nenhum polimorfismo foi identificado entre diversos isolados de Lxx, obtidos de diferentes cultivares e países, corroborando a hipótese de que a bactéria teria evoluído a partir de um único clone patogênico (Young *et al.*, 2006) e dispersa involuntariamente pelo homem.

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

A *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é uma bactéria Gram-positiva, corineiforme, não móvel, aeróbica obrigatória e restrita ao xilema das plantas. As células bacterianas são bastonetes pleomórficos, medindo de 0,25 - 0,5 µm por 1 – 4 µm, sendo retos ou levemente curvos e ocasionalmente dilatados nas pontas ou no meio (Figura 5) (Cardoso, 1986).



**Figura 5.** *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em solução aquosa de ácido fosfotúngstico 1%, aumento de 30.000 x em microscopia eletrônica. Fonte: Carneiro Jr *et al.* (2004).

O crescimento da Lxx em laboratório ocorre de maneira muito lenta e somente em meios de cultura ricos em nutrientes (Haapalainen *et al.*, 2000), levando de 10 a 15 dias para o aparecimento de colônias e mais de três semanas para o crescimento razoável em meio de cultura líquido. Em meio sólido, as colônias apresentam um aspecto não pigmentado e circular (Davis *et al.*, 1984).

A espécie *Leifsonia xyli* compreende duas subespécies: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* (Lxc), sendo ambas patogênicas a gramíneas. No entanto, a Lxc só infecta cana-de-açúcar experimentalmente e sua infecção é assintomática (Haapalainen *et al.*, 2000).

O genoma da bactéria é composto por um cromossomo circular com 2,6 milhões de pares de bases. Apresenta 2.351 genes, dos quais 13% (307 genes) são pseudogenes, truncados e incompletos, além de 50 sequências de inserção ao longo do cromossomo, um *operon* codificante de rRNA e 45 genes codificantes de tRNA (Monteiro-Vitorello, 2004).

### 2.3.2 Diagnose

Historicamente o diagnóstico de RSD não tem sido tarefa fácil. Esta dificuldade na maioria dos casos é consequência da ausência de sintomas externos específicos. Normalmente, é observado: crescimento irregular, raquitismo, afilamento e encurtamento de colmos, sintomas de murcha em períodos curtos de seca e consequente baixa produtividade, que podem ser confundidos com outros problemas abióticos (Tokeshi e Rago, 2005).

Como resultado dessa dificuldade, várias técnicas foram desenvolvidas para diagnosticar a RSD, como microscopia, testes sorológicos, respostas induzidas no hospedeiro e testes baseados na análise do DNA (Dias, 2012). A escolha do método vai depender de vários fatores como a finalidade e urgência dos resultados, já a sua eficiência é dependente da distribuição e concentração da bactéria na planta (Grisham *et al.*, 2007).

A reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) convencional usando *primers* específicos tem sido o método mais sensível usado na detecção de Lxx (Gao *et al.*, 2008). Grisham e colaboradores (2007) adaptaram essa técnica para quantificação precoce de Lxx em tecidos de folhas de três variedades inoculadas ou não de cana-de-açúcar e com diferentes graus de resistência a Lxx com base em *primers* desenhados a partir de regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do patógeno. O método detectou a bactéria em plantas com três meses de idade após a inoculação. Os autores também analisaram as mesmas amostras por TB-EIA (*Tissue Blot enzyme immunoassay*) e concluíram que esse teste só foi capaz de detectar a bactéria após a formação de colmos maduros, cerca de sete meses após o plantio.

Contudo, a PCR não fornece uma estimativa precisa da quantidade da bactéria presente no material analisado e necessita da visualização dos *amplicons* em gel de agarose. Ao contrário, a PCR em tempo real, apresenta alta sensibilidade que permite quantificar o patógeno em material vegetal com base na relação entre valores de Ct (ciclo limite, ou *threshold*) e de quantidades conhecidas de massa de DNA do organismo alvo (D'Haene *et al.*, 2010).

Carvalho (2012) desenvolveu um protocolo para detecção e quantificação de Lxx por PCR quantitativo em tempo real e avaliou a bactéria em plântulas de duas variedades inoculadas de cana-de-açúcar, baseadas em *primers* concebidos a partir de sequências genômicas únicas de Lxx. O resultado do ensaio de detecção e monitoramento de Lxx *in planta* mostrou eficiente e específico em detectar precocemente o patógeno em amostras com baixo título bacteriano, principalmente por se tratar de uma bactéria fastidiosa e de difícil diagnose.

## **2.4 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CANA-DE-AÇÚCAR**

### **2.4.1 Bactérias diazotróficas**

Bactérias diazotróficas são bactérias promotoras do crescimento vegetal, benéficas às plantas e possuem capacidade de colonizar as raízes e outros tecidos internos do vegetal, sem causar sintomas de doenças. O estímulo ao crescimento ocorre através de diferentes mecanismos, tais como: a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a produção de hormônios de crescimento, como auxinas, giberilinas e as citocininas que favorecem o crescimento vegetal, principalmente

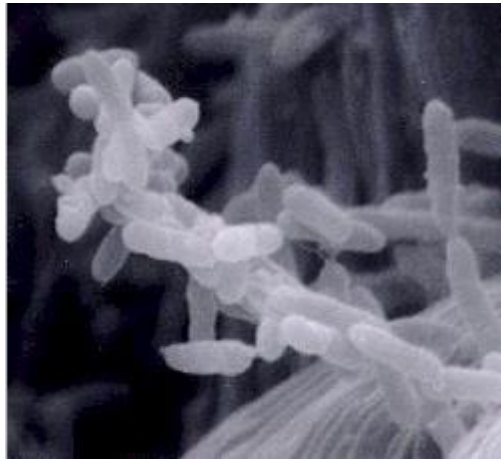
das raízes e que atuam na maior absorção de nutrientes e água (Baldani *et al.*, 2000).

O termo diazotrófico tem origem em N<sub>2</sub>: di-azo e trófico: relativo à nutrição; logo, refere-se àquele que se nutre de nitrogênio gasoso ou que o usa para seu crescimento (Dos Santos *et al.*, 2010). Essas bactérias são capazes de retirar nitrogênio (N<sub>2</sub>), gás inerte no ambiente atmosférico, e transformá-lo em forma solúvel e reativa, normalmente inorgânica, que fará parte das moléculas orgânicas do ser vivo (Gonzaga, 2012).

Estudos com endófitos são direcionados não só para os focos tradicionais, como controle biológico de pragas e doenças, fixação de nitrogênio e promoção de crescimento vegetal, como também, e principalmente, para a investigação de padrões de colonização, forma de penetração e transferência desses microrganismos nas plantas. Dessa forma, é possível estimular uma agricultura de baixo custo e menor impacto ambiental, além do significativo potencial biotecnológico que estas bactérias apresentam (Moreira *et al.*, 2010).

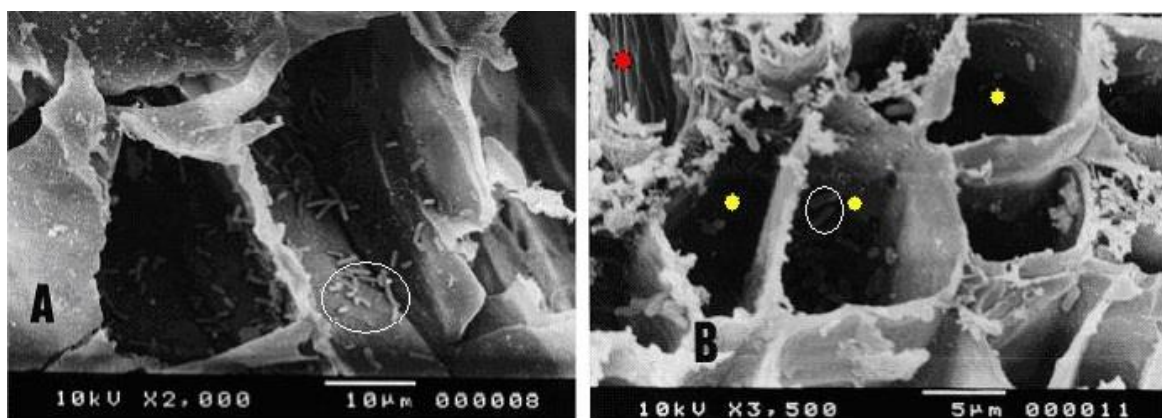
#### **2.4.2 *Gluconacetobacter diazotrophicus***

A *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) foi caracterizada como uma bactéria Gram-negativa, do grupo das proteobactérias, microaeróbica estrita, fixadora de N<sub>2</sub>. Apresenta forma de bastonetes convencionais de dimensão de 0,7 a 0,9 x 2 µm e mobilidade devida à presença de um a três flagelos por célula (Figura 6) (Stephan *et al.*, 1991).

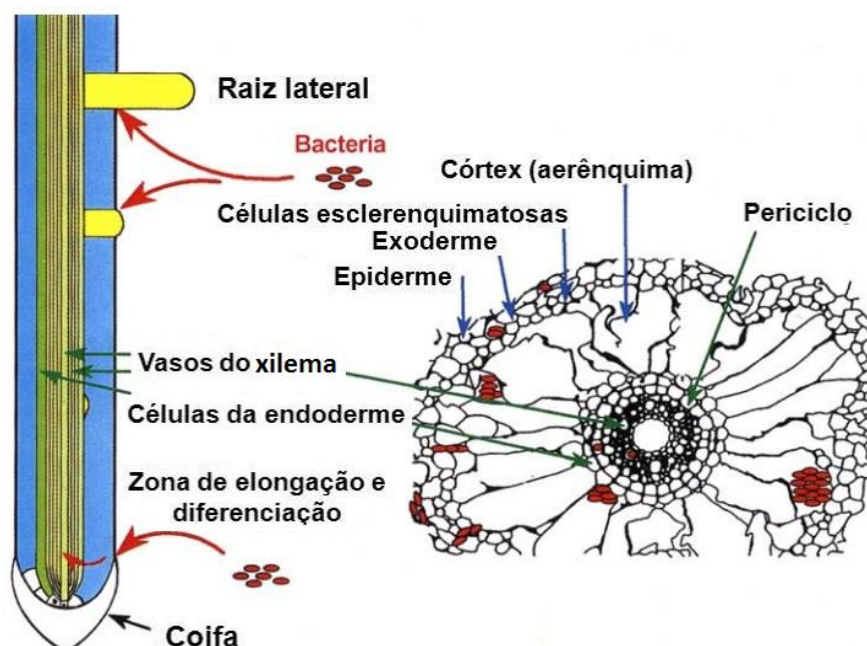


**Figura 6.** Micrografia da bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Fonte: BACMAP: Genome Atlas.

A Gd é uma bactéria encontrada nos espaços intercelulares de plantas de diversas famílias (Figura 7) (Poaceae, Convolvulaceae, Rubiaceae e Bromeliaceae) (Fuentes-Ramirez *et al.*, 2001; Saravanan *et al.*, 2008) e no interior das células epidérmicas das raízes, locomovendo-se sistematicamente e alcançando os tecidos aéreos através do xilema (Figura 8) (James *et al.*, 1994; Reinhold-Hurek e Hurek 1998).



**Figura 7.** Células do colmo da cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Corte de uma planta com cinco meses crescendo em meio pobre em nitrogênio. (A) Corte das células parenquimatosas armazenadoras de sacarose localizadas próximas do córtex. (B) Corte do tecido vascular, elemento traqueídeo (ponto vermelho), rodeado pelas células do parênquima (pontos amarelos). O círculo branco mostra as bactérias em ambos os cortes (A e B). Fonte: Fuentes-Ramírez *et al.* (1999).



**Figura 8.** Possíveis locais de colonização de endófitos diazotróficos na raiz do hospedeiro. Fonte: Hurek e Reinhold-Hurek (2003) modificado.

Trabalhos com anticorpos evidenciaram a localização de *G. diazotrophicus* nos vasos do xilema de cana-de-açúcar em população elevada, sugerindo que este ambiente seja um dos principais locais onde ocorre FBN na planta. Possivelmente, devido ao baixo teor de oxigênio presente neste tecido, propicia-se a condição necessária para funcionamento da nitrogenase (James *et al.*, 1994; James *et al.*, 2001). Recentemente, Rouws e colaboradores (2010) monitoraram a colonização da bactéria em plantas de cana-de-açúcar e arroz através dos genes marcadores *gfp* e *gusA*, confirmando dados anteriores (Dong *et al.*, 1994; James *et al.*, 1994; James *et al.*, 2001).

O fenótipo da Gd é marcante, apresentando colônias com coloração marrom intenso em meio de cultura sólido, com fonte de nitrogênio contendo caldo de batata, sacarose e ágar; e colônias laranja intenso em meio definido sem fonte

de nitrogênio, contendo sacarose, sais e azul de bromotimol denominado LGI-P (Cavalcante e Döbereiner, 1988).

A *G. diazotrophicus* é muito sensível a condições de secas, mas tem alta tolerância a tratamentos de calor e concentrações de sais no meio de cultura (Tejera *et al.*, 2003). O tratamento térmico (50°C por 2 horas), geralmente usado para controle de patógenos causadores de doenças na cana-de-açúcar não são capazes de destruí-la (Ortega *et al.*, 2001). É a espécie mais pesquisada em interação com plantas de cana-de-açúcar e possivelmente de maior contribuição para a FBN. A fixação de N<sub>2</sub>, entretanto, não é o único mecanismo promotor de crescimento de plantas observado nessa espécie. Para o gênero *Gluconacetobacter* foram relatados diversos mecanismos como a síntese de fitohormônios, solubilização de fósforo (P) e zinco (Zn) e biocontrole de patógenos (Saravanan *et al.*, 2008).

O controle biológico de fitopatógenos consiste no uso de organismos que atuam como antagonistas aos agentes causadores das doenças em plantas. Os mecanismos de controle biológico podem ser por competição por um nicho ecológico ou por substrato, pela produção de moléculas inibitórias, por indução de resistência sistêmica no hospedeiro contra patógenos ou contra estresses abióticos (Azevedo *et al.*, 2000). Além de serem recicladores naturais, as bactérias endofíticas interagem com microrganismos patogênicos inibindo o crescimento destes, sendo uma importante ferramenta de controle de patógenos e pragas em culturas agrícolas (Azevedo, 1998). Nesta estratégia, o endófito não atua diretamente sobre o patógeno, mas induz uma resposta na planta que leva a uma resistência sistêmica.

O entendimento do biocontrole do RSD por bactérias endofíticas resultaria em maior produtividade e menor custo para os produtores, justificando assim, o investimento em mudas sadias. O antagonismo mediado por *G. diazotrophicus* (Gd) contra outros organismos foi melhor avaliado com o patógeno *Xanthomonas albilineans*, bactéria causadora da doença escaldadura das folhas em cana-de-açúcar (Piñón *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2005; Arencibia *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2010). Blanco e colaboradores (2005) verificaram que *G. diazotrophicus* produz uma bacteriocina semelhante a uma lisozima, que age sobre o patógeno, inibindo seu crescimento. Além da produção da bacteriocina, foi demonstrada a indução de resistência sistêmica por *G. diazotrophicus* mediando o biocontrole de *X. albilineans*. Isto ocorre pela ativação dos mecanismos de defesa das plantas de cana-de-açúcar inoculadas previamente com *G. diazotrophicus*. Tais mecanismos tornam-se uma proteção para a planta contra a infecção de *X. albilineans* (Arencibia *et al.*, 2006).

Estudos evidenciaram que a cana-de-açúcar tem uma grande contribuição da FBN a partir de bactérias diazotróficas associadas à cultura em condições de campo, onde várias cultivares apresentaram uma alta contribuição deste processo biológico, chegando até 60% do N<sub>2</sub> acumulado proveniente da FBN (Kim e Rees, 1994; Polidoro *et al.*, 2001; Santos, 2008).

O nitrogênio é absorvido nas raízes sob a forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, sendo incorporado em aminoácidos na raiz ou na parte aérea. A taxa e a quantidade de nitrogênio absorvido e assimilado dependem da presença de carregadores específicos na membrana plasmática, da atividade das enzimas envolvidas no seu ciclo, da disponibilidade de energia e do estado de desenvolvimento da planta (Bredemeier e Mundstock, 2000). O mecanismo de promoção de crescimento

vegetal por microrganismos endofíticos ainda necessita de mais estudos para um melhor entendimento dos fatores envolvidos entre planta-hospedeiro.

A *G. diazotrophicus* PAL5 teve seu genoma completamente sequenciado em 2009 (Bertalan *et al.*, 2009), anotando-se aproximadamente 4.000 sequências codificantes, as quais revelaram estar relacionadas ao estilo de vida endófito, incluindo 851 genes transferidos horizontalmente, relacionados com a adaptação ao habitat vegetal. Foram anotadas ainda mais de 1.000 sequências, que codificam proteínas hipotéticas. Através do estudo proteômico, Lery e colaboradores (2011) identificaram a proteína Glutamate-ammonia ligase, associada ao metabolismo de nitrogênio em cana-de-açúcar micropropagada (genótipo SP70-1143) inoculada com *G. diazotrophicus*.

Estes dados oferecem uma fonte de informação importante, que pode ser usada para manipular as interações planta-bactéria, objetivando melhorar a produção de culturas agrícolas, como a cana-de-açúcar. A disponibilidade de sequências do genoma de bactérias de interesse econômico, seja por seu caráter patogênico ou pelo seu potencial simbiótico, oferece novas oportunidades de investigação molecular da resposta das plantas durante sua associação. A continuidade do desenvolvimento de endofíticos fixadores de nitrogênio como agentes de controle biológico e a utilização de biologia molecular no estudo destes simbioses poderão favorecer sua utilização em agrossistemas ambientalmente sustentáveis (Hallmann *et al.*, 1997).

## 2.5 PROTEÔMICA

Análises da expressão gênica por técnicas como microarranjos de cDNA, Análise Serial da Expressão Gênica (SAGE; do inglês *Serial Analysis of Gene Expression*) e técnicas de sequenciamento em larga escala permitem obter perfis moleculares e fornecem oportunidades para identificação de importantes alterações em nível transcricional. Entretanto, a análise de RNAs é prejudicada pela sua susceptibilidade à degradação e pela possível falta de concordância entre sua concentração e a da proteína correspondente traduzida (Velculescu *et al.*, 1995).

Uma vez que as proteínas são os efetores diretos da resposta ao estresse e por estarem mais próximas da resposta fenotípica, é fundamental conhecer o conjunto de proteínas expresso em determinada situação de estresse. A busca pelo entendimento da expressão, função e regulação das proteínas codificadas por um organismo, associado aos conhecimentos genômicos, tem sido responsável por mudanças nos rumos das pesquisas em biologia molecular funcional, dando início à chamada Era Proteômica (Dhingra *et al.*, 2005).

Proteínas são polímeros de aminoácidos resultantes da tradução das informações genéticas contidas no DNA de um genoma. As proteínas exercem papéis fundamentais em quase todos os fenômenos biológicos, como produção de energia, comunicação celular, defesa, dentre outros (Souza *et al.* 1999). O estudo da expressão proteica tem contribuído significativamente para um melhor entendimento sobre o funcionamento dos sistemas biológicos (Baginsky, 2009).

A proteômica é entendida como a análise em larga escala de um conjunto de proteínas. Ou seja, a análise da expressão gênica de uma determinada célula, tecido ou organismo, sob determinadas condições ambientais ou estágio de

desenvolvimento. Os estudos proteômicos são capazes de fornecer importantes informações para identificar, quantificar e estudar as modificações pós-traducionais das proteínas (Pandey e Mann, 2000). Trata-se de uma área interdisciplinar da ciência, a qual agrega principalmente química, biologia e informática, utilizando metodologias analíticas para caracterizar (quali e quantitativamente) um proteoma.

Um dos avanços metodológicos na proteômica é o acoplamento da eletroforese bidimensional ao uso da espectrometria de massas (MS) para identificação dos peptídeos encontrados em bancos de dados. Mais recentemente, novas plataformas analíticas de alta resolução têm permitido o estabelecimento da cromatografia líquida de ultraperformance (UPLC) associada à espectrometria de massas em larga escala como opção crescente para análises quali-quantitativas de proteomas, denominadas LC-MS/MS.

### **2.5.1 Eletroforese bidimensional**

A eletroforese bidimensional, ou eletroforese 2D, tem por fundamento a separação das proteínas por seu ponto isoelétrico (pI), através da focalização isoelétrica (IEF) numa primeira dimensão, e por seu peso molecular (MM), numa segunda dimensão da eletroforese, sendo capaz de combinar duas técnicas distintas de separação. Assim, é possível separar uma grande quantidade de proteínas ao mesmo tempo (Rocha *et al.*, 2005).

De forma geral, na primeira dimensão da eletroforese, as proteínas são separadas em função de suas cargas nativas, sendo assim, os detergentes utilizados na solubilização das mesmas devem ser não iônicos ou zwitteriônicos

(Rocha *et al.*, 2005). A focalização isoeétrica é capaz de separar as moléculas de acordo com as diferenças entre seus pontos isoeletricos, correspondendo ao pH cuja carga líquida da proteína é igual a zero. Uma vez que as proteínas são moléculas anfotéricas, elas possuem a propriedade de serem carregadas tanto positivamente quanto negativamente, dependendo do meio em que se encontram. Sua carga líquida corresponde ao somatório entre as cargas positivas e negativas da cadeia lateral de aminoácidos e, através da porção carboxi terminal (Görg, 2004; Westermeier, 2005), é possível utilizar essa técnica de separação de moléculas.

As proteínas encontram-se positivamente carregadas quando o valor do pH do meio em que se encontram é menor que seu  $pI$ , e negativamente carregadas, quando o valor do pH é maior que seu  $pI$  (Görg, 2004). Durante a IEF, uma mistura de proteínas é aplicada em tiras de acrilamida desidratada com pH imobilizado em gradiente (IPG) e submetida a um campo elétrico, sob o qual migrarão até encontrar uma faixa de pH correspondente ao seu  $pI$  (Rocha *et al.*, 2005). Neste ponto, as proteínas ficarão com carga total neutra, parando de migrar no gel. Proteínas de carga positiva irão migrar em direção ao cátodo, tornando-se menos positivas à medida que se aproximam do seu  $pI$ , enquanto que as proteínas de carga negativa migrarão em direção ao ânodo, tornando-se progressivamente menos negativas, até que sua carga líquida seja igual a zero (Görg, 2004).

Enquanto que na segunda dimensão da eletroforese, as proteínas são separadas em função de sua massa via SDS-PAGE (gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio). Após a IEF, a tira de IPG deverá ser colocada em contato com o gel de poliacrilamida, através do qual será realizada uma SDS-PAGE convencional, separando as proteínas de acordo com sua massa molecular. O resultado da eletroforese bidimensional corresponde a um gel com vários *spots*, ou regiões

delimitadas onde se concentra determinado peptídeo, proteína ou conjunto destes (Rocha *et al.*, 2005).

### 2.5.2 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas possibilita a identificação dos *spots* obtidos através da eletroforese bidimensional, através da determinação da massa molecular dessas proteínas e peptídeos por comparação das massas e sequências dos aminoácidos, resultantes de digestão tripídica, com sequências de proteínas depositadas em bancos de dados de domínio público (Cunha *et al.*, 2006).

O espectrômetro de massas é composto por três partes: um sistema de ionização das moléculas, um analisador de massas e um detector. Os métodos de ionização de massas mais utilizados são o MALDI (dessorção ionizante assistida por matriz) e o ESI (ionização por eletrodispersão). Os principais analisadores de massas associados a estas técnicas são o tempo de voo (ToF), o quadripolo e o aprisionamento de íons (IT) (Cunha *et al.*, 2006).

Os espectrômetros podem ser classificados em várias categorias dependendo de suas partes. Dentre eles, o MALDI-ToF, que associa o método de ionização baseado na dessorção ionizante assistida por uma matriz, com o analisador tempo de voo. Ele é utilizado para realização de fingerprints de peptídeos e proteínas. Outro método associa a ionização por eletrodispersão (ESI) com espectrometria de massas em tandem (MS/MS). E é geralmente associado à

cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Newton *et al.*, 2004). Pode ser também associado à cromatografia líquida de ultra performance (UPLC).

A identificação dos peptídeos pode ser feita a partir de dois tipos de resultados: a técnica MALDI-ToF usa a informação relativa à massa molecular dos peptídeos oriundos da digestão enzimática (*Peptide Mass Fingerprint* – PMF), enquanto que a segunda técnica, ESI-MS/MS, faz uso de resultados obtidos pela fragmentação de peptídeos individuais previamente detectados (Sadygov *et al.*, 2004).

### **2.5.3 Proteômica da interação planta-microrganismo**

Com os avanços na biologia molecular, uma grande quantidade de sequências de DNA e cDNA foram disponibilizadas pelos projetos de sequenciamento total dos genomas. Dentre eles, o genoma da estirpe CTC B07 de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2004), o genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* (Bertalan *et al.*, 2009) e o projeto SUCEST (*Sugarcane Expressed Sequence Tag Project*), que resultou em ampla amostragem do transcriptoma da cana-de-açúcar (Vettore *et al.*, 2001).

A análise proteômica em cana-de-açúcar tem se focado em estudos moleculares acerca de estresses abióticos, como salinidade (Pacheco *et al.*, 2013) seca (Ribeiro, 2010) e bióticos (Carvalho, 2012). A interação planta-patógeno/simbionte, a nível proteômico, é pouco relatada para a cultura da cana-de-açúcar (Dos Santos *et al.*, 2010; Lery *et al.*, 2011; Carvalho, 2012). Dessa

forma, a identificação de peptídeos produzidos diferencialmente em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com as bactérias *G. diazotrophicus* (simbionte) ou *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (patogênica), pode auxiliar o entendimento das vias metabólicas ativadas na planta para enfrentar o estresse causado por esses micro-organismos.

Dos Santos e colaboradores (2010) reportaram, no estudo da proteômica da *G. diazotrophicus* co-cultivada com cana-de-açúcar, proteínas diferencialmente expressas associadas a carboidratos, metabolismo energético e processo de degradação. Entre as proteínas expressas, quatro pertencem ao sistema de membrana e outras como fator de alongamento de transcrição. Estes resultados permitiram a avaliação do significado das vias específicas envolvidas da *G. diazotrophicus*.

De acordo com Lery e colaboradores (2011), a investigação de aspectos moleculares da interação *G. diazotrophicus* com dois genótipos distintos de cana-de-açúcar, SP70-1143 e Chuneé (*Saccharum barberi*), revelou proteínas com papéis fundamentais no reconhecimento celular da planta. No genótipo SP70-1143 as proteínas expressas estão envolvidas na adaptação celular e sistemas de sinalização, o que permitiu a colonização da bactéria. Enquanto que, no genótipo Chuneé, a expressão de proteínas está envolvida em mecanismos específicos de defesa da planta, como subunidades do complexo de proteossoma, desencadeando morte celular programada da planta.

Carvalho (2012) realizou estudo proteômico em duas variedades de cana-de-açúcar (RB835486 e SP80-3280) em resposta à colonização por Lxx. O número de proteínas que apresentaram variações em abundância foi bem menor na variedade RB835486 comparada a SP80-3280, possivelmente a carga bacteriana

foi menor nesta variedade. Identificaram-se proteínas exclusivas relacionadas ao crescimento da planta, ciclo celular e sinalização celular e hormonal na variedade SP-80-3280 inoculada, enquanto que em plantas não inoculadas da variedade RB835486 foi observada a repressão de proteínas da via de estresse e metabolismo primário.

### 3. Objetivos

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as proteínas produzidas diferencialmente em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com as bactérias *G. diazotrophicus* e/ou *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, para auxiliar na compreensão da interação molecular planta/micro-organismo.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar proteínas diferencialmente expressas no simbiossistema cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus* (Gd);
- ✓ Identificar proteínas diferencialmente expressas no patossistema cana-de-açúcar x *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx);
- ✓ Identificar proteínas diferencialmente expressas na interação mista cana-de-açúcar x Gd/Lxx;
- ✓ Determinar, através de anotação presumível a função das proteínas diferencialmente expressas e estabelecer modelos potencialmente associados ao processo de interação cana-de-açúcar – micro-organismo(s).

## 4. Capítulo I

Proteômica da interação simbiótica entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* e cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Renata Rodrigues de Almeida<sup>1</sup>, Adauto Gomes Barbosa Neto<sup>1</sup>, Taciana Conceição Manso<sup>1</sup>, Tercilio Calsa Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética, Centro de Ciências e Biologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Artigo a ser submetido à revista **Genetics and Molecular Biology**.

## Resumo

A cana-de-açúcar é constantemente exposta a diversos tipos de estresses, que podem afetar significativamente o seu desenvolvimento, refletindo diretamente no rendimento. A bactéria simbiote *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) é conhecida por fixar nitrogênio atmosférico em um sistema endofítico influenciando positivamente a produtividade da cana-de-açúcar. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar proteínas diferencialmente expressas em cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus*, através de eletroforese bidimensional (2-DE) associada à espectrometria de massas (MS). Colmos de cana-de-açúcar (variedade RB867515) foram tratados termicamente e submersos em suspensão de células de *G. diazotrophicus* (estirpe BR11281) na concentração de  $10^7$  ml<sup>-1</sup>. Após quatro meses foi coletada a folha +1 e em seguida realizada a extração de proteínas totais, referentes aos tratamentos inoculado (Gd) e não-inoculado (Controle), em triplicata, e quantificadas. Os extratos proteicos foram aplicados em *strips* de 11cm, pH 3-10, em seguida focalizados em sistema IPGPhor. Os mapas 2-DE obtidos foram analisados no *software* ImageMaster 2D Platinum v.7.05. Os espectros tríticos foram obtidos no espectrômetro MALDI-ToF-ToF, Autoflex III. As proteínas diferencialmente expressas (DEPs) foram identificados através da análise dos arquivos *peaklist.xml* no *software* Mascot pelo método de PMF (*Peptide Mass Fingerprint*) contra os bancos de dados de: i) cana-de-açúcar (Saccharum\_7061), Gd (Gd\_proteome) e ii) Viridiplantae e Proteobacteria. Os resultados da eletroforese bidimensional com a interação cana-de-açúcar/Gd mostraram que 173 *spots* apresentaram nível de expressão alterado. A análise por espectrometria de massa identificou 65 proteínas. Essas proteínas diferencialmente expressas foram associadas principalmente com produção de energia, componentes de fotossistemas e indução de resposta a estímulos ambientais. Variações detectadas no proteoma foliar de cana-de-açúcar contribuem de forma significativa para o melhor entendimento da interação cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus* uma vez que foi possível observar mecanismos moleculares utilizados pelas plantas na obtenção de benefícios desta relação planta-simbiote.

**Palavras-chave:** Espectrometria de Massas; *Gluconacetobacter diazotrophicus*; Fixação de Nitrogênio; Proteômica.

## Abstract

The sugarcane is constantly exposed to various types of stress, which can significantly affect their development, reflecting directly in income. The symbiotic bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* is known to fix atmospheric nitrogen in an endophytic system positively influencing the productivity of sugarcane. In this context, the aim of this study was to identify proteins differentially expressed in sugarcane inoculated with *G. diazotrophicus* (Gd) by two-dimensional electrophoresis (2-DE) associated with mass spectrometry (MS). Sugarcane stalk (RB867515 variety) were heat-treated and immersed in suspension *G. diazotrophicus* cells (BR11281 strain) at a concentration of  $10^7 \text{ml}^{-1}$ . After four months was collected +1 sheet and then performed the extraction of total proteins, relative to the inoculated treatments (Gd) and uninoculated (control) in triplicate, and quantificated. The protein extracts were applied to strips of 11 cm, pH 3-10, and then focused on IPGphor system. 2-DE maps were analyzed in ImageMaster 2D Platinum v.7.05 software. Tryptic spectra were obtained in the MALDI-ToF-ToF spectrometer, Autoflex III. The differentially expressed proteins (DEPs) were identified by PMF (Peptide Mass Fingerprint) in Mascot platform against the database Viridiplantae, Proteobacteria/Swissprot and sugarcane (Saccharum\_7061) and Gd database (Gd\_proteome). 162 spots were visualized in the control treatment and 164 spots in GD gels. The results of two-dimensional electrophoresis with sugarcane/Gd interaction showed that 173 spots showed altered expression level. Analysis by mass spectrometry identified 65 proteins. These differentially expressed proteins were primarily associated with energy production, and induction components photosystems response to environmental stimuli. Variations detected in leaf proteome of sugarcane contribute significantly to a better understanding of the interaction sugarcane x *G. diazotrophicus* since we observed molecular mechanisms used by plants in getting benefits of this relation plant-symbiont.

**Keywords:** Mass Spectrometry; *Gluconacetobacter diazotrophicus*; Nitrogen Fixation; Proteomics.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O cultivo da cana-de-açúcar tem grande importância para o agronegócio internacional, sendo os Estados Unidos o maior produtor de etanol mundial. Apesar de líder no cultivo da cana-de-açúcar, o Brasil ocupa a segunda posição na produção de etanol, (FAOSTAT, 2012; Saibi *et al.*, 2013), com uma safra de 658,8 milhões de toneladas em 2013/2014 (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2015). Por ser um país tropical, a produção de bioetanol no Brasil possui um alto potencial de geração de bioenergia. (Waclawovsky *et al.*, 2010). Através do desenvolvimento de híbridos melhorados, seleção e manipulação genética a agroenergia no país vem se viabilizando cada vez mais (Menossi *et al.*, 2008; Waclawovsky *et al.*, 2010).

O estudo da diversidade microbiana associada à cultura apresenta uma importante alternativa para melhorar as características e sustentabilidade da planta (Luvizotto, 2008). Associações de micro-organismos endofíticos com seus hospedeiros podem ocasionar benefícios às culturas, principalmente pela produção de compostos promotores de crescimento e pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Baldani *et al.*, 2000).

As bactérias diazotróficas promovem o crescimento vegetal, sendo capaz de colonizar as raízes e outros órgãos sem causar sintomas de doenças (Baldani *et al.*, 2000). O uso de micro-organismos endofíticos se baseia na interação com as plantas hospedeiras, resultando na fixação de nitrogênio, produção de hormônios vegetais para promoção de crescimento, solubilização de compostos de fosfato e zinco e na secreção de bacteriocinas, auxiliando no controle biológico de doenças e pragas (Azevedo *et al.*, 2000; Lodewyckx *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2010; Lery *et al.*, 2011). Polidoro *et al.* (2001) evidenciaram que a cana-de-açúcar contribui para

a fixação biológica de nitrogênio (FBN) a partir de bactérias diazotróficas em condições de campo.

A *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) é uma bactéria endofítica aeróbica gram-negativa com capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, e foi originalmente isolada do interior de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar (Cavalcante e Döbereiner, 1988). Sua ocorrência é bastante restrita, estando associada a plantas ricas em sacarose, como a cana-de-açúcar, batata-doce e abacaxi, as quais se propagam vegetativamente (Stephan *et al.*, 1991).

A interação entre micro-organismos e plantas ativa uma combinação de mecanismos constitutivos de defesa que, quando induzidos, levam a respostas de hipersensibilidade favorecendo ou limitando o crescimento do micro-organismo. Isso ocorre através da percepção de elicitores produzidos pelo micro-organismo, que interagem com receptores da planta e, conseqüentemente, pela alteração do perfil de expressão gênica, gerando a transcrição e tradução de perfis proteicos distintos (Colson e Deverall, 1996; Vallad e Goodman, 2004; Postel e Kemmerling, 2009). Através da avaliação do perfil das proteínas produzidas por *G. diazotrophicus*, quando associadas a plantas de cana-de-açúcar (Dos Santos *et al.*, 2010), estabeleceu-se um melhor conhecimento das interações planta-bactéria. Os autores avaliaram a expressão diferencial das proteínas de *G. diazotrophicus* PAL5 após inoculação *in vitro* em plântulas de cana-de-açúcar SP70-1143 micro-propagadas. Quarenta e dois spots apresentaram níveis de expressão alterados quando cultivadas com as plântulas e aquelas apenas cultivadas em meio de cultivo. Trinta e oito proteínas foram identificadas e associadas ao metabolismo de carboidratos e energia, estruturação (*folding*) e degradação de proteínas. Quando co-cultivadas com as plântulas de cana-de-açúcar, um fator transcricional de

alongamento, uma chaperonina e uma lipoproteína de membrana, dentre outras, apresentaram maior acúmulo. Os resultados obtidos permitiram a identificação de 53 proteínas relevantes para o metabolismo de *G. diazotrophicus* e para as vias envolvidas na interação com cana-de-açúcar.

Em 2008 Lery e colaboradores (2008a) identificaram 583 proteínas distribuídas em diferentes categorias funcionais como: aminoácidos, carboidratos, lipídeos produção de energia e vias metabólicas de nucleotídeos. No mesmo ano, Lery *et al.* (2008b) também desenvolveram uma pesquisa de proteômica com *G. diazotrophicus* PAL5 em fase exponencial e estacionária na presença de altos ou baixos níveis de nitrogênio. Após a espectrometria de massa e as análises de bioinformática, dessas 131 proteínas, 46 foram identificadas. Foram analisadas proteínas relacionadas com metabolismo de DNA e de energia, homeostase citoplasmática, transportadores, etc e, quando cultivadas sob baixas concentrações de N, proteínas-acessório da fixação de nitrogênio, com papel na biossíntese e estabilização da nitrogenase foram mais expressas.

Lery e colaboradores (2011) investigaram aspectos moleculares da interação de *G. diazotrophicus* e plantas de cana-de-açúcar, marcando isotopicamente as plântulas de cana-de-açúcar das variedades SP70-1143 (altamente responsiva à FBN) e Chunnee (baixa resposta à FBN) e as células de *G. diazotrophicus* PAL5. Foram analisadas mais de 400 proteínas, e 78 delas foram diferencialmente expressas entre a bactéria controle e o co-cultivo com as plântulas de cana. A bactéria apresentou proteínas envolvidas na adaptação a condições atípicas e sistemas de sinalização durante a interação com ambos os genótipos, entretanto, SP70-1143 e Chunnee mostraram respostas divergentes em contato com a bactéria. O genótipo altamente responsivo a FBN (SP70-1143)

acumulou maior quantidade de proteínas de cascata de sinalização, já o genótipo de baixa resposta a FBN (Chunne) sintetizou diferencialmente proteínas, envolvendo a remodelagem da cromatina e vias de degradação de proteínas. As células bacterianas oriundas de ambos os sistemas de co-cultivo apresentaram expressão aumentada de proteínas envolvidas em vias de sinalização e metabolismo, auxiliando as bactérias a sobreviverem e se adaptarem ao novo ambiente. Os resultados sugerem que *G. diazotrophicus* PAL5 percebe e responde às duas variedades de cana através de mecanismos gerais similares.

O presente trabalho objetivou identificar o conjunto de proteínas ativadas ou inibidas durante a simbiose. Assim, a identificação de peptídeos produzidos diferencialmente em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* pode auxiliar o entendimento das vias metabólicas ativadas na planta (ou na bactéria) na interação com esse micro-organismo

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Material vegetal e inoculante**

Os rebolos de cana-de-açúcar variedade RB867515 foram fornecidos gentilmente pela RIDESA/EECAC (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro/Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina-UFRPE). A cepa da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* BR 11281 foi fornecida pelo CENA/USP (Centro de Energia Nuclear na Agricultura/ Universidade São Paulo).

#### 4.2.2 Tratamento térmico

A fim de minimizar infecções por outros organismos, foram utilizados rebolos de uma gema da variedade RB867515, para o experimento em casa de vegetação. Realizou-se tratamento térmico de acordo com metodologia apresentada por Tokeshi (2005). Os rebolos de cana-de-açúcar foram colocados em sacos de polipropileno e submersos em água a 50,5°C por 2 h (Figura 1A). Após a submersão, os rebolos foram deixados em temperatura ambiente para permitir o resfriamento dos mesmos e prosseguir com a inoculação da bactéria.

#### 4.2.3 Preparo do inóculo e inoculação dos colmos

O inóculo da bactéria *G. diazotrophicus* (Gd) estirpe BR 11281 foi cultivado em meio DYGS (Rodriguez Neto *et al.*, 1986) a 28°C e 130 rpm. O crescimento foi acompanhado até que o inóculo atingisse densidade ótica 0,5 a 540 nm, correspondendo a aproximadamente  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> (Canuto *et al.*, 2003; Canuto, 2008). Uma alíquota do inóculo foi diluída em 2 L de água estéril, para obtenção de suspensão com aproximadamente  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Para o experimento, os colmos tratados termicamente foram submersos na suspensão de células na concentração determinada acima por 1 h. O tratamento controle foi realizado através de submersão dos colmos em água esterilizada nas mesmas condições (Figura 1B). Após a inoculação, os segmentos de colmo foram acondicionados em bandejas de polietileno contendo solo autoclavado para brotação (Figura 1C).

#### 4.2.4 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina (EECAC), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no período de setembro 2012 a fevereiro 2013. Após brotação dos colmos inoculados com Gd, aos 30 dias, plantas foram transferidas para vasos de polietileno. Os vasos contendo solo autoclavado receberam uma planta e foram dispostas de modo a caracterizar o delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (Controle e Gd), e cinco repetições cada (Figura 1D).



**Figura 1.** Montagem do experimento *in vivo* em casa de vegetação, mostrando o tratamento térmico dos colmos de cana-de-açúcar (A). Inoculação dos colmos com a bactéria *G. diazotrophicus* (Gd) (B). Colmos inoculados colocados para brotação em bandejas (C). Plantas já desenvolvida após dois meses de transplântio (D).

Após quatro meses do transplântio, foram coletadas folhas +1 [folha mais jovem que apresenta bainha visível, conforme nomenclatura de Van Dillewijn (1952)]. As amostras coletadas foram cortadas em frações menores colocadas em tubos cônicos de 50 mL (Falcon), imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em gelo seco, até estocagem a -80°C.

#### 4.2.5 Confirmação da inoculação com Gd e colonização das plantas

A fim de confirmar a presença diferencial de Gd nas amostras coletadas nos tratamentos do experimento em casa-de-vegetação, foi extraído DNA total do material vegetal coletado (Doyle e Doyle, 1991) para PCR convencional utilizando os seguintes *primers* específicos da região do gene 16S rRNA de Gd: GdF (5'-TGAGTAACGCGTAGGGATCTG-3') e GdR (5'-GGAAACAGCCATCTCTGACTG-3'). As reações para amplificação em *nested*-PCR (2x) foram: 92°C por 5 min, 28 ciclos de: 60,5°C por 30 s, 72°C por 1 min (amplicon de 915 pb) e 92°C por 1 min; anelamento final a 60,5°C por 15 s, e extensão final a 72°C 10 min (conforme Franke-Whittle *et al.*, 2005).

Foi utilizada também a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a confirmação da presença diferencial da bactéria entre os tratamentos. Para a qPCR foram utilizados os mesmos *primers* específicos da região 16s rRNA de Gd que na PCR convencional. As reações de qPCR foram conduzidas empregando a tecnologia SYBR Green® (Molecular Beacons) no sistema RotorGene 6000 (Corbett Research), disponibilizado pela Plataforma Tecnológica de Genômica e Expressão Gênica do Laboratório Central do CCB/UFPE. A reação de amplificação foi realizada em volume de 15 µL, contendo 20 ng do DNA molde, 0,4 µM de cada *primer*, 2x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) e água

ultrapura (Milli-Q) estéril. A qPCR ocorreu com os seguintes parâmetros: 95°C por 5 min; seguidos de 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 10 s, anelamento a 56°C por 15 s, extensão a 60°C por 120 s. Ao final, o produto obtido foi submetido ao protocolo de dissociação ajustado de 60 a 95°C, para obtenção da curva de dissociação (*melting*). Foram comparados os valores de C<sub>q</sub> (ciclo de quantificação) encontrados nas plantas controle (não inoculadas) com as plantas inoculadas (Gd), a fim de verificar a concentração relativa de DNA de Gd nas plantas coletadas.

#### **4.2.6 Variáveis morfométricas**

Para um melhor entendimento sobre os mecanismos que conferem aumento na eficiência produtiva da cultura de cana-de-açúcar, foram mensurados as variáveis morfométricas: comprimento da folha+1, altura da planta, número de perfilhos, número de entrenós e diâmetro do terço médio da planta a partir do ápice caulinar das plantas (Marafon, 2012). Os dados morfofisiológicos obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade através do programa estatístico Assistat 7.5 Beta.

#### **4.2.7 Extração de proteínas**

As proteínas totais da folha +1 de cana-de-açúcar foram extraídas utilizando-se método com fenol (Hurkman e Tanaka, 1986) modificações conforme Boaretto (2012). Dois gramas de folhas congeladas foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de pó fino e homogeneizados em 15 mL de tampão de extração em tubos (50 mL) e mantidos sob agitação constante a 70 rpm a 4°C por 30 min. Foram adicionados 15 mL de fenol saturado com Tris-HCl (pH

8,5). Em seguida, os tubos foram novamente mantidos em agitação constante a 70 rpm a 4°C por 30 min.

Os tubos foram centrifugados a 10.000xg por 30 min a 4°C, e o sobrenadante (fase orgânica) foi coletado e transferido para tubo novo, sendo adicionado a este cinco volumes de 0,1 M de acetato de amônio dissolvido em metanol 100%. Os tubos foram mantidos a -20°C durante 18 h para precipitação das proteínas, e em seguida centrifugados a 16.000xg por 30 min a 4°C. Após descarte do sobrenadante, o precipitado (*pellet*) foi lavado três vezes sob centrifugação a 16.000xg por 30 min a 4°C com 0,1 M de acetato de amônio dissolvido em metanol 100%, uma vez com metanol 100% e uma vez com acetona 100%. Antes de cada centrifugação, os tubos permaneceram por 1 h a -20°C. No final das lavagens, os tubos permaneceram abertos, acondicionados em gelo, em câmara de fluxo laminar até a secagem completa do *pellet*. Após secagem, os *pellets* foram solubilizados em solução de ureia 8 M e tioureia 2 M, e submetidos à sonicação em 60% de amplitude em cinco pulsos de 5 s intercalados com pausas de 10 s. As proteínas solúveis totais foram quantificadas conforme método descrito por Bradford (1976). As leituras foram realizadas em triplicata por meio de espectrofotômetro de luz visível (Bioespectro SP-220) a 595 nm. A verificação da qualidade dos extratos de proteínas das amostras foi feita mediante visualização em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5%. Foi realizada extração de proteínas de cada uma das cinco réplicas biológicas de cada tratamento, sendo os extratos obtidos reunidos em um único tubo.

## **4.2.8 Eletroforese bidimensional**

### **4.2.8.1 Focalização isoelétrica (IEF)**

A IEF foi realizada em fita IPG de 11 cm e pH 3-10 linear (GE Life Sciences) para 150 µg de proteínas totais das amostras de folha dissolvidas em solução de ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% (m/v), 19,4 mM de DTT, anfolinas 0,5% (v/v) (IPG buffer, pH 3-10 linear; GE Life Sciences) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). A hidratação das fitas foi realizada em IPG-Box (GE Life Sciences) a temperatura ambiente por 18 h. As fitas foram focalizadas no sistema Ettan IPGphor 3 (GE Life Sciences), em quatro etapas nas seguintes condições: i) 500 V, 1 h; ii) 800 V, 1 h; iii) 7.000 V; 1 h (gradiente); e iv) 2.200 V (constante). Após a focalização, as fitas foram armazenadas a -80°C até a realização da segunda dimensão.

### **4.2.8.2 Eletroforese (2D-PAGE)**

Para a segunda dimensão (eletroforese), foram realizadas a redução e alquilação das fitas focalizadas anteriormente. Estas foram submetidas à redução através da imersão em tampão de equilíbrio contendo 2% DTT (ditiotretol) e traços de corante bromofenol por 20 min. Decorrido esse tempo, as fitas foram transferidas e imersas em nova solução de equilíbrio contendo 4% de IAA (iodoacetamida) e traços do corante bromofenol por mais 20 min. A segunda dimensão, ou eletroforese, foi realizada no sistema Omniphor MV 20 (Biosystems) em SDS-PAGE 12.5%, utilizando uma fita de IEF por gel, constando das seguintes etapas: 40 mA por 15 min, 80 mA por 30 min, 100 mA por 2:30 h; voltagem fixa de 300 V. Foram obtidos géis em triplicata para cada tratamento analisado (Controle e Gd). Os géis foram mantidos por 30 min em solução fixadora (etanol 40%, ácido

acético 10%) e, posteriormente, imersos na solução de coloração [metanol 20%, ácido acético 5% e água deionizada, solução de azul de *coomassie* (Phastgel Blue R, GE Life Sciences) 50%] durante 18 h. Em seguida, os géis foram submetidos à imersão em solução descorante (etanol 20%, ácido acético 5%) por 15 min, 45 min e duas vezes por 2 h. Após a descoloração, os géis foram armazenados em solução de preservação (ácido acético 5%).

#### 4.2.9 Digitalização e análise de imagens

Os géis foram digitalizados com auxílio de *scanner* de transparência ImageScanner III (GE Life Sciences) calibrado para densidade ótica, utilizando-se o programa LabScan 6.0 (GE Life Sciences) com os seguintes parâmetros: modo de transparência, resolução de 150 DPI e filtro vermelho, ideal para coloração de géis com azul de *Coomassie*. Para a captura da imagem foi realizada previamente uma etapa de calibração do scanner com a fita de calibração Kodak 3, que apresenta valores de densidade ótica ou difusa definidos, conforme procedimentos recomendados pelo fabricante. As imagens dos géis foram analisadas no software de análise ImageMaster 2D Platinum v.7.05 (GE Life Sciences). Todas as triplicatas de géis de cada tratamento, ou réplicas técnicas, foram submetidas aos mesmos parâmetros de análise comparativa para detecção e seleção de *spots* (manchas coradas delimitadas e representativas de proteínas), conforme Pacheco et al. (2013), com inspeção visual para eliminação de interferentes como bolhas e artefatos da coloração. Nas comparações das triplicatas entre os tratamentos, foram selecionados como *spots* diferenciais aqueles que apresentaram razão de variação no parâmetro normalizado porcentagem de volume (%vol)  $\geq 1,5$  e ANOVA

$\leq 0,05$ . Estes *spots* selecionados foram denominados DEPs (proteínas diferencialmente expressas).

#### 4.2.10 Digestão com tripsina

Os *spots* com variação significativa entre tratamentos (proteínas com acúmulo diferencial estatisticamente significativo) foram excisados manualmente de uma das réplicas técnicas (géis) com auxílio de bisturi e incubados em solução descolorante contendo metanol 50% e ácido acético 2,5% durante 18 h, em temperatura ambiente, para remoção do corante. Após desidratação em acetonitrila 100%, as proteínas (*spots*) sofreram redução e em seguida aquilação. Inicialmente, os fragmentos de gel foram reidratados com 10 mM DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 30 min a 60°C. O excesso do líquido foi removido e substituído por 30  $\mu$ L de solução 10 mM IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio. Em seguida, os fragmentos foram mantidos no escuro por 30 min, a temperatura ambiente. O líquido excedente foi então removido, os fragmentos lavados com 100 mM de bicarbonato de amônio e novamente desidratados com acetonitrila 100%. Posteriormente a essas etapas, foram adicionados 30-50  $\mu$ L (até cobrir o fragmento de gel) de solução com 20 ng/ $\mu$ L de tripsina para digestão da proteína, e as amostras foram incubadas em gelo por 30 min. Depois da reidratação, foi adicionada solução de bicarbonato de amônio 50 mM cobrindo todo o fragmento de gel, e a digestão mantida a 37°C por 16 h. Após este período, foram acrescentados à solução anterior 30-50  $\mu$ L (até cobrir o fragmento de gel) de solução de extração [5% de ácido trifluoroacético (TFA) em 50% de acetonitrila], incubada por 1 h em gelo e centrifugada até 10.000xg para coleta e transferência do sobrenadante para outro tubo. A extração foi efetuada duas vezes. O sobrenadante de cada *spot* foi

concentrado em concentrador a vácuo (*Speed-vac*, Eppendorf) e armazenado a -20°C até a realização das análises por espectrometria de massas.

#### **4.2.11 Espectrometria de massas**

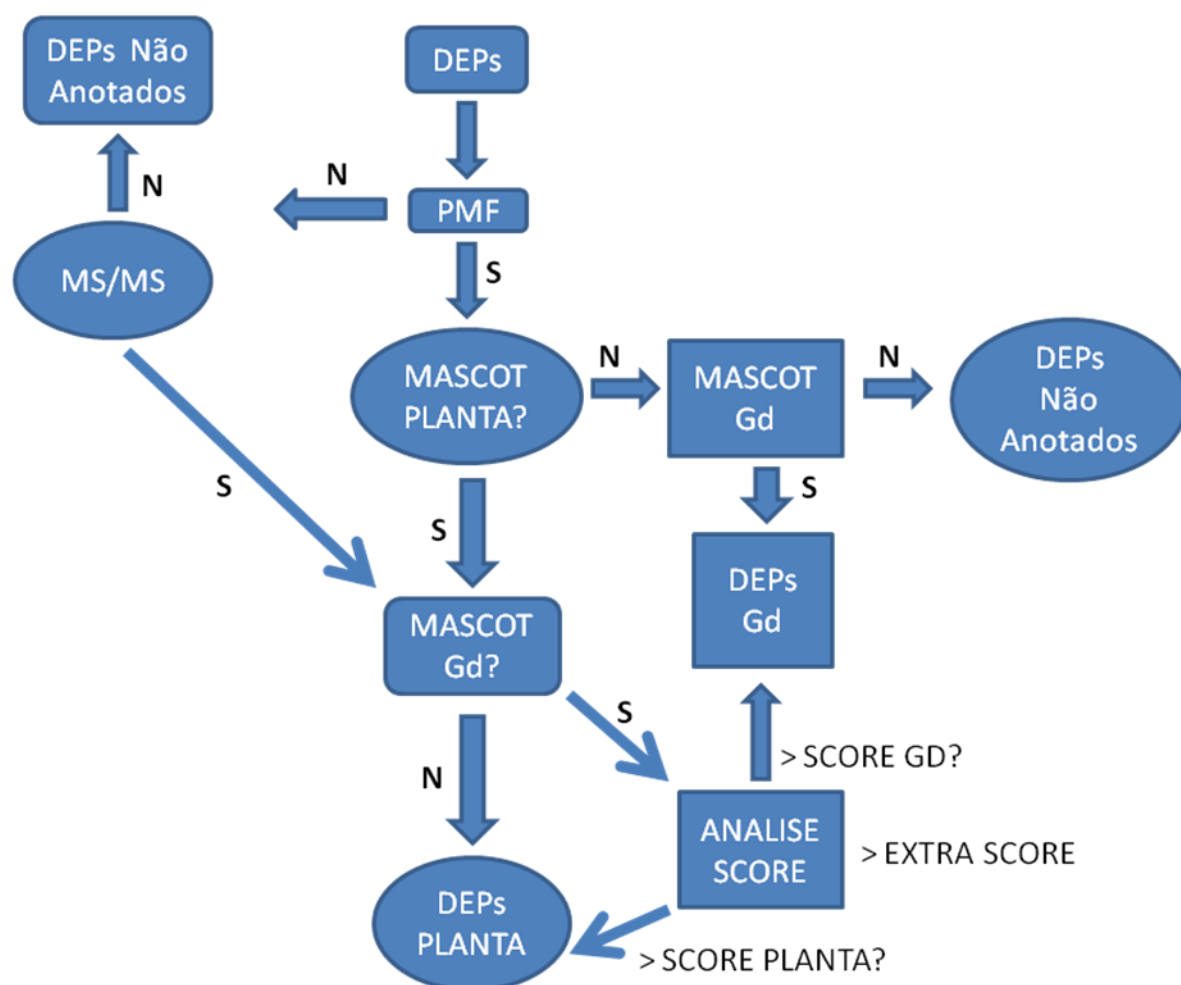
Os espectros MS e MS/MS foram obtidos em espectrômetro Autoflex III MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonics) disponibilizado pela Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, CETENE, Recife-PE, usando matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma/C8982) e conforme os protocolos de análise padronizados de: tipagem por massa de peptídeos (PMF - *peptide mass fingerprinting*; método refletido positivo RP\_Proteomics\_HPC) e busca de íons (*ion search*, método LIFT). Os íons foram acelerados a 19 KV, laser Nd:YAG smartbeam 355 nm, 100 Hz.

#### **4.2.12 Análises de bioinformática**

##### **4.2.12.1 Identificação presumível**

Para MS, os espectros foram identificados através da análise dos arquivos *peaklist.xml* no software Mascot (Matrix Inc.) pelo método de PMF contra os bancos de dados de: i) cana-de-açúcar (*Saccharum\_7061*) e Gd (*Gd\_proteome*) disponibilizados em colaboração com o Laboratório de Espectrometria de Massas Dalton (<http://daltonlab.iqm.unicamp.br>), do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, coordenado pelo Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo; e ii) Viridiplantae e Proteobacteria disponíveis na versão *online* do Mascot (<http://www.matrixscience.com>); utilizando-se os seguintes parâmetros: base de dados: Swissprot, *Saccharum\_7061* ou *Gd\_proteome*; taxonomia: Viridiplantae ou

Proteobacteria; modificação fixa: carbamidometil (C); modificação variável: oxidação (M); e tolerância 200 ppm. Para a análise de dados MS/MS, realizada para as amostras não identificáveis via PMF, os espectros foram identificados através da análise dos respectivos arquivos *peaklist.xml* pelo método de busca de íons (*ion search*) contra os mesmos bancos de dados e parâmetros citados anteriormente, exceto: tolerância MS/MS 0,6 Da; e valor específico de massa/carga ( $m/z$ ) de cada respectivo íon precursor. Foram consideradas significativas as identificações com *score* maior que o valor limite (*cut-off*). O *score* equivale a  $-10 \cdot \log(P)$ , sendo P a probabilidade de a similaridade encontrada ser ao acaso. Valores de *score* acima do valor limite têm significância estatística ( $p < 0,05$ ). A identificação de DEPs em bancos de dados de origem vegetal ou bacteriana seguiu o fluxograma apresentado na Figura 2, para discriminar proteínas produzidas pela cana-de-açúcar ou por Gd, e resultou na anotação de cada DEP associado a acessos do banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org>) e os respectivos descritores.



**Figura 2.** Fluxograma da análise de identificação dos DEPs/MS (Proteínas diferencialmente expressas/Espectrometria de massa); PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*); MS/MS (Espectrometria de massa em *Tandem*). A base de dados de plantas refere-se sequencialmente ao banco de dados de cana-de-açúcar (*Saccharum\_7061*, Laboratório MS Dalton - <http://daltonlab.iqm.unicamp.br>, IQ-Unicamp) e Viridiplantae/Swissprot. A base de dados de Gd refere-se sequencialmente ao banco de dados de *G. diazotrophicus* (Gd\_proteome, Laboratório MS Dalton - <http://daltonlab.iqm.unicamp.br>, IQ-Unicamp) e Proteobacteria/Swissprot.

#### 4.2.12.2 Ontologia gênica (GO)

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas do UniProt através da ferramenta *Retrieve ID* e submetidas à análise de distribuição de ontologia gênica (GO) por processo biológico, e mapeadas comparativamente na espécie modelo *Arabidopsis thaliana* com o programa MapMan-Mercator (Lohse *et al.*, 2014; <http://mapman.gabipd.org/web/guest/>

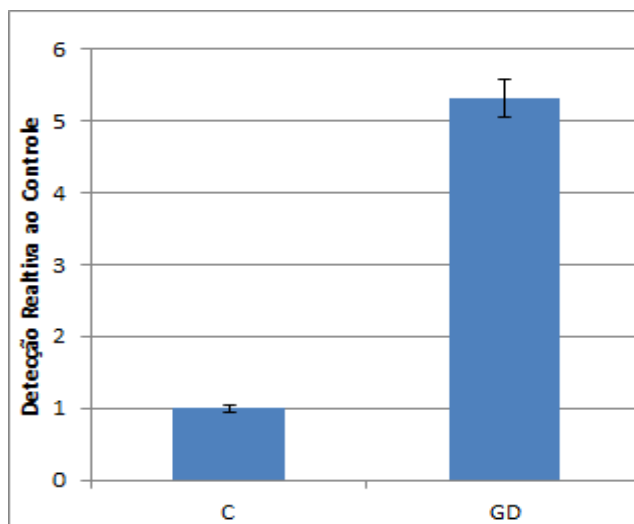
mercator) ajustado para base de dados de *A. thaliana* (TAIR proteins release 10) e *Blast\_cutoff* 80%. A distribuição de termos GO, ou categorias funcionais, do conjunto de DEPs de cada tratamento foi utilizada na comparação entre o controle (plantas não inoculadas com Gd) e plantas inoculadas com Gd.

Adicionalmente, foi realizada análise de enriquecimento de termos de GO no programa Panther (Mi *et al.*, 2013; <http://www.pantherdb.org>, acessado de <http://geneontology.org>) com parâmetros padronizados para mapeamento no banco de dados de proteínas/GO de *A. thaliana*. Para esta análise, cada acesso UniProt identificador das DEPs de cana-de-açúcar foi necessariamente mapeado para seu acesso UniProt mais similar no proteoma de *A. thaliana*, através do alinhamento das respectivas sequências FASTA no programa BLASTP/NCBI (parâmetros: database UniProtKB/Swissprot; organismo *A. thaliana* (taxid:3702); *e-value*  $\leq 10^{-5}$ ). O conjunto de DEPs mais acumulados no tratamento inoculado com Gd foi considerado como lista de análise (*analyzed list*), a qual foi comparada com: i) o conjunto de DEPs mais acumulados no tratamento não inoculado com Gd ou controle; e ii) proteoma de referência obtido a partir do genoma de *A. thaliana*. O tipo de análise realizada no programa Panther foi o teste de super-representação, com correção de Bonferroni e base de dados de ontologia (completa para processos biológicos) atualizada em junho/2015.

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Confirmação da inoculação com *G. diazotrophicus*

Foi realizada a extração de DNA total da folha +1 de todas as réplicas biológicas de cada tratamento para confirmação da presença da *Gluconacetobacter diazotrophicus*, através da técnica de *nested*-PCR (Franke-Whittle *et al.*, 2005) para detectar baixa quantidade de DNA bacteriano na amostra. No entanto, não foi possível obter produto de amplificação visualmente detectável, nem mesmo com maior número de ciclos e/ou teste em gradiente de temperatura de anelamento dos *primers*. Já pelo método de qPCR, as análises para detecção de Gd mostraram que as plantas inoculadas com a bactéria apresentaram valores de quantificação cerca de cinco vezes maiores que aqueles encontrados nas folhas de plantas controle não inoculadas (Figura 3). Esses dados confirmaram carga bacteriana cinco vezes maior nas plantas inoculadas.



**Figura 3.** Quantificação relativa por PCR em tempo real (qPCR) das amostras de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GD) em relação ao controle de plantas não inoculadas (C).

#### 4.3.2 Variáveis morfométricas

Ao contrário do esperado, nenhuma variável morfométrica apresentou diferença significativa entre tratamentos (Tabela 1), apenas tendência de maior crescimento foliar e multiplicação vegetativa devido a possíveis efeitos promotores de crescimento típicos de alguns micro-organismos fixadores de nitrogênio. Os resultados podem ser discutidos em relação à idade das plantas: na coleta, estavam com quatro meses, muito anterior à idade de oito meses no qual os efeitos fenotípicos da simbiose de cana-de-açúcar com diazotróficos, tais como ganho de biomassa, altura de planta, são geralmente mensurados (Pereira *et al.*, 2013).

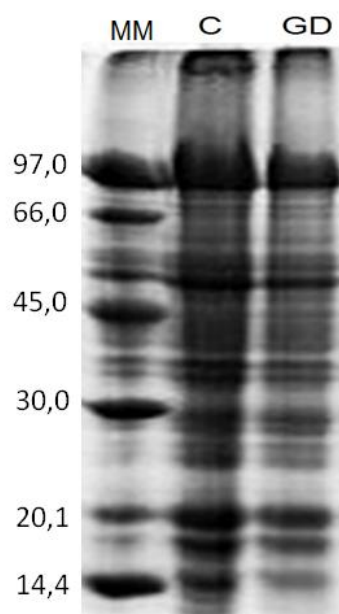
Em relação às plantas controle, os indivíduos inoculados com Gd mostraram aumento no comprimento da folha+1 (4%) e no número de perfilhos (5,5%), apesar da diminuição observada da altura da planta (7%). Entretanto, esta análise indicou possíveis efeitos fenotípicos da interação entre a cana-de-açúcar e o simbionte bacteriano utilizado.

**Tabela 1.** Médias das variáveis morfométricas de cana-de-açúcar aos 120 dias após inoculação ou não com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd). Valores acompanhados pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

| Variáveis                    | Controle | Gd     | Diferença | Variação % |
|------------------------------|----------|--------|-----------|------------|
| Comprimento da Folha +1 (cm) | 68,0 a   | 70,8 a | 2,80      | 4,12       |
| Altura da planta (m)         | 1,25 a   | 1,16 a | -0,09     | -7,19      |
| Diâmetro do entrenó 4 (cm)   | 2,46 a   | 2,46 a | 0         | 0          |
| Nº de entrenós               | 8,6 a    | 8,6 a  | 0         | 0          |
| Nº de perfilhos              | 3,6 a    | 3,8 a  | 0,20      | 5,56       |

### 4.3.3 Extração de proteínas

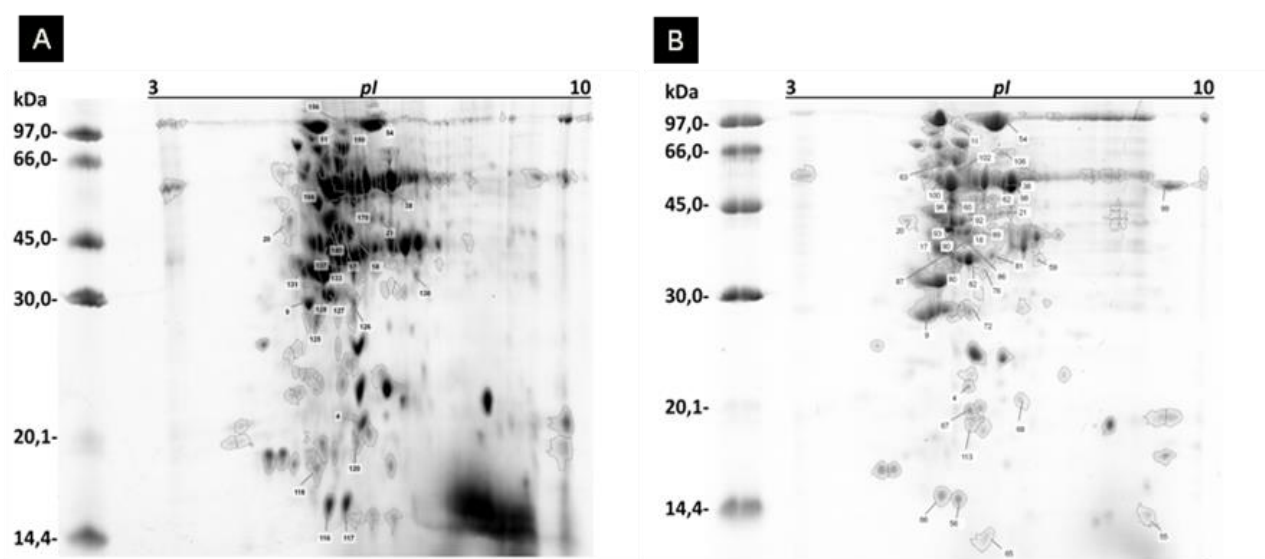
O protocolo descrito por Hurkman e Tanaka (1986) e modificado por Boaretto (2012) para extração de proteínas totais foliares possibilitou recuperar e solubilizar proteínas em uma grande amplitude de massa molecular apontando para a integridade e baixa concentração de interferentes, compatível com as análises posteriores. Realizaram-se cinco extrações de proteínas independentes, correspondendo a cada réplica biológica. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos independentemente e, posteriormente, agrupados em um único tubo (Figura 4). O agrupamento das amostras visou reduzir a variação biológica, aumentando a capacidade de detecção de diferenças entre os tratamentos (Diz *et al.*, 2009). Outra vantagem dessa metodologia é permitir a análise de maior número de amostras em menor tempo e consumo de material.



**Figura 4.** SDS-PAGE de proteínas solúveis totais de amostras de folha de cana-de-açúcar não inoculadas (C) e inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd). Marcador de alto peso molecular (MM), em kDa.

#### 4.3.4 Eletroforese bidimensional (2D)

Foram obtidos três géis 2D-PAGE (réplicas técnicas) das réplicas biológicas reunidas de cada tratamento analisado para a variedade de cana-de-açúcar RB867515, inoculada ou não com Gd. Exemplos destes géis são mostrados na Figura 5. Cada gel foi digitalizado em *scanner* de transparência calibrado para densidade ótica, e os arquivos de imagem foram utilizados para análise no programa ImageMaster Platinum v.7.05.



**Figura 5.** Imagens de géis 2D-PAGE com localização de *spots* utilizando extrato de proteínas totais de folha da variedade RB867515. A) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar não inoculadas (Controle), B) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd).

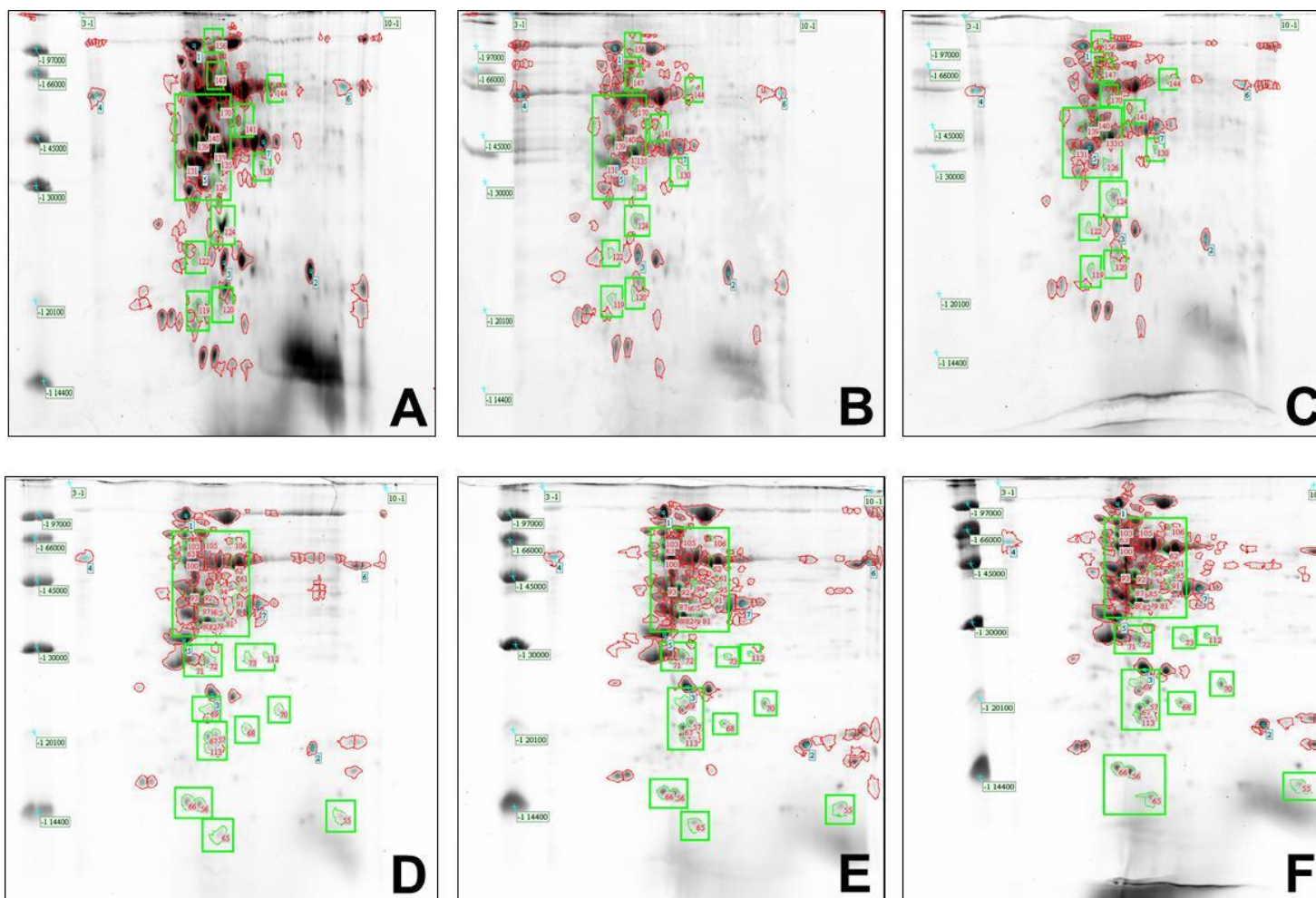
#### 4.3.5. Digitalização e análise de imagens

Os arquivos de imagem digitalizados foram analisados no programa ImageMaster Platinum v.7.05. Foi observado que as réplicas de um mesmo tratamento apresentaram similaridade significativa e foram, portanto analisáveis, conforme a média de coeficientes de correlação obtida de 0,857 no tratamento controle e 0,822 no tratamento inoculado com Gd.

A eletroforese 2D permitiu a detecção de 977 *spots* nas amostras de réplicas técnicas dos tratamentos, distribuídos em média a 162 *spots*/gel (variando de 146 a 187) no tratamento controle e 164 *spots*/gel (variando de 137 a 183) no tratamento inoculado com Gd.

Após a análise comparativa entre os tratamentos das imagens digitalizadas (Figura 6), foram detectados 173 *spots* representativos de proteínas distintas, dos quais 58 foram detectados apenas no tratamento não inoculado com Gd e 60 foram detectados apenas em plantas inoculadas com Gd (Tabela 2). Dentre estes *spots*, denominados como exclusivos por não terem sido detectados via 2D-PAGE no outro tratamento, alguns não foram coletados por não apresentarem variação significativa na %vol (ANOVA  $\leq 0,05$ ) entre tratamentos.

Os demais 55 *spots* foram detectados em ambos os tratamentos (comuns), dos quais 30 tiveram maior acúmulo no controle não inoculado e 25 apresentaram maior acúmulo em plantas inoculadas com Gd. Dos 30 *spots* comuns com maior acúmulo no tratamento controle, apenas 10 apresentaram variação significativa na %vol (ANOVA  $\leq 0,05$ ) e, destes, apenas cinco tiveram razão de variação (*ratio*)  $\geq 1,5$ . No tratamento inoculado com Gd, oito dos 25 *spots* comuns foram significativamente variáveis, dos quais sete também tiveram (*ratio*)  $\geq 1,5$ . Deste modo, foram excisados dos géis 91 *spots* considerados DEPs, para identificação via MS.



**Figura 6.** Imagens de 2D-PAGE digitalizadas e após determinação de spots comuns (verdes) e exclusivos (vermelhos) em análise no programa ImageMaster Platinum 7.05. A, B e C: 2D-PAGE de amostras não inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus*; D, E e F: 2D-PAGE de amostras inoculadas com Gd.

**Tabela 2.** Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol  $\geq 1,5$  para cada tratamento controle (não inoculado) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (inoculado).

| Descrição                 | Tratamentos   |           |
|---------------------------|---------------|-----------|
|                           | Não inoculado | Inoculado |
| Spots analisados          | 88            | 85        |
| Média/réplica             | 162           | 164       |
| Comuns                    | 55            | 55        |
| Maior acúmulo             | 30            | 25        |
| ANOVA $\leq 0,05$         | 10            | 8         |
| e <i>ratio</i> $\geq 1,5$ | 5             | 7         |
| Exclusivos <sup>1</sup>   | 58            | 60        |
| ANOVA $\leq 0,05$         | 32            | 47        |
| DEPs <sup>2</sup>         | 37            | 54        |

<sup>1</sup>Não detectados no outro tratamento por 2D-PAGE.

<sup>2</sup>Proteínas diferencialmente expressas (*spots* comuns com ANOVA significativa e *Ratio*  $\geq 1,5$  + exclusivos com ANOVA significativa).

#### 4.3.6. Espectrometria de massas (PMF, MS/MS)

Os DEPs selecionados a partir da análise comparativa em 2D-PAGE foram analisados em espectrometria de massas para sua identificação presumível em banco de dados de acesso público. Foram obtidos espectros de massa conforme descrito na Tabela 3. Na análise realizada em espectrômetro MALDI-ToF/ToF via PMF e busca de íons, apenas quatro amostras do total de 91 digeridas com tripsina não resultaram em espectros de massa com qualidade necessária para análise no programa Mascot. A análise complementar por sequenciamento *de novo* das 22 DEPs não identificadas está em andamento (dados não apresentados).

**Tabela 3.** Tabela de eficiência da análise em espectrometria de massas para os DEPs selecionados para identificação.

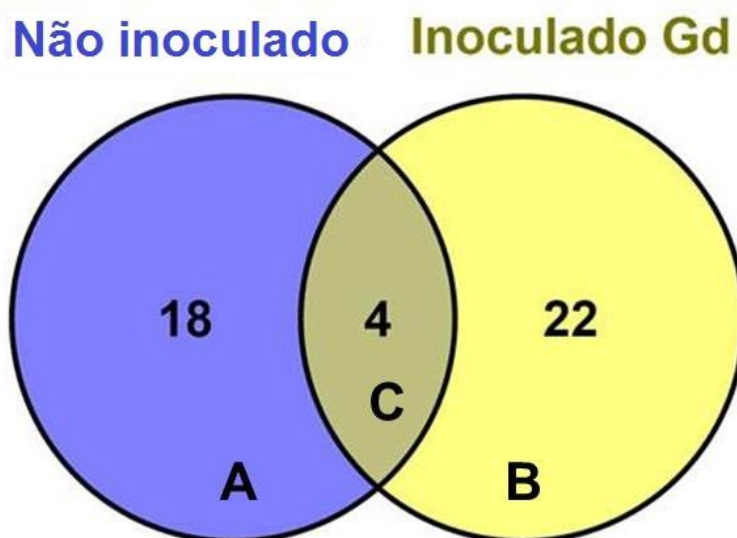
| <b>Descrição</b>               | <b>Total</b> | <b>%</b> |
|--------------------------------|--------------|----------|
| Deps coletados                 | 91           | 100,00   |
| Analizados PMF                 | 91           | 100,00   |
| Analisáveis                    | 87           | 97,80    |
| Identificados <sup>1</sup>     | 63           | 69,23    |
| Não identificados <sup>2</sup> | 24           | 28,57    |
| Analizados MS/MS               | 24           | 28,57    |
| Analisáveis                    | 24           | 28,57    |
| Identificados <sup>1</sup>     | 2            | 2,20     |
| Não identificados <sup>2</sup> | 22           | 26,37    |
| Anotados                       | 65           | 71,43    |
| Não identificados              | 22           | 26,37    |

<sup>1</sup>Com score Mascot significativo ( $p < 0,05$ )

<sup>2</sup>Sem score Mascot significativo ( $p > 0,05$ )

#### 4.3.7. Análises de Bioinformática

Conforme descrito anteriormente (Tabela 3), *spots* detectados e selecionados como significativamente variáveis entre tratamentos (DEPs) foram submetidos à análise por espectrometria de massas para obtenção de espectros com perfil *m/z* específicos, visando identificação presumível (*in silico*) e anotação em bancos de dados, para inferências funcionais potencialmente relacionadas com respostas moleculares da cana-de-açúcar aos tratamentos. A distribuição das anotações obtidas (Figura 7) demonstrou uma quantidade pouco maior de DEPs no tratamento inoculado com Gd do que no tratamento controle, não inoculado. Ao contrário do esperado para um diagrama de Venn com estes tipos de dados, ou seja, com proteínas diferencialmente acumuladas em cada um dos conjuntos comparados, houve sobreposição de anotações entre DEPs de ambos os tratamentos: quatro anotações foram iguais para *spots* diferentes oriundos dos dois tratamentos (proteínas Q6ENV5, J9QE65, Q6ENV6, P0C1M0).



**Figura 7.** Diagrama de Venn representando as anotações de *spots* diferencialmente expressos na folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 nos tratamentos controle (não inoculado, A) ou inoculado com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (B), e identificados como proteínas da planta hospedeira. As quatro anotações comuns no diagrama (C) referem-se às mesmas anotações para *spots* diferentes (proteínas Q6ENV5, J9QE65, Q6ENV6, P0C1M0). Os conjuntos A, B e C correspondem às identificações na Tabela 5.

#### 4.3.7.1 Identificação presumível e anotação das DEPs

A identificação das proteínas selecionadas como diferenciais é apresentada nas Tabelas 4, 5 e 6, obtida através da análise dos arquivos *peaklist.xml* oriundos de PMF e/ou MS/MS no programa Mascot e considerando apenas as associações significativas ( $p \leq 0,05$ ). Com base no fluxograma da Figura 2, as proteínas foram presumivelmente discriminadas por organismo de origem, ou seja, cana-de-açúcar, *G. diazotrophicus* ou indeterminado, de acordo com a maior similaridade estatística obtida com o programa Mascot.

**Tabela 4.** Distribuição da identificação obtida para as DEPs selecionadas, conforme táxon de maior similaridade pela análise no programa Mascot.

| Descrição                | DEPS  |        |
|--------------------------|-------|--------|
|                          | Total | %      |
|                          | 87    | 100,00 |
| Com identificação        | 65    | 74,71  |
| Viridiplantae            | 55    | 63,22  |
| Poaceae                  | 36    | 41,38  |
| <i>Saccharum</i>         | 28    | 32,18  |
| Proteobacteria           | 10    | 11,49  |
| <i>Gluconacetobacter</i> | 7     | 8,05   |
| Sem identificação        | 22    | 25,29  |

**Tabela 5.** Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE.

| Spot ID                      | Ratio Gd/C | ANOVA   | Categoria GO        | Acesso     | Proteína                                      | Score | Organismo                    | pI    |      | MM (Da) |         |
|------------------------------|------------|---------|---------------------|------------|-----------------------------------------------|-------|------------------------------|-------|------|---------|---------|
| Mais abundantes controle (A) |            |         |                     |            |                                               |       |                              | Calc. | Obs. | Calc.   | Obs.    |
| 38                           | 0,159      | 0,00967 | Fotossíntese        | Q6ENV5*    | RuBisCO <sup>1</sup> subunidade maior         | 193   | <i>Saccharum officinarum</i> | 6,33  | 6,78 | 53.323  | 55.972  |
| 116                          | Excl.      | 0,00294 |                     | J9QE65*    | RuBisCO subunidade menor                      | 123   | <i>Saccharum hybrid</i> GT28 | 9,04  | 5,79 | 19.252  | 17.139  |
| 117                          | Excl.      | 0,00196 |                     | Q41373     | RuBisCO subunidade menor                      | 70    | <i>S. hybrid</i>             | 9,04  | 6,07 | 19.252  | 17.192  |
| 118                          | Excl.      | 0,00316 |                     | Q41373     | RuBisCO subunidade menor                      | 86    | <i>S. hybrid</i>             | 8,47  | 5,58 | 18.904  | 19.421  |
| 137                          | Excl.      | 0,03846 |                     | A0A059PZZ1 | Fator de estabilidade/montagem do PSII        | 53    | <i>S. hybrid</i> R570        | 8,71  | 5,82 | 43.036  | 41.722  |
| 156                          | Excl.      | 0,00018 |                     | Q8H1X3     | C4 PEP-carboxilase                            | 147   | <i>S.hybrid</i> cultivar     | 5,91  | 6,06 | 108.931 | 103.194 |
| 20                           | 0,493      | 0,03599 | Metabolismo/Energia | O49939     | Peptidil-prolil cis-trans-isomerase           | 71    | <i>Spinacia oleracea</i>     | 5,29  | 5,12 | 50.069  | 45.092  |
| 18                           | 0,646      | 0,04740 |                     | P12860     | Gliceraldeído-3-P desidrogenase B             | 58    | <i>S. oleracea</i>           | 6,72  | 6,09 | 48.552  | 42.986  |
| 126                          | Excl.      | 0,00059 |                     | B4FFX7     | Proteassomo subunidade $\alpha$               | 84    | <i>Zea mays</i>              | 5,53  | 6,11 | 25.848  | 30.480  |
| 128                          | Excl.      | 0,00603 |                     | A4QLK1     | ATP sintase $\beta$                           | 62    | <i>Lobularia maritima</i>    | 5,69  | 5,57 | 53.968  | 31.755  |
| 140                          | Excl.      | 0,00026 |                     | P85087     | Glutamina sintetase                           | 89    | <i>Vitis sp.</i>             | 5,51  | 5,89 | 39.183  | 45.628  |
| 166                          | Excl.      | 0,03659 |                     | Q6ENV6*    | ATP sintase $\beta$                           | 198   | <i>S. officinarum</i>        | 5,31  | 5,85 | 53.987  | 55.380  |
| 170                          | Excl.      | 0,00074 |                     | P12783     | Fosfoglicerato quinase                        | 89    | <i>Triticum aestivum</i>     | 5,64  | 6,18 | 42.153  | 53.368  |
| 133                          | Excl.      | 0,00064 |                     | P0C1M0*    | ATP sintase $\gamma$                          | 74    | <i>Zea mays</i>              | 8,44  | 6,04 | 40.107  | 38.730  |
| 4                            | 0,293      | 0,02394 | Desenvolvimento     | Q9C578     | RNA- 3'-P ciclase                             | 58    | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 7,66  | 6,18 | 41.134  | 21.661  |
| 125                          | Excl.      | 0,01907 |                     | Q84WU4     | Golgina 3                                     | 60    | <i>A. thaliana</i>           | 5,96  | 5,58 | 81.731  | 28.166  |
| 130                          | Excl.      | 0,00071 |                     | P56363     | Proteína ribossômica L14 50S                  | 61    | <i>Chlorella vulgaris</i>    | 11,07 | 7,20 | 13.499  | 34.580  |
| 131                          | Excl.      | 0,00010 |                     | A0A059Q2A9 | Proteína 14-3-3                               | 91    | <i>Saccharum hybrid</i> R570 | 4,72  | 5,42 | 29.032  | 35.086  |
| 120                          | Excl.      | 0,00150 | Resposta Estresse   | Q9FMV7     | Citocromo P450 94B1                           | 75    | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 8,89  | 6,21 | 58.201  | 21.023  |
| 143                          | Excl.      | 0,02520 |                     | Q9C635     | Fator de transcrição por estresse térmico B-4 | 58    | <i>A. thaliana</i>           | 5,98  | 7,30 | 53.708  | 39.705  |

| Spot ID                       | Ratio Gd/C | ANOVA   | Categoria GO        | Acesso     | Proteína                                        | Score | Organismo                                  | pI   |       | MM (Da) |        |
|-------------------------------|------------|---------|---------------------|------------|-------------------------------------------------|-------|--------------------------------------------|------|-------|---------|--------|
| 150                           | Excl.      | 0,02569 | Transporte          | D8L841     | D-sorbitol-6-P desidrogenase dependente de NADP | 54    | <i>Saccharum</i> hybrid cultivar           | 6,14 | 6,04  | 101.853 | 89.354 |
| 127                           | Excl.      | 0,01152 | Desconhecida        | A0A059Q0N5 | Proteína desconhecida                           | 54    | <i>S.hybrid</i> R570                       | 9,00 | 5,80  | 16.731  | 30.403 |
| 172                           | Excl.      | 0,01117 |                     | A0A059Q001 | Proteína desconhecida                           | 52    | <i>S. hybrid</i> R570                      | 7,04 | 10,08 | 31.089  | 18.332 |
| Mais abundantes inoculado (B) |            |         |                     |            |                                                 |       |                                            |      |       |         |        |
| 9                             | 3,618      | 0,00020 | Fotossíntese        | P84990     | Proteína de ligação à clorofila a-b 2           | 59    | <i>Populus euphratica</i>                  | 8,20 | 5,41  | 3.799   | 28.659 |
| 54                            | 1,790      | 0,01795 |                     | Q8L6C3     | PEP carboxilase                                 | 123   | <i>Saccharum spontaneum</i>                | 5,91 | 6,51  | 108.931 | 95.861 |
| 55                            | Excl.      | 0,00113 |                     | O65194     | RuBisCO subunidade menor                        | 35    | <i>Medicago sativa</i>                     | 8,86 | 9,02  | 20.466  | 14.107 |
| 56                            | Excl.      | 0,00025 |                     | J9QE65*    | RuBisCO subunidade menor                        | 87    | <i>Saccharum</i> hybrid GT28               | 9,04 | 5,87  | 19.252  | 14.912 |
| 62                            | Excl.      | 0,00047 |                     | Q6ENV5*    | RuBisCO subunidade maior                        | 201   | <i>S. officinarum</i>                      | 6,33 | 6,66  | 53.323  | 51.131 |
| 63                            | Excl.      | 0,00000 |                     | Q6ENP6     | Proteína Fe-S do centro de reação do PSI        | 58    | <i>S. officinarum</i>                      | 6,51 | 5,61  | 9.419   | 60.831 |
| 65                            | Excl.      | 0,00065 |                     | Q6ENP6     | Proteína Fe-S do centro de reação do PSI        | 80    | <i>S. officinarum</i>                      | 6,51 | 6,32  | 9.406   | 13.247 |
| 66                            | Excl.      | 0,00044 |                     | J9QE65*    | RuBisCO subunidade menor                        | 62    | <i>Saccharum</i> hybrid GT28               | 9,04 | 5,61  | 19.252  | 15.094 |
| 81                            | Excl.      | 0,00040 |                     | J9QCY8     | Ferredoxina-NADP redutase                       | 107   | <i>S. hybrid</i> GT28                      | 7,53 | 6,46  | 40.525  | 35.130 |
| 98                            | Excl.      | 0,01636 |                     | Q6ENV5*    | RuBisCO subunidade maior                        | 233   | <i>S. officinarum</i>                      | 6,33 | 6,82  | 53.323  | 51.212 |
| 113                           | Excl.      | 0,00063 |                     | I3V633     | Subunidade Fe-S do complexo citocromo b6-f      | 67    | <i>Saccharum</i> hybrid ROC22              | 5,61 | 6,09  | 17.714  | 18.848 |
| 24                            | 5,262      | 0,02301 | Metabolismo/Energia | W8SJN1     | 6-fosfogluconato desidrogenase                  | 57    | <i>Saccharum</i> hybrid Yacheng05-179      | 8,50 | 6,61  | 52.894  | 45.885 |
| 59                            | Excl.      | 0,04466 |                     | H9B8E3     | Gliceraldeído-3-P desidrogenase                 | 80    | <i>Miscanthus sinensis</i>                 | 7,00 | 7,28  | 43.182  | 36.685 |
| 72                            | Excl.      | 0,00121 |                     | P56296     | ATP sintase β                                   | 60    | <i>Chlorella vulgaris</i>                  | 9,60 | 6,07  | 19.863  | 27.873 |
| 77                            | Excl.      | 0,00299 |                     | W0F9T0     | Lactoilglutaciona liase                         | 57    | <i>Saccharum</i> hybrid cultivar           | 5,44 | 5,82  | 33.005  | 34.106 |
| 80                            | Excl.      | 0,00000 |                     | Q40677     | Frutose-bisfosfato aldolase                     | 96    | <i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i> | 6,38 | 5,98  | 42.208  | 34.937 |
| 82                            | Excl.      | 0,00013 |                     | Q40677     | Frutose-bisfosfato aldolase                     | 93    | <i>O. sativa</i> subsp. <i>japonica</i>    | 6,38 | 6,08  | 42.208  | 34.793 |
| 86                            | Excl.      | 0,00037 |                     | P0C1M0*    | ATP sintase γ                                   | 74    | <i>Zea mays</i>                            | 8,44 | 6,09  | 40.107  | 37.799 |
| 87                            | Excl.      | 0,00038 |                     | P0C1M0*    | ATP sintase γ                                   | 72    | <i>Z. mays</i>                             | 8,44 | 5,93  | 40.107  | 38.146 |
| 89                            | Excl.      | 0,01459 |                     | Q39769     | Gliceraldeído-3-P desidrogenase                 | 62    | <i>Ginkgo biloba</i>                       | 6,34 | 6,22  | 36.917  | 39.397 |
| 95                            | Excl.      | 0,00012 |                     | C7IVU0     | Álcool desidrogenase 1                          | 52    | <i>Saccharum</i> hybrid cultivar           | 6,76 | 6,28  | 43.757  | 41.675 |
| 96                            | Excl.      | 0,01490 |                     | Q07511     | Formato desidrogenase                           | 60    | <i>Solanum tuberosum</i>                   | 6,64 | 5,84  | 42.297  | 48.583 |

| Spot ID | Ratio Gd/C | ANOVA   | Categoria GO      | Acesso     | Proteína                                   | Score | Organismo                    | pI   |      | MM (Da) |        |
|---------|------------|---------|-------------------|------------|--------------------------------------------|-------|------------------------------|------|------|---------|--------|
| 100     | Excl.      | 0,00136 |                   | Q6ENV6*    | ATP sintase $\beta$                        | 143   | <i>Saccharum officinarum</i> | 5,31 | 5,60 | 53.987  | 53.478 |
| 102     | Excl.      | 0,02104 |                   | Q6ENW6     | ATP sintase $\alpha$                       | 241   | <i>S. officinarum</i>        | 5,87 | 5,90 | 55.713  | 58.035 |
| 105     | Excl.      | 0,00126 |                   | A0A059PZ74 | Fosfoglucomutase                           | 66    | <i>Saccharum hybrid R570</i> | 6,00 | 5,39 | 63.754  | 63.202 |
| 60      | Excl.      | 0,01122 | Desenvolvimento   | Q5XPX5     | Actina                                     | 75    | <i>S. officinarum</i>        | 5,31 | 5,83 | 41.844  | 45.595 |
| 99      | Excl.      | 0,02809 |                   | Q8SAT1     | Fator de alongação da tradução 1- $\alpha$ | 57    | <i>S. officinarum</i>        | 9,68 | 9,68 | 62.072  | 51.004 |
| 67      | Excl.      | 0,00002 | Resposta/Estresse | -          | Resposta a estresse 1                      | 104   | <i>Arachis hypogaea</i>      | 5,96 | 6,07 | 20.558  | 19.744 |
| 68      | Excl.      | 0,00019 |                   | -          | Resposta a estresse 2                      | 31    | <i>A. thaliana</i>           | 5,81 | 6,90 | 50.098  | 20.450 |
| 90      | Excl.      | 0,03703 |                   | Q8LL03     | Inibidor de tripsina                       | 93    | <i>Arachis hypogaea</i>      | 6,66 | 5,77 | 25.768  | 40.113 |
| 92      | Excl.      | 0,00008 |                   | Q8LL03     | Inibidor de tripsina                       | 124   | <i>A. hypogaea</i>           | 6,66 | 5,98 | 25.768  | 41.609 |
| 106     | Excl.      | 0,00053 |                   | P43237     | Proteína alergênica Ara h1                 | 99    | <i>A. hypogaea</i>           | 6,62 | 6,68 | 71.701  | 66.007 |

<sup>†</sup>Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase; Excl.: exclusivo, ou detectado apenas no tratamento com maior abundância; \*Anotação presumível comum a diferentes proteínas de ambos os tratamentos.

Foi observada a identificação significativa de sete proteínas selecionadas como diferenciais com acessos de Gd, assim como de outras três proteínas com acessos de proteobactérias (Tabela 6), especificamente *Methylobacillus flagellatus* (estirpe KT / ATCC 51484 / DSM 6875), *Nitratiruptor* sp. (estirpe SB155-2) e *Rickettsia akari* (estirpe Hartford).

**Tabela 6.** Anotação presumível das DEPs de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e outras proteobactérias, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado (Gd) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE.

| Spot ID                     | Ratio Gd/C | ANOVA     | Acesso  | Proteína                      | Score | Organismo                                            | pI    |       | MM (Da) |        |
|-----------------------------|------------|-----------|---------|-------------------------------|-------|------------------------------------------------------|-------|-------|---------|--------|
| Mais abundante no controle  |            |           |         |                               |       |                                                      | Calc. | Obs.  | Calc.   | Obs.   |
| 13                          | 0,516      | 0,0021296 | A9HK18  | Desacilase dependente de NAD  | 60    | <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> <sup>1</sup> | 6,34  | 5,94  | 36.917  | 42.523 |
| 119                         | Excl.      | 0,0006090 | A9H9F0  | Proteína desconhecida         | 48    | <i>G. diazotrophicus</i>                             | 5,75  | 11,58 | 19.976  | 27.256 |
| 122                         | Excl.      | 0,0013602 | A9HLG2  | Serina-tRNA ligase            | 49    | <i>G. diazotrophicus</i>                             | 5,72  | 5,63  | 23.410  | 46.631 |
| 123                         | Excl.      | 0,0022476 | A9HG52  | Proteína desconhecida         | 54    | <i>G. diazotrophicus</i>                             | 6,07  | 7,16  | 23.410  | 49.786 |
| 124                         | Excl.      | 0,0013595 | Q1GXM8  | ATP sintase $\alpha$          | 77    | <i>Methylobacillus flagellatus</i> <sup>2</sup>      | 6,33  | 5,69  | 26.004  | 55.270 |
| 132                         | Excl.      | 0,0228993 | A9HNNH6 | Proteína desconhecida         | 50    | <i>G. diazotrophicus</i>                             | 6,72  | 8,89  | 39.899  | 37.114 |
| Mais abundante no inoculado |            |           |         |                               |       |                                                      |       |       |         |        |
| 51                          | 16,235     | 0,0002778 | -       | Resposta a estresses 3        | 66    | <i>G. diazotrophicus</i>                             | 6,14  | 5,99  | 101.853 | 89.728 |
| 61                          | Excl.      | 0,0000001 | A6Q3B4  | $\gamma$ -glutamil-P redutase | 66    | <i>Nitratiruptor</i> <sup>3</sup> sp.                | 6,76  | 5,49  | 47.296  | 45.728 |
| 76                          | Excl.      | 0,0015895 | -       | Resposta a estresse 4         | 53    | <i>G. diazotrophicus</i>                             | 6,32  | 6,29  | 80.690  | 33.165 |
| 93                          | Excl.      | 0,0002130 | A8GMF9  | Chaperona DnaK (HSP70)        | 67    | <i>Rickettsia akari</i> <sup>4</sup>                 | 5,48  | 5,66  | 60.754  | 41.845 |

<sup>1</sup>Estirpe ATCC 49037 / DSM 5601 / PAI5; <sup>2</sup>Estirpe KT / ATCC 51484 / DSM 6875; <sup>3</sup>Estirpe SB155-2; <sup>4</sup>Estirpe Hartford;

Dentre as sete DEPs presumivelmente identificadas como codificadas por genes de Gd, cinco mostraram maior acúmulo no tratamento não inoculado, assim como a DEP atribuída a *Methylobacillus flagellatus*. Já as outras duas DEPs de Gd tiveram maior acúmulo no tratamento inoculado, da mesma maneira que as DEPs específicas de *Nitratiruptor* sp. e *Rickettsia akari*.

As 22 DEPs/spots que não puderam ser significativamente identificadas são apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7.** Tabela descritiva das DEPs sem anotação presumível ou similaridade encontrada por identificação via PMF/MS/MS/Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) observados na 2D-PAGE.

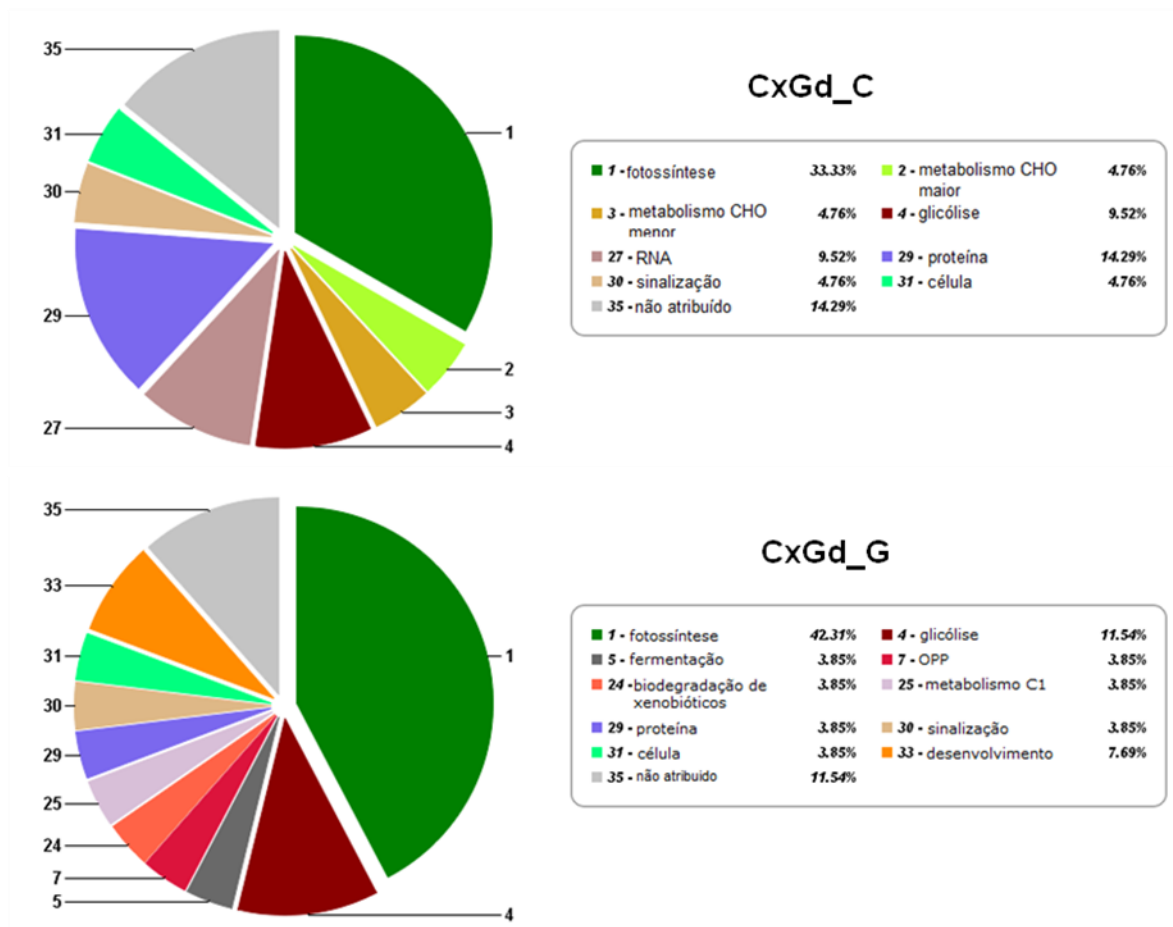
| Spot ID                             | Ratio Gd/C | ANOVA    | pI   | MM (Da) |
|-------------------------------------|------------|----------|------|---------|
| <b>Mais abundantes no controle</b>  |            |          |      |         |
| 5                                   | 0,489      | 0,013779 | 8,49 | 20.713  |
| 134                                 | Excl.      | 0,033299 | 6,85 | 40.621  |
| 135                                 | Excl.      | 0,000003 | 6,19 | 37.808  |
| 139                                 | Excl.      | 0,000987 | 5,64 | 43.246  |
| 141                                 | Excl.      | 0,000022 | 6,75 | 47.830  |
| 144                                 | Excl.      | 0,000981 | 7,51 | 59.464  |
| 147                                 | Excl.      | 0,000378 | 6,06 | 63.596  |
| <b>Mais abundantes no inoculado</b> |            |          |      |         |
| 57                                  | Excl.      | 0,000041 | 6,25 | 20.096  |
| 58                                  | Excl.      | 0,007303 | 5,94 | 27.951  |
| 69                                  | Excl.      | 0,000531 | 6,11 | 22.333  |
| 70                                  | Excl.      | 0,000870 | 7,77 | 22.167  |
| 71                                  | Excl.      | 0,000864 | 5,78 | 27.347  |
| 73                                  | Excl.      | 0,001230 | 6,99 | 28.049  |
| 75                                  | Excl.      | 0,012693 | 5,81 | 33.048  |
| 79                                  | Excl.      | 0,000193 | 6,23 | 34.921  |
| 85                                  | Excl.      | 0,000051 | 6,22 | 37.918  |
| 91                                  | Excl.      | 0,001226 | 6,70 | 39.896  |
| 94                                  | Excl.      | 0,001178 | 6,32 | 42.957  |
| 103                                 | Excl.      | 0,000095 | 5,61 | 65.246  |
| 104                                 | Excl.      | 0,003099 | 6,61 | 65.993  |
| 112                                 | Excl.      | 0,000275 | 7,46 | 28.558  |
| 114                                 | Excl.      | 0,034631 | 6,23 | 29.661  |

Excl.: exclusivo, ou detectado apenas no respectivo tratamento.

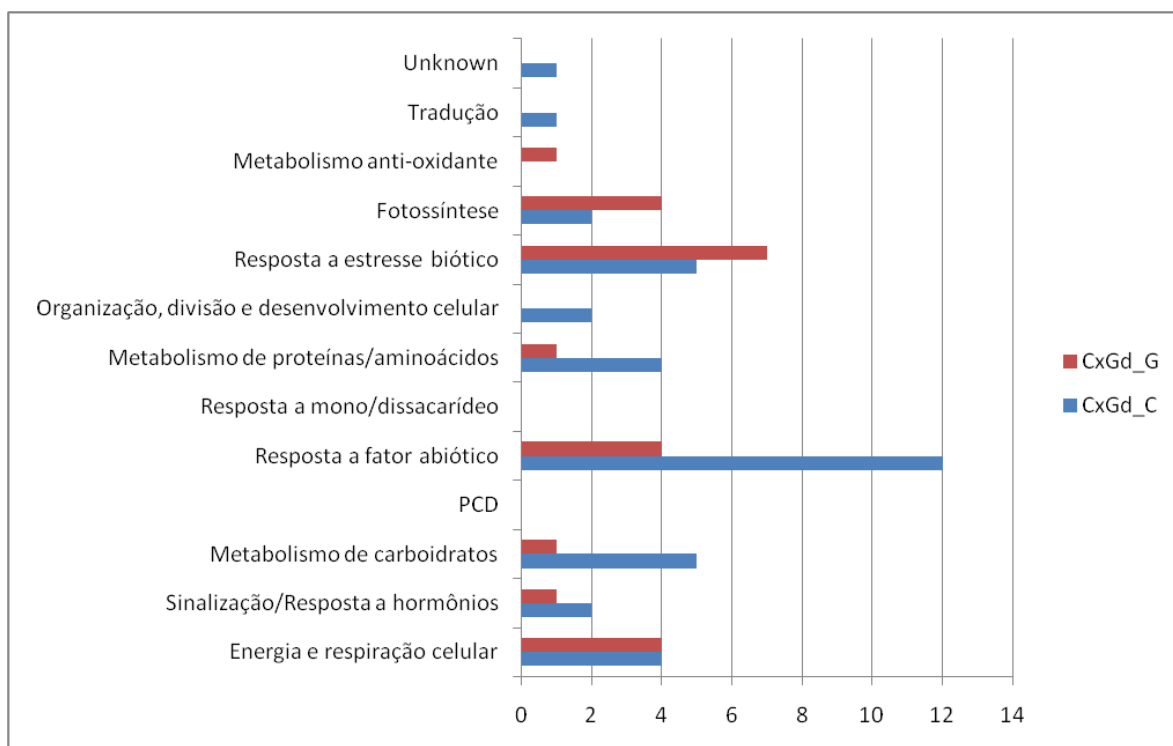
#### 4.3.7.2 Ontologia gênica (GO) e enriquecimento de termos GO

No mapeamento dos acessos UniProt identificadores das proteínas similares às DEPs de cana-de-açúcar junto ao banco de dados de *Arabidopsis thaliana*, para viabilizar a análise de ontologia gênica no programa Mercator, foi verificada associação significativa para 20 das 23 (87%) DEPs mais acumuladas no tratamento controle, e para 26 das 32 (81%) DEPs mais acumuladas no tratamento inoculado com Gd.

A distribuição e frequência obtidas de termos de GO para processos biológicos referentes aos tratamentos são apresentadas na Figura 8, na qual são destacados os setores correspondentes a cada categoria na classificação utilizada em *A. thaliana*, modelo para organismos vegetais. Esta distribuição foi também utilizada para comparação quantitativa (Figura 9, embora não significativa estatisticamente) e identificação dos processos biológicos mais variáveis entre os tratamentos controle (plantas não inoculadas com Gd) e plantas inoculadas com Gd, considerando os conjuntos de DEPs.



**Figura 8.** Categorização da ontologia gênica das DEPs de cana-de-açúcar expressas sob inoculação com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) e não inoculado (C). CxGd\_C (controle x *Gluconacetobacter diazotrophicus* plantas controle), CxGd\_G (controle x *G. diazotrophicus* plantas inoculadas). Os números ligados aos setores do gráfico são identificadores das categorias raiz de processo biológico, também representados nos respectivos quadros; nestes, é indicada a frequência (%) de cada processo biológico conforme o número de termos de GO, encontrado para cada conjunto de DEPs, de cada tratamento. Categoria OPP (*Oxidative pentose phosphate pathway*).



**Figura 9.** Distribuição dos DEPs de acordo com as categorias funcionais de cana-de-açúcar expressos sob inoculação com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) e não inoculados (C).

As DEPs de cana-de-açúcar selecionadas de cada tratamento e mapeadas nas respectivas proteínas ortólogas de *Arabidopsis thaliana* também foram analisadas quanto ao enriquecimento de termos de GO no programa Panther. A frequência dos termos GO associados às DEPs do tratamento inoculado (DEPs-Gd) foram comparadas à frequência dos mesmos termos GO associados às DEPs do tratamento não inoculado (DEPs-C), e também em relação à frequência destes termos no proteoma de referência obtido a partir do genoma de *A. thaliana*. Nesta análise, apenas três categorias de termos GO, ou processos biológicos, mostraram-se significativamente variáveis entre os tratamentos (Tabela 8) e, ainda, apenas quando a comparação foi entre termos de DEPs-Gd e do proteoma de referência.

**Tabela 8.** Teste de super-representação no enriquecimento de termos de ontologia gênica para processo biológico via ortologia com *A. thaliana*, com uso do programa Panther.

| Base de Dados GO / Referência           | # REF | Expect | #DEPs-Gd  | P-value        |
|-----------------------------------------|-------|--------|-----------|----------------|
| <i>Processo biológico completo</i>      |       |        |           |                |
| <b>Proteoma <i>A. thaliana</i></b>      |       |        |           |                |
| fotossíntese/reações dependentes de luz | 187   | 0,17   | <b>4</b>  | <b>0,04190</b> |
| geração de precursors/energia           | 414   | 0,37   | <b>7</b>  | <b>0,00011</b> |
| metabolismo de aldeídos                 | 299   | 0,27   | <b>5</b>  | <b>0,01150</b> |
| <b>REF: DEPs-C</b>                      | -     | 11,29  | <b>10</b> | <b>ns</b>      |
| <i>Processo biológico Slim</i>          |       |        |           |                |
| <b>Proteoma <i>A. thaliana</i></b>      |       |        |           |                |
| metabolismo de monossacarídeos          | 283   | 0,25   | <b>4</b>  | <b>0,01710</b> |
| geração de precursors/energia           | 444   | 0,40   | <b>6</b>  | <b>0,00033</b> |
| metabolismo de carboidratos             | 980   | 0,88   | <b>6</b>  | <b>0,02810</b> |
| <b>REF: DEPs-C</b>                      | -     | 8,47   | <b>11</b> | <b>ns</b>      |

ns: não significativo.

#### 4.4 DISCUSSÃO

##### *Confirmação da inoculação com G. diazotrophicus.*

A variedade comercial RB867515 de cana-de-açúcar é descrita como favoravelmente responsiva à inoculação de bactérias diazotróficas, especialmente *G. diazotrophicus*, com aumento na produção de biomassa (Leal, 2011; Pereira *et al.*, 2013). Neste trabalho, dada a necessidade de estabelecer contraste experimental entre os tratamentos para simbiose diazotrófica, foi verificado a carga bacteriana diferencial de Gd, sendo detectada concentração do endofítico cerca de 5,2 vezes maior nas plantas inoculadas em relação às aquelas não inoculadas. Utilizando o mesmo par de iniciadores, esta detecção foi possível apenas via qPCR, em tempo real, não havendo amplificação detectável por PCR convencional nem por *nested*-PCR. Provavelmente, a carga bacteriana absoluta de Gd foliar em ambos os tratamentos ainda era reduzida, uma vez que as plantas estavam com 120 dias na coleta das amostras, portanto ainda imaturas para acúmulo de sacarose e maior intensidade de simbiose.

A Gd é mais frequentemente encontrada em apoplasto e simplasto radicular, com diluição na concentração para órgãos de parte aérea (James *et al.*, 2001). Proporcionalmente, a massa de DNA de Gd é muito menor que a do hospedeiro cana-de-açúcar (Franke-Whittle *et al.*, 2005), o que pode também ter reduzido a eficiência da detecção.

Apesar de relativa, a confirmação de carga bacteriana ~5x maior permitiu a obtenção de contraste entre os tratamentos para esta interação simbiótica, com diferenças refletidas nos perfis proteômicos analisados.

## 2D-PAGE e MS

A análise dos arquivos de imagem digitalizados obtidos após eletroforese bidimensional das amostras de cada tratamento demonstrou baixa variação experimental entre as réplicas de um mesmo tratamento, o que favoreceu a confiabilidade dos resultados. Adicionalmente, ambos os tratamentos tiveram amostragens muito similares de seu proteoma, em média 163 *spots*/gel. Do total de proteínas distintas detectadas (173) na comparação entre os tratamentos, observou-se que foram obtidas quantidades muito próximas de *spots* exclusivos de cada tratamento (58 e 60), assim como de *spots* comuns significativamente variáveis mais abundantes em cada tratamento (5 e 7).

Do total representando proteínas distintas, 91 *spots* ou 52,6% foram considerados DEPs e submetidos à identificação via MS. Aproximadamente metade do proteoma analisado mostrou-se diferencial entre os tratamentos com ou sem inoculação de Gd, em metodologia 2D-PAGE que favorece significativamente a detecção de proteínas e peptídeos mais abundantes na amostra biológica (produtos de genes mais expressos). Este quadro sugere que a maior concentração (5x) do diazotrófico Gd alterou significativamente o proteoma foliar de cana-de-açúcar, principalmente a fração do proteoma foliar composta por produtos de genes com maior intensidade de expressão. Este resultado é pioneiro pelo maior foco nas alterações no proteoma do hospedeiro do que no proteoma do simbiote (Lery *et al.*, 2011).

Apenas quatro das 91 DEPs não resultaram em espectros de massa adequados para análise de identificação presumível, e a eficiência de anotação foi 71,4%, permitindo inferir possíveis aspectos funcionais e interações entre o proteoma diferencial e os processos fisiológicos e metabólicos. As DEPs ainda sem

identificação estão sendo submetidas ao sequenciamento *de novo* (dados não apresentados), para completar o perfil proteômico diferencial obtido.

#### *Identificação presumível e anotação das DEPs*

O fluxograma de análise para identificação e definição do organismo de origem mais provável das DEPs (Figura 2) permitiu discriminar as proteínas diferenciais de cana-de-açúcar e de Gd potencialmente envolvidas na interação entre este simbiote. Conforme esperado, a maior parte (quase 2/3) das DEPs foi identificada como sendo produzida pelo hospedeiro vegetal, enquanto cerca de 1/10 foi atribuído ao endofítico diazotrófico Gd e 1/4 não teve identificação significativa (Tabela 4).

Quase 1/3 das DEPs foi anotada especificamente como proteína do complexo *Saccharum*, reforçando a identificação apesar de o banco de dados de cana-de-açúcar utilizado ter apenas 7.062 sequências de proteínas e o banco de dados Viridiplantae ter 515.203 sequências de proteínas. As demais DEPs de cana-de-açúcar mostraram-se similares a proteínas de outras espécies vegetais, notadamente gramíneas (mais de 40% do total de DEPs). Das 10 DEPs anotadas como proteína de proteobactéria, sete foram associadas especificamente a *Gluconacetobacter diazotrophicus* da mesma estirpe utilizada na inoculação das plantas, também validando a identificação.

#### *DEPs da planta hospedeira*

Com base na identificação das DEPs de cana-de-açúcar (Tabela 5) mais abundantes em cada tratamento contrastante para carga bacteriana com Gd, as

mesmas foram agrupadas a seguir por categoria principal de ontologia gênica por processo biológico, conforme base de dados UniProt.

Fotossíntese. Nas plantas controle foi encontrada como DEP apenas uma proteína diretamente envolvida na fase fotoquímica, o fator de estabilidade/montagem do PSII (A0A059PZZ1), indicando que em baixa concentração do diazotrófico Gd a planta parece favorecer a integridade do PSII dependente deste fator. Já nas plantas inoculadas com Gd, houve maior expressão de componentes da fase fotoquímica (esquema Z) e correlatos, tais como: a proteína de ligação à clorofila a-b 2 (P84990), fundamental para formação dos complexos antena; a subunidade Fe-S do complexo citocromo b6-f (I3V633) e a proteína Fe-S do centro de reação do PSI (Q6ENP6), ambas intermediárias no fluxo de elétrons; e a ferredoxina-NADP redutase (J9QCY8), última integrante do transporte fotossintético de elétrons antes da redução do NADP<sup>+</sup> a NADPH, que é utilizado para fixação de CO<sub>2</sub> (Wu *et al.*, 2013).

Este quadro indica que na presença de maior carga bacteriana/Gd há maior acúmulo de componentes de fotossistemas, o que pode estar associado ao incremento da fotossíntese geralmente observado na atividade promotora de crescimento do hospedeiro infectado com este endofítico. Também houve diferença na abundância das proteínas da fase independente de luz para fixação de CO<sub>2</sub>. Tanto nas plantas controle quanto nas inoculadas com Gd, diversos DEPs foram anotados como as subunidades maior (Q6ENV5) e menor (J9QE65, 2x Q41373 no controle e O65194 nas inoculadas) da RuBisCO.

Apenas uma PEP-carboxilase, específica de plantas com fotossíntese C4 (Q8H1X3), foi encontrada como mais expressa nas plantas controle, enquanto nas plantas inoculadas outra PEP-carboxilase (Q8L6C3) não específica foi mais

acumulada. Curiosamente, a subunidade menor da RuBisCO e a PEP-carboxilase mais expressas nas plantas inoculadas com Gd (respectivamente O65194 e Q8L6C3) apresentaram maior similaridade com ortólogas de *Medicago* e *Saccharum spontaneum*, indicando provável incremento na indução de cópias de genes e enzimas de fixação de CO<sub>2</sub> menos específicas dos híbridos de *Saccharum* e, portanto, mais ancestrais.

Metabolismo/Energia. Foi detectada uma peptidil-prolil cis-trans-isomerase (PPIase, O49939) como mais abundante no proteoma das plantas controle, juntamente com subunidade  $\alpha$  de proteassomo (B4FFX7), que podem estar associadas a maior atividade de ajuste estrutural e reciclagem, ou *turn-over*, de proteínas quando há baixa concentração do endofítico. As PPIases estão envolvidas com vários processos biológicos vegetais, tais como resposta a hormônios, diferenciação de órgãos, tolerância a estresses ambientais e montagem de diversos complexos proteicos cloroplastidiais (Gollan *et al.*, 2014). A detecção em plantas controle da maior expressão de fosfoglicerato quinase (PGK, P12783) pode estar relacionada com maior demanda por precursores metabólicos produzidos via glicólise quando a simbiose com Gd é menor. Já a maior abundância de glutamina sintetase (GS, P85087) nas plantas não inoculadas em relação às inoculadas não era esperada, uma vez que a simbiose para FBN com diazotróficos tende a aumentar a atividade de enzimas correlatas como a nitrato redutase e a própria GS (Yang *et al.*, 2014; Nogueira *et al.*, 2001). Entretanto, o maior acúmulo da GS cloroplastidial em plantas controle pode não ter correlação com sua atividade, devido a mecanismos de modificação pós-traducionais e ativação da enzima. Torna-se interessante avaliar a atividade da GS cloroplastidiais em amostras contrastantes para inoculação com Gd, uma vez que existem outros

compostos nitrogenados, além de  $\text{NH}_3$ , produzidos por Gd simbiote e que podem ser assimilados pelo hospedeiro, tais como ureídos e amidas (Buchanan, 2000).

Nas plantas inoculadas foram detectadas DEPs mais abundantes anotadas como enzimas integrantes de vias principais do metabolismo de carboidratos, inclusive enzimas chave de interligação entre estas vias. A maior presença de Gd pareceu induzir componentes da glicólise, tais como a frutose-bisfosfato aldolase cloroplastidial (Q40677), intermediária metabolismos de carboidratos plastidial. Esta enzima foi identificada por dois *spots* diferentes (80 e 82), com pI muito próximo, ambos anotados como a mesma proteína, mas com abundâncias diferindo em três vezes e massa molecular 144 Da menor do *spot* 80, menos frequente, sugerindo modificação pós-traducional ou variação em resíduos de aminoácidos entre estas duas formas mais abundantes em plantas inoculadas com Gd. Também foram detectadas como exclusivas deste tratamento: a formato desidrogenase (Q07511), envolvida na regulação do metabolismo de carboidratos, fixação de  $\text{O}_2$  e liberação de  $\text{CO}_2$ , e altamente responsiva a estresses abióticos e por fitopatógenos (Alekseeva *et al.*, 2011); a 6-fosfogluconato desidrogenase (W8SJN1), enzima da via das pentoses-fosfato que catalisa a descarboxilação do 6-fosfogluconato para ribulose 5-fosfato e reduz NADP para NADPH; e a fosfoglucomutase (A0A059PZ74), reguladora reversível cloroplastidial da síntese de amido, de precursores direcionados ao citossol e do metabolismo de serina (Uematsu *et al.*, 2012). Já a detecção da proteína álcool desidrogenase 1 (C7IVU0) e da lactoilglutamina liase (W0F9T0) sugerem a ativação, associada à Gd, de mecanismos moleculares catabólicos para produção de energia e proteção contra efeitos contra metabólitos oxidantes.

*Spots* diferencialmente acumulados nos tratamentos foram anotados como proteínas associadas à via glicolítica e/ou metabolismo de trioses, e à produção de energia fotossintética, variando conforme características da proteína e espécie mais ortóloga. A gliceraldeído-3-P desidrogenase B cloroplastidial (GAPDH-B, P12860) foi identificada apenas em plantas controle, enquanto nas amostras inoculadas com Gd outras houve duas GAPDH citossólicas e com outras ortologias (H9B8E3 e Q39769). Este quadro indica que Gd pode interferir na regulação de quais GAPDHs são mais produzidas e mais ativas no metabolismo de carboidratos, provavelmente mais adequadas para maior crescimento da planta quando em simbiose de FBN. Ainda neste contexto, a maior quantidade e diversidade de subunidades de ATP sintases de tilacoides observada nas plantas inoculadas com Gd também sugerem efeitos da FBN na regulação da produção fotossintética de ATP, como esperado após maior disponibilização de aminoácidos e glutatona reduzida (Komatsu *et al.*, 2014). No controle foram detectadas duas ATP sintase  $\beta$  (A4QLK1 e Q6ENV6) e uma  $\gamma$  (P0C1M0), com ortologias distintas; já nas plantas inoculadas com Gd tiveram maior abundância as subunidades de ATP sintase  $\beta$  (Q6ENV6 e P56296),  $\gamma$  (2 *spots* de P0C1M0) e  $\alpha$  (Q6ENW6), também com algumas ortologias distintas. Isto indica fortemente que o maior crescimento induzido pelo endofítico, teoricamente dependente da maior eficiência na produção fotossintética de energia, pode estar associado à produção e ativação diferencial de ATP sintases cloroplastidiais específicas.

Desenvolvimento. A enzima nuclear RNA-3'-P ciclase (Q9C578) mostrou-se significativamente menos abundante nas plantas inoculadas com Gd em relação àquelas não inoculadas, da mesma forma que a proteína ribossômica L14 50S (P56363). Ambas têm função essencial no processamento de rRNA e formação de

subunidades ribossômicas, mas a variação observada no proteoma de cana-de-açúcar sugere que o acúmulo do fator de elongação da tradução 1- $\alpha$  (Q8SAT1) é quantitativamente mais responsivo à presença de Gd e aparentemente mais relevante para aumentar a tradução de proteínas em simbiose para FBN. A proteína golgina 3 (Q84WU4) também se mostrou exclusiva do controle, e é responsável pela integridade, interconexão das vesículas do aparelho de Golgi e regulação de vias secretoras (Stefano *et al.*, 2006); sua repressão em plantas inoculadas com Gd pode indicar possíveis efeitos desestruturantes de membranas e vesículas da célula vegetal para permitir a interação molecular com a célula do simbiote.

De maneira similar, a proteína 14-3-3 (A0A059Q2A9) foi exclusiva do controle, sendo geralmente classificada como chaperona envolvida em diversas vias de transdução de sinais, ubiquitinação e regulação do ciclo celular (Diaz *et al.*, 2011), e descrita em cana-de-açúcar como responsiva a fatores de estresse abióticos como salinidade (Pacheco *et al.*, 2013) e ao acúmulo de sacarose (Boaretto, 2012). A 14-3-3 pode fosforilar GS e aumentar sua atividade de acordo com o *status* de fixação de nitrogênio da planta (Lima *et al.*, 2006), assim como pode inibir a atividade da nitrato redutase (NR; Lambeck *et al.*, 2012). Nas plantas inoculadas com Gd, a maior oferta de nitrogênio oriunda da FBN pode estar associada à menor abundância de proteínas 14-3-3 em interação de ativação com GS, também mais expressa no controle, e com NR, que sequer foi detectada como DEP neste trabalho.

A maior expressão de actina (Q5XPX5) em cana-de-açúcar inoculada com Gd está de acordo com vários exemplos descritos de reorganização da actina componente do citoesqueleto de células vegetais em interações com

microrganismos tanto patogênicos quanto simbiontes, que geralmente ocorre através de modificações pós-traducionais, conforme demonstrado para ubiquitinação de actina em nódulos fixadores de raiz de *Phaseolus vulgaris*, e em plantas infectadas por patógenos como *Pseudomonas* e *Phytophthora* (Dantán-González *et al.*, 2001). Ao contrário da golgina 3 exclusiva do tratamento controle, esta actina parece estar fortemente envolvida em mecanismos de re-estruturação do citoesqueleto e de membranas diretamente ligados ao estabelecimento e efetividade da simbiose entre cana-de-açúcar e Gd.

Resposta/Estresse. Embora participe de interações com proteínas e substratos da gluconeogênese, o citocromo P450-94B1 (Q9FMV7) identificado no controle é descrito como oxidante de precursores de metil-jasmonato, hormônios vegetais de sinalização e ativação de resposta de defesa a estresse por fatores bióticos e por injúria mecânica, em geral atenuando a sinalização por metil-jasmonato (Koo *et al.*, 2014). Com base na forte redução no acúmulo deste citocromo verificada em plantas infectadas com Gd, pode-se inferir que esta não é percebida por este mecanismo de defesa do hospedeiro como um microrganismo prejudicial. Obviamente, a maior expressão dessa proteína no controle pode estar ligada a eventuais injúrias mecânicas nas folhas durante o experimento em casa-de-vegetação. Da mesma forma, a maior expressão do fator de transcrição por estresse térmico B-4 (Q9C635) pode também ter derivado da temperatura elevada na casa-de-vegetação durante o experimento, uma vez que esta proteína, ativadora de diversos genes de resposta ao calor, já foram descritos juntamente com alguns citocromos P450 como induzidos em cactáceas em condições de alta temperatura e baixa disponibilidade hídrica (Shishkova *et al.* 2013).

Quase todas as DEPs de cana-de-açúcar desta categoria, e que foram mais abundantes nas plantas inoculadas com Gd, são identificadas com proteínas com atividade alergênica ortólogas de amendoim (*Arachis hypogea*). A Resposta a estresse 1, ou Ara h2, a proteína alergênica Ara h1 (P43237), e também o inibidor de tripsina (Q8LL03) anotado de dois *spots* diferentes (90 e 92) têm sido descritos com funções de defesa da planta contra herbivoria e ataque de patógenos, e apresentam atividade inibidora de tripsina, antifúngica e antibacteriana comprovadas (Li *et al.*, 2010). Esta maior expressão conjunta pode indicar que cana-de-açúcar responde à infecção com Gd através de mecanismos comuns a respostas a fitopatógenos, mas também que a inoculação com Gd pode ativar e intensificar mecanismos de defesa do hospedeiro contra eventuais ataques de patógenos e herbívoros.

Especificamente associada com função chaperona na estruturação de proteínas, a Resposta a estresse 2 comum no retículo endoplasmático também é descrita como diretamente envolvida no metabolismo de antocianinas, sinalização, respostas de defesa contra bactérias, vírus e resposta de hipersensibilidade ou HR (Saijo *et al.*, 2009; Di Carli *et al.*, 2012). Essas enzimas também atuam no controle do transporte através dos plasmodesmos, e foi recentemente descrito que em nódulos de fixação simbiótica de nitrogênio da espécie arbórea australiana *Casuarina glauca* há lignificação da parede celular e depleção de calreticulina e calose nos plasmodesmos de células infectadas pelos endossimbiontes (Demchenko *et al.*, 2014), possivelmente facilitando o transporte simplástico de metabólitos. A maior expressão dessa enzima nas plantas infectadas por Gd sugerem ativação de mecanismos de defesa inatos, em concordância com o que já foi discutido sobre as demais DEPs nesta categoria. Entretanto, é provável que na

interação simbiótica entre cana-de-açúcar e Gd essa enzima não seja depletada dos plasmodesmos, pois se trata de microrganismo endofítico não-formador de nódulos.

Transporte. Apenas foi detectada uma DEP mais expressa no controle, anotada como D-sorbitol-6-P desidrogenase dependente de NADP (D8L841). Esta enzima é relacionada com processo de ajuste osmótico e de transporte citoplasmático (Cao *et al.*, 2011). A inibição do seu acúmulo em plantas infectadas por Gd pode estar relacionada a ausência ou redução de estresse osmótico na condição de FBN.

Proteínas de função desconhecida. Foram identificadas duas proteínas diferenciais entre os tratamentos, similares às já descritas A0A059Q0N5 e A0A059Q001 para cana-de-açúcar híbrido R570; entretanto, não há ainda função ou ontologia associada.

#### *DEPs do simbiote*

Conforme apresentado na Tabela 7, foram identificados *spots* com variação significativa no acúmulo e anotação presumível para proteobactérias, sugerindo que estas proteínas foram codificadas pelo simbiote Gd. A detecção de proteínas diferenciais de bactéria inoculada era esperada devido ao contraste dos tratamentos no experimento, e pelo fato de o tratamento térmico dos propágulos de cana-de-açúcar não eliminar a microbiota original dos mesmos, apenas reduzi-la.

Com exceção da ATP sintase  $\alpha$ , as DEPs de proteobactéria identificadas neste trabalho são inéditas em descrição de interação simbiótica entre Gd e cana-de-açúcar (dos Santos *et al.*, 2010). Uma vez que o genoma da Gd é totalmente sequenciado (Bertalan *et al.*, 2009), foi considerado que as três DEPs com associação mais significativa com proteínas de outras espécies bacterianas

indicam a presença destas em cana-de-açúcar. A propósito, *Gluconacetobacter* e *Rickettsia* são  $\alpha$ -proteobactérias, *Methylobacillus* é  $\beta$ -proteobacteria e *Nitratiruptor* é classificado nas subdivisões  $\delta$  e  $\epsilon$  das proteobactérias.

Ao contrário do esperado, a maior parte das DEPs de Gd foram detectadas no tratamento controle. A quantificação relativa por qPCR mostrou que nas folhas das plantas inoculadas havia cerca de cinco vezes mais células de Gd que no tratamento controle, contudo os resultados com DEPs da bactéria sugeriram que a abundância relativa de proteínas significativamente diferenciais não seguiu esta correlação. Em ambos os tratamentos, foi considerado que a interação entre cana-de-açúcar e o endofítico Gd ocorria para FBN, diferindo na concentração bacteriana.

No controle, Gd acumulou maior quantidade das enzimas envolvidas na expressão gênica: desacetilase dependente de NAD (A9HK18), que remove grupos acetil e succinil de proteínas acetiladas inibidas, ativando-as, e atua na regulação da transcrição; e serina-tRNA ligase (A9HLG2), que catalisa a ligação de serina o respectivo tRNA; e ATP sintase  $\alpha$  (Q1GXM8), integrante da síntese de ATP associada ao transporte de  $H^+$  na membrana plasmática. Também foram identificadas três proteínas de função ainda desconhecida (A9H9F0, A9HG52 e A9HNNH6).

Nas plantas inoculadas com Gd, esta apresentou maior acúmulo das enzimas: Respostas a estresses 3, que acumula em plantas sob estresse ambiental (Bao *et al.*, 2015);  $\gamma$ -glutamil-P redutase (A6Q3B4), integrante da biossíntese de L-prolina, que também tem papel importante na adaptação ao estresse e desidratação osmótica e controle redox (Fichman *et al.*, 2014); proteína chaperona DnaK-HSP70 (A8GMF9), com atividade em resposta de tolerância a

estresses abióticos e estruturação de proteínas, assim como na homeostase de proteínas em condições normais (Cleenwerck *et al.*, 2010). Este quadro sugere que o proteoma de Gd, quando em elevada concentração na cana-de-açúcar, tende a favorecer significativamente atividades antioxidantes, ao mesmo tempo em que vias dependentes da Respostas a estresse 4 podem ser mais relevantes para geração de  $\text{NH}_3$ , disponibilizado para o hospedeiro.

#### *DEPs não identificados*

As 22 DEPs/*spots* sem similaridade nos bancos de dados acessados estão em identificação via MS, uma vez que constituem conjunto de proteínas significativamente variáveis em resposta à inoculação e colonização de cana-de-açúcar com Gd.

#### *Ontologia gênica (GO)*

A categorização associada a processo biológico permitiu observar que após inoculação com Gd a planta parece investir em fotossíntese (42,33%), e desenvolvimento (7,69%), necessários para produção de energia, utilizada nos diversos processos celulares (Figura 8). Os processos de sinalização foram diminuídos na planta após inoculação com Gd, talvez em virtude do estabelecimento e intensificação da simbiose com Gd. A glicólise mostrou-se pouco aumentada, assim como a via das pentoses-fosfato, sugerindo que na simbiose diversos metabólitos precursores são mais necessários, assim como energia da respiração e fotorrespiração. Proteínas associadas ao desenvolvimento foram mais abundantes em plantas inoculadas com Gd, enquanto aquelas associadas ao

metabolismo de proteínas e de RNA foram menos frequentes com maior carga de Gd.

Com a análise quantitativa (não estatística) apresentada na Figura 9 foi possível verificar objetivamente, conforme nomenclatura padronizada de GO para plantas e em relação ao controle, que nas plantas inoculadas com Gd houve redução das ontologias associadas ao metabolismo de carboidratos e de proteínas, e às respostas a fatores abióticos. Por outro lado, nas plantas inoculadas com Gd foi verificado aumento na quantidade de ontologias associadas a respostas a fatores bióticos, metabolismo antioxidante e à fotossíntese, confirmando o efeito do diazotrófico Gd em diversos processos biológicos favoráveis ao crescimento da planta hospedeira.

Com base nos resultados obtidos com o teste de super-representação/enriquecimento de termos de ontologia gênica para processo biológico, via ortologia com *A. thaliana* (Tabela 8), não foram identificadas ontologias com variação significativa entre os tratamentos controle e inoculado com Gd. Este resultado pode decorrer do reduzido número de DEPs submetido à análise, assim como do fato de cada conjunto de dados comparado ser composto por DEPs, ou seja, por proteínas diferencialmente acumuladas entre esses conjuntos que geralmente estão associadas a ontologias distintas.

Ainda assim, na comparação entre o proteoma diferencial mais abundante nas plantas inoculadas com Gd e o proteoma de referência, foi possível detectar três categorias de processo biológico significativamente diferentes, nas duas bases de dados GO consideradas (completa e *slim*, ou condensada): fotossíntese/reações dependentes de luz, geração de precursores/energia, e metabolismo de carboidratos. Estes resultados corroboraram as análises de GO

anteriores, e estatisticamente comprovaram que o proteoma foliar de cana-de-açúcar responde diferencialmente à maior concentração do endofítico promotor do crescimento Gd.

*Modelo esquemático do mecanismo em resposta à inoculação com Gd*

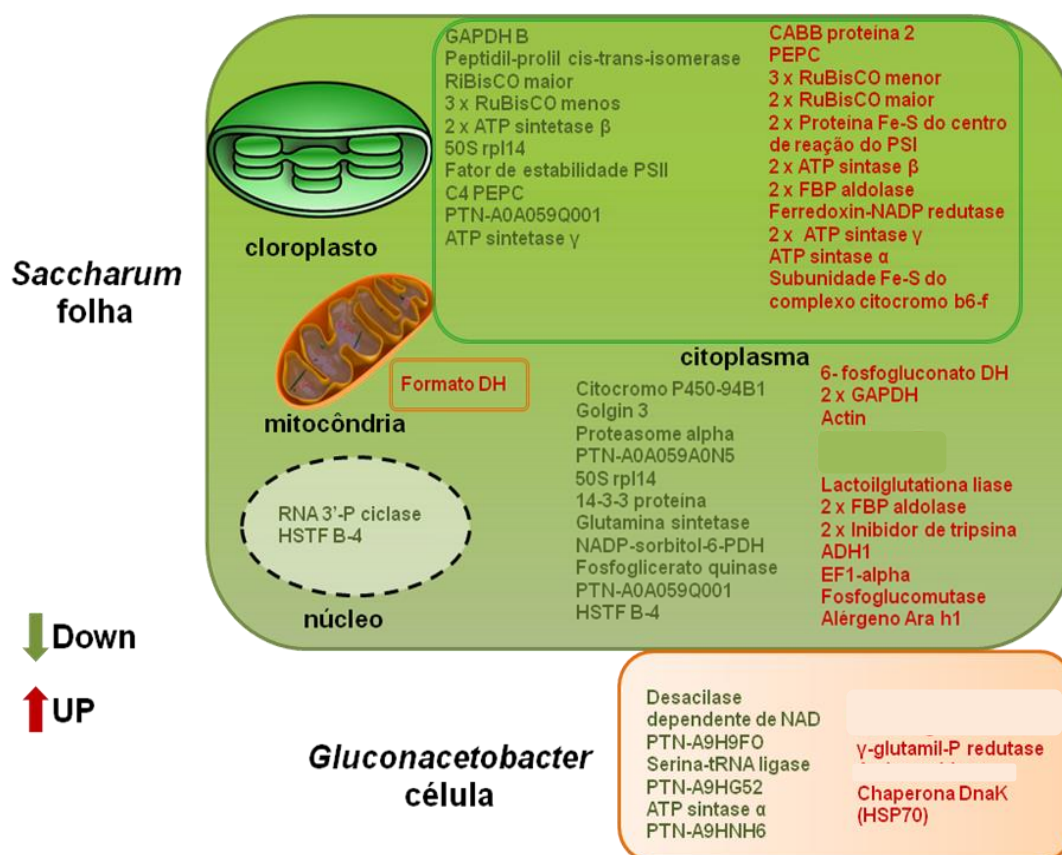
A Figura 10 sumariza os resultados do estudo e esquematiza as respostas de cana-de-açúcar ao simbiote. Observa-se em relação ao uso de bactérias endofíticas como inoculante a promoção de crescimento com estímulo no desenvolvimento da planta (Oliveira *et al.* 2002). A fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais importantes da planta, que desempenha um papel determinante na taxa de crescimento da mesma, especialmente em cana-de-açúcar que possui metabolismo fotossintético C4.

De forma geral, proteínas relacionadas aos fotossistemas I e II e carboxilação foram mais expressas em plantas inoculadas com Gd em comparação ao controle. As ATP sintases são enzimas que se localizam na membrana dos tilacóides e são responsáveis pela extrusão de prótons de hidrogênio para o estroma. Sua atividade está diretamente relacionada à excitação de elétrons nos fotossistemas I e II, sendo um indicativo de maior taxa fotossintética e fixação de carbono. Ao mesmo tempo, as enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase e a ribulose fosfato são cruciais nas fases de fixação do carbono atmosférico em plantas de metabolismo C4, como a cana-de-açúcar. Além disso, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase também atua de forma relevante na síntese de esqueletos carbonados que são substrato da produção de sacarose.

Considerando-se que essas proteínas foram mais expressas, é provável que plantas inoculadas com Gd possuam maior taxa de fixação de carbono devido à característica simbiotrófica da bactéria. Contudo, proteínas relacionadas à resposta

ao estresse biótico foram mais expressas nas plantas inoculadas com Gd em comparação às plantas controle. Essa expressão pode mostrar que mesmo a Gd ser uma bactéria endofítica que proporciona um maior crescimento do vegetal, a planta ainda reconhece esse micro-organismo como um potencial invasor e ativa vias para se proteger.

As proteínas relacionadas ao mecanismo anti-oxidante foram identificadas apenas nas plantas inoculadas com Gd. Lery *et al.* (2011) analisando a interação do crescimento da cana-de-açúcar com a bactéria Gd identificaram uma super expressão de proteínas envolvidas em reações redox. Essas proteínas podem indicar que a cana-de-açúcar utiliza mecanismos de defesa durante a interação com Gd, uma vez que a resposta ao estresse também está relacionada com a proteção de estruturas celulares do dano oxidativo.



**Figura 10.** Modelo esquemático dos processos de regulação protéica foliar em plantas de cana-de-açúcar associadas à *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd). Proteínas em verde mais abundante

nas plantas controle e proteínas em vermelho mais abundante nas plantas inoculadas com a bactéria.

#### 4.6 CONCLUSÃO

As alterações proteicas observadas na maior concentração Gd indicou maior acúmulo de componentes de fotossistemas;

*Gluconacetobacter diazotrophicus* induz outra PEP-carboxilase (Q8L6C3) não específica em relação às plantas não inoculadas onde foi encontrada como mais expressa uma PEP-carboxilase específica de plantas com fotossíntese C4 (Q8H1X3);

Proteínas relacionadas ao mecanismo antioxidante foram mais abundantes nas plantas inoculadas. Essas proteínas podem indicar que a cana-de-açúcar utiliza mecanismos de defesa, uma vez que a resposta ao estresse também está relacionada com a proteção de estruturas celulares do dano oxidativo;

Estes dados apontam que as proteínas encontradas estão favorecendo o crescimento das plantas inoculadas com Gd em comparação com as plantas não inoculadas.

#### 4.7 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado por subsídios e bolsas de estudo da CAPES / REUNI e Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq). Os autores agradecem ao Prof. Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira (CENA/USP) pelo fornecimento da cepa BR 11281 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Ao senhor Emanuel Sérvio Coqueiro do Santos pelo auxílio financeiro ao projeto (BIOGENE) e ao Prof. Dr. Fábio César Gozzo pela disponibilização dos bancos de dados.



#### 4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alekseeva AA, Savin SS and Tishkov VI (2011) NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase from plants. *Acta Naturae* 3(4): 38–54.
- Azevedo JL, Araujo WL and Marcheroni Jr W (2000) Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: Melo IS and Azevedo JL (eds) *Controle biológico*. Embrapa- Meio Ambiente pp 57-93.
- Baldani JI, Oliveira ALM, Guimarães SL, Baldani VLD, Reis Jr FB, Silva LG, Reis VM, Teixeira KRS and Döbereiner J (2000) Biological Nitrogen Fixation (BNF) in non-leguminous plants: the Role of Endophytic Diazotrophs. *Curr Plant Sci Biotechnol Agric* 38:397-400.
- Bao H, Chen X, Lv S, Jiang P, Feng J, Fan P, Nie L and Li Y (2015) Virus-induced gene silencing reveals control of reactive oxygen species accumulation and salt tolerance in tomato by  $\gamma$ -aminobutyric acid metabolic pathway. *Plant Cell Environ* 38(3):600-13.
- Bertalan M, Albano R, de Pádua V, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, Teixeira K, Schwab S, Araujo J, Oliveira A, França L *et al.* (2009) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics* 23:450.
- Boaretto LF (2012) Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose. Doutorado (Ciências) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 177p.
- Buchanan B, Gruissem W and Jones (eds) (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland, pp 786-849.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:48–254.
- Canuto EL, Salles JF, Oliveira ALM, Perin L, Reis VM and Baldani JI (2003) Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. *Agronomia* 37:67-72.
- Canuto EL. Metodologias de inoculação e prospecção de compostos secretados por bactérias diazotróficas endofíticas na promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar (2008). Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, RJ.
- Cao X, Gao Y, Wang Y, Li CM, Zhao YB, Han ZH and Zhang XZ (2011) Differential expression and modification of proteins during ontogenesis in *Malus domestica*. *Proteomics* 11(24):4688-701.
- Cavalcante VA and Döbereiner J (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23-31.

- Cleenwerck I, De Vos P and De Vuyst L (2010) Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinus* subsp. *sacrofermentans* as *Gluconacetobacter sacrofermentans* (Toyosaki *et al.* 1996) sp. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60(10):2277-83.
- Colson ES and Deverall BJ (1996) Helping Plants Fight Their Own Disease Battles. *Australian CottonGrowers* 17:76-80.
- Conab (2015) Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar: safra 2013/2014: terceiro levantamento [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_04\\_10\\_09\\_19\\_04\\_boletim\\_de\\_cana.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_10_09_19_04_boletim_de_cana.pdf) (Jun 20, 2015).
- Dantán-González E, Rosenstein Y, Quinto C and Sánchez F (2001) Actin monoubiquitylation is induced in plants in response to pathogens and symbionts. *Mol Plant Microbe Interact* 14(11):1267-73.
- Demchenko KN, Voitsekhovskaja OV and Pawlowski K (2014) Plasmodesmata without callose and calreticulin in higher plants - open channels for fast symplastic transport? *Front Plant Sci* 5:74.
- Di Carli M, Benvenuto E and Donini M (2012) Recent insights into plant-virus interactions through proteomic analysis. *J Proteome Res* 11(10):4765-80.
- Diaz C, Kusano M, Sulpice R, Araki M, Redestig H, Saito K, Stitt M and Shin R (2011) Determining novel functions of *Arabidopsis* 14-3-3 proteins in central metabolic processes. *BMC Syst Biol* 5:192.
- Diz AP, Truebano M and Skibinski DO (2009) The consequences of sample pooling in proteomics: an empirical study. *Electrophoresis* 30(17):2967-75.
- Dos Santos MF, Muniz de Pádua VL, de Matos Nogueira E, Hemerly AS and Domont GB (2010) Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *J Proteomics* 73:917-931.
- Doyle JJ and Doyle JL (1991) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1:13-15.
- FAOSTAT (2012) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Nov 15, 2012).
- Fichman Y, Gerdes SY, Kovács H, Szabados L, Zilberstein A and Csonka LN (2014) Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 4: 12146.
- Franke-Whittle IH, O'Shea MG, Leonard GJ and Sly LI (2005) Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. *Microb Ecol* 50:128-139.
- Gollan PJ, Ziemann M and Bhave M (2014) PPlase activities and interaction partners of FK506-binding proteins in the wheat thylakoid. *Physiol Plant* 143(4):385-395.
- Hurkman WJ and Tanaka CK (1986) Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis *Plant Physiol* 81:802-806.

- James EK, Olivares FL, de Oliveira AL, dos Reis FB Jr, da Silva LG and Reis VM (2001) Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J Exp Bot* 52:747-60.
- Koo AJ, Thireault C, Zemelis S, Poudel AN, Zhang T, Kitaoka N, Brandizzi F, Matsuura H and Howe GA (2014) Endoplasmic reticulum-associated inactivation of the hormone jasmonoyl-L-isoleucine by multiple members of the cytochrome P450 94 family in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 289(43):29728-38.
- Komatsu S, Kamal AH and Hossain Z (2014) Wheat proteomics: proteome modulation and abiotic stress acclimation. *Front Plant Sci* 8:684.
- Lambeck IC, Fischer-Schrader K, Niks D, Roeper J, Chi JC, Hille R and Schwarz G (2012) Molecular mechanism of 14-3-3 protein-mediated inhibition of plant nitrate reductase. *J Biol Chem* 287(7): 4562-71.
- Lima L, Seabra A, Melo P, Cullimore J and Carvalho H (2006) Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase of *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* 57(11):2751-61.
- Leal LT (2011) Resposta de genótipos de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas no Rio Grande do Sul. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2011.
- Lery LM, Coelho A, von Kruger WM, Gonçalves MS, Santos MF, Valente RH, Santos EO, Rocha SL, Perales J, Domont GB, Teixeira KR, Bertalan M, Ferreira PC and Bisch PM (2008a) Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. *Proteomics* 8:1631-44.
- Lery LM, von Krüger WM, Viana FC, Teixeira KR and Bisch PM (2008b) A comparative proteomic analysis of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 at exponential and stationary phases of cultures in the presence of high and low levels of inorganic nitrogen compound. *Biochim Biophys Acta* 1784:1578-89.
- Lery LM, Hemerly AS, Nogueira EM, Von Krüger WM and Bisch PM (2011) Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *Mol Plant Microbe Interact* 24:562-576.
- Li J, Shefcheck K, Callahan J and Fenselau C (2010) Primary sequence and site-selective hydroxylation of prolines in isoforms of a major peanut allergen protein Ara h 2. *Protein Sci* 19(1):174-82.
- Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay M and van der Lelie D (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21:583-606.
- Lohse M, Nagel A, Herter T, May P, Schroda M, Zrenner R, Tohge T, Fernie AR, Stitt M and Usadel B (2014) Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. *Plant Cell Environ* 37(5):1250-8.

- Luvizotto, DM (2008) Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* sp. associadas às raízes de cana-de-açúcar. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2008.
- Marafon AC (2012) Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimentoprático. Embrapa Tabuleiros Costeiros 29 p.
- Menossi M, Silva-Filho MC, Vincentz M, Van-Sluys MA and Souza GM (2008) Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. *Int J Plant Genomics* 2008:458732.
- Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT and Thomas PD (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature Protocols* 8:1551-1566.
- Moreira FMS, Silva K, Nóbrega RSA and Carvalho F (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae* 1:74-99.
- Nogueira EM, Vinagre F, Masuda HP, Vargas C, Pádua VLM, Silva FR, Santos RV, Baldani JI, Ferreira PCG and Hemerly AS (2001) Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Genet Mol Biol* 24:1-4.
- Oliveira ALM, Urquiaga S, Dobereiner J and Baldani JI (2002) The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants *Plant Soil* 242:205-215.
- Pacheco CM, Pestana-Calsa MC, Gozzo FC, Nogueira RJMC, Menossi M and Calsa T Jr (2013) Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. *J Proteome Res* 12:5681-95.
- Pereira W, Leite JM, Hipólito GS, dos Santos CLR and Reis VM (2013). Biomass accumulation in sugarcane varieties inoculated with different strains of diazotrophs. *Rev Ciênc Agron* 44:2.
- Polidoro JC, Resende AS, Quesada DM, Xavier RP, Coelho, CHM, Alves BJR, Boddey RM and Urquiaga S (2001) Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil. EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica, EMBRAPA Documentos, 144, p 8.
- Postel S and Kemmerling B (2009) Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Semin Cell Dev Biol* 20:1025-31.
- Rodriguez Neto J, Malavolta Júnior VA and Victor O (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopatol* 12:16.
- Saibi W, Brini F, Hanin M and Masmoudi K (2013) Development of energy plants and their potential to withstand various extreme environments. *Recent Pat DNA Gene Seq* 7:13-24.
- Saijo Y, Tintor N, Lu X, Rauf P, Pajerowska-Mukhtar K, Haeweker H, Dong X, Robatzek S and Schulze-Lefert P (2009) Receptor quality control in the endoplasmic reticulum for plant innate immunity. *EMBO J* 28:3439-3449.

- Shishkova S, Las Peñas ML, Napsucialy-Mendivil S, Matvienko M, Kozik A, Montiel J, Patiño A and Dubrovsky JG (2013) Determinate primary root growth as an adaptation to aridity in Cactaceae: towards an understanding of the evolution and genetic control of the trait. *Ann Bot* 112(2):239-52.
- Stefano G, Renna L, Hanton SL, Chatre L, Haas TA, Brandizzi F (2006) ARL1 plays a role in the binding of the grip domain of a peripheral matrix protein to the golgi apparatus in plant cells. *Plant Molecular Biology* 61:431-449.
- Stephan MP, Oliveira M, Teixeira KRS, Martinez-Drets G and Döbereiner J (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett* 77:67-72.
- Tokeshi H (1997) Doenças da cana-de-açúcar. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A and Camargo LEA (eds) *Manual de Fitopatologia Doenças das plantas cultivadas*. Agronômica Ceres, São Paulo, pp. 207-225.
- Uematsu K, Suzuki N, Iwamae T, Inui M and Yukawa H (2012) Expression of *Arabidopsis* plastidial phosphoglucomutase in tobacco stimulates photosynthetic carbon flow into starch synthesis. *J Plant Physiol* 169:1454-1462.
- Vallad GE and Goodman RM (2004) Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Sci* 44:1920-34.
- Van Dillewijn C and Waltham M (1952) *Botany of sugarcane*. New York: Chronica Botanica 371p.
- Waclawovsky AJ, Sato PM, Lembke CG, Moore PH, Souza GM (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnol J* 8(3):263-76.
- Wu L, Han Z, Wang S, Wang X, Sun A, Zu X and Chen Y (2013) Comparative proteomic analysis of the plant-virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. *J Proteomics* 26 (89):124-40.
- Yang B, Ma HY, Wang XM, Jia Y, Hu J, Li X and Dai CC (2014) Improvement of nitrogen accumulation and metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) by the endophyte *Phomopsis liquidambari*. *Plant Physiol Biochem* 82:172-182.

## 5. Capítulo II

Proteômica da interação patogênica entre *Leifsonia xyli* subps. *xyli* e cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Renata Rodrigues de Almeida<sup>1</sup>, Andrea Chaves<sup>2</sup> Tercilio Calsa Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética, Centro de Ciências e Biologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

<sup>2</sup>Estação Experimental de cana-de-açúcar de Carpina, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

Artigo a ser submetido à revista **Genetics and Molecular Biology**.

## Resumo

A cana-de-açúcar é constantemente exposta a diversos tipos de estresses, que podem afetar significativamente o seu desenvolvimento, refletindo diretamente na produtividade e rendimento. O raquitismo-da-soqueira, causado por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é considerado uma das mais importantes doenças bacterianas da cana-de-açúcar, podendo infectar até 100% do canavial. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar proteínas diferencialmente expressas em cana-de-açúcar inoculadas com Lxx, através de eletroforese bidimensional (2-DE) associada à espectrometria de massas (MS). Colmos de cana-de-açúcar (variedade RB867515) foram tratados termicamente e submersos em suspensão de células de *L. xyli* subsp. *xyli* (estirpe CTC B07) na concentração de  $10^9$  ml<sup>-1</sup>. Após quatro meses foi coletada a folha +1 e em seguida realizada a extração de proteínas totais, referentes aos tratamentos inoculado (Lxx) e não-inoculado (Controle), em triplicata, e quantificadas. Os extratos proteicos foram aplicados em strips de 11cm, pH 3-10, em seguida focalizados em sistema IPGPhor. Os mapas 2-DE obtidos foram analisados no software ImageMaster 2D Platinum v.7.05. Os espectros trópticos foram obtidos no espectrômetro MALDI-ToF-ToF, Autoflex III. As proteínas diferencialmente expressas (DEPs) foram identificadas por PMF (*Peptide Mass Fingerprint*) contra a base de dados: Swissprot, Saccharum\_7061 ou Lxx\_proteome; taxonomia: Viridiplantae e Actinobacteria. Os resultados da eletroforese bidimensional com a interação cana-de-açúcar/Lxx mostraram que 138 spots apresentaram nível de expressão alterado. A análise por espectrometria de massa identificou 56 proteínas responsivas a estresses bióticos, defesa e metabolismo de carboidratos. Variações detectadas no proteoma foliar de cana-de-açúcar contribuem de forma significativa para o melhor entendimento da interação cana-de-açúcar x *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* uma vez que foi possível observar mecanismos moleculares utilizados pelas plantas sugerindo alvos com elevado potencial de utilidade em estratégias de seleção, melhoramento genético e estudos moleculares nesta cultura para otimização da resistência ao Raquitismo-da-soqueira.

**Palavras-chave:** Espectrometria de Massas; *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; Raquitismo-da-Soqueira; Proteômica.

## Abstract

The sugarcane is constantly exposed to various types of stress, which can significantly affect their development, reflecting directly on productivity and income. Ratoon Stunting Disease caused by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) is considered one of the most important bacterial diseases of sugarcane and could infect up to 100% of the sugarcane plantation. In this context, the aim of this study was to identify proteins differentially expressed in sugarcane inoculated with Lxx by two-dimensional electrophoresis (2-DE) associated with mass spectrometry (MS). Sugarcane stalks (variety RB867515) were heat-treated and immersed in sleep cells *L. xyli* subsp. *xyli* (CTC B07 strain) at a concentration of  $10^9$  ml<sup>-1</sup>. After four months was collected +1 leaf and then performed the extraction of total proteins, relative to the inoculated treatments (Lxx) and non-inoculated (Control) in triplicate, and quantificated. The protein extracts were applied to strips of 11 cm, pH 3-10, and then focused on IPGphor system. 2-DE maps were analyzed in ImageMaster 2D Platinum v.7.05 software. Tryptic spectra were obtained in the MALDI-ToF-ToF spectrometer, Autoflex III. The differentially expressed proteins (DEPs) were identified by PMF (Peptide Mass Fingerprint) against the database: Swissprot, Saccharum\_7061 or Lxx\_proteome; taxonomy: Viridiplantae and Actinobacteria. The results of two-dimensional electrophoresis with sugarcane/Lxx interaction showed that 138 spots overexpressed. The analysis by mass spectrometry identified 56 proteins responsive to biotic stresses, defense and carbohydrate metabolism. Variations detected in significantly leaf proteome of sugarcane contribute to a better understanding of the interaction sugarcane x *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* since it was observed molecular mechanisms used by plants suggesting targets with high potential for use in strategies of selection, breeding and molecular studies in this culture to optimize the resistance Ratoon Stunting Disease.

**Keywords:** Mass Spectrometry; *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; Ratoon Stunting Disease; Proteomics.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma importante cultura agrícola cultivada em diversos países, sendo uma das culturas mais plantadas no mundo (FAO, 2013). Entretanto, a cana-de-açúcar está sujeita aos riscos climáticos e fitossanitários no ambiente, que podem influenciar negativamente a produtividade da cultura, causando grandes impactos no mercado (Carneiro Jr. *et al.*, 2006; Marin, 2007). Dentre os principais estresses bióticos que afetam a cana-de-açúcar estão as doenças como o raquitismo-da-soqueira, a escaldadura das folhas e a ferrugem (Rossetto e Santiago, 2007).

A doença raquitismo da soqueira (RSD) é considerada uma das mais graves para cultura de cana-de-açúcar, podendo causar prejuízos de 30% da produtividade e infeccionar até 100% do canavial (Rossetto e Santiago, 2007). O RSD é causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) (Evtushenko *et al.*, 2000), uma bactéria gram-positiva, corineiforme, não móvel, aeróbica obrigatória e restrita ao xilema das plantas (Cardoso, 1986). A Lxx é considerada um patógeno oculto já que os sintomas provocados em cana-de-açúcar são discretos quando comparados aos sintomas causados por bactérias necrogênicas (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2009). O sintoma externo observável é o raquitismo (encurtamento dos entrenós), não sendo facilmente reconhecido no campo, uma vez que podem ser confundido com vários fatores, incluindo práticas culturais, umidade inadequada e deficiência nutricional. Internamente podem ser observadas manchas avermelhadas pontuais perto do meristema apical e nos nós de plantas jovens, enquanto que os entrenós não sofrem descoloração (Metzler *et al.*, 1997).

Durante a ocorrência de estresses bióticos, há uma indução da resistência nas plantas através de uma complexa rede de percepção, amplificação

e transdução de sinais que incluem o reconhecimento de elicitores produzidos pelo patógeno, cascatas de fosforilação, fluxo diferencial de íons, ativação de compostos oxidativos, geração de sinais secundários e, finalmente a ativação de vários genes de defesa, a fim de tolerar estes estresses (Wang *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2003; De Wit, 2007). Embora o custo metabólico e energético destes mecanismos possa, em alguns casos, resultar em baixa produtividade. Dessa forma, as plantas utilizam uma série de estratégias para promover a defesa contra patógenos.

A primeira estratégia é física, compreende a formação de uma barreira entre a célula e o patógeno, através do fortalecimento da parede celular com a produção de enzimas ligadas à biossíntese de lignina, formação de camadas de cortiça bem como a formação de calos após o ataque de um micro-organismo (Chisholm *et al.*, 2006). As plantas apresentam resistência à maioria dos micro-organismos potencialmente patogênicos, a chamada resistência inata, sugerindo que essa resistência possua diversos componentes e que seja complexa e não patógeno-específica (Heath, 1991). Segundo Salvaudon *et al.* (2005), esta também seria a segunda estratégia para se defender das doenças: a produção de metabólitos secundários e enzimas hidrolíticas como componentes antimicrobianos, chamada desta vez de resistência não específica. Esses componentes seriam produzidos uma vez detectados a presença de *Microbe-Associated Molecular Patterns* (MAMPs) ou *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (Miya *et al.*, 2007). Estes padrões também são responsáveis pela existência da relação de simbiose entre alguns microrganismos e seus hospedeiros, pois a mesma só se torna possível uma vez que ocorra o

reconhecimento das moléculas sinalizadoras da planta por parte do patógeno (Brencic e Winans, 2005).

Através do sequenciamento do genoma completo da Lxx em 2004 (Monteiro-Vitorello, 2004) e as crescentes abordagens de genômica funcional da cana-de-açúcar pelo banco de dados de transcritos SUCEST-FUN, é possível realizar um estudo de genômica funcional visando elucidar os mecanismos de tolerância da cana-de-açúcar frente a estresses bióticos, como o RSD. O uso de ferramentas proteômicas, neste cenário, pode fornecer importantes informações para identificar, quantificar e estudar as modificações pós-traducionais das proteínas relacionadas na interação planta/patógeno (Pandey e Mann, 2000).

Carvalho (2012) realizou um estudo proteômico em duas variedades de cana-de-açúcar (RB835486 e SP80-3280) em resposta à colonização por Lxx. Identificaram-se proteínas exclusivas relacionadas ao crescimento da planta, ciclo celular e sinalização celular e hormonal na variedade SP80-3280 inoculada, enquanto que em plantas não inoculadas da variedade RB835486 foi observada repressão de proteínas da via de estresse e metabolismo primário.

A análise proteômica de cana-de-açúcar tem se focado em estudos moleculares acerca de estresses abióticos, como salinidade (Pacheco *et al.*, 2013) seca (Ribeiro, 2010) e estresse oxidativo (Carvalho, 2012). A interação planta-patógeno, a nível proteômico, é pouco relatada para a cultura da cana-de-açúcar (Dos Santos *et al.*, 2010; Lery *et al.*, 2011; Carvalho, 2012). Dessa forma, a identificação de peptídeos produzidos diferencialmente em plantas de cana-de-açúcar inoculada com a bactéria patogênica *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, pode auxiliar o entendimento das vias metabólicas ativadas na planta para enfrentar o estresse causado por esse micro-organismo.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Material Vegetal e Inoculante

Os entrenós de colmos de cana-de-açúcar variedade RB867515 foram fornecidos gentilmente pela RIDESA/EECAC (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro/Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina-UFRPE). A cepa da bactéria *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) CTC B07, foi fornecida pelo Departamento de Fitopatologia e Nematologia-ESALQ/USP (Piracicaba-SP)

### 5.2.2 Tratamento térmico

A fim de minimizar infecções nos colmos, ou seja, nos rebolos de gema única da variedade RB867515 foram utilizados em casa de vegetação, após serem submetidos a tratamento térmico de acordo com metodologia apresentada por Tokeshi (2005). Os rebolos foram colocados em sacos de polipropileno e submersos em água a 50,5°C por 2 h (Figura 1A). Após a submersão, os colmos foram deixados em temperatura ambiente para permitir o resfriamento dos mesmos e prosseguir com a inoculação da bactéria.

### 5.2.3 Preparo do inóculo e inoculação dos colmos

A estirpe da bactéria *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) CTC B07, foi crescida em meio líquido MSC new modificado por Monteiro-Vitorello e colaboradores (2004) por 10 dias a 28°C, 130 rpm. O crescimento foi acompanhado até o inóculo atingisse densidade ótica 0,335 a 600 nm, que corresponde à fase exponencial de crescimento (Rosa, 2006), a aproximadamente  $10^{12}$  células.mL<sup>-1</sup>. Uma alíquota do

inóculo foi diluída em 2 L de água estéril para obtenção de suspensão a aproximadamente  $10^9$  células.mL<sup>-1</sup>. Para o experimento, os colmos tratados termicamente foram submersos na suspensão de célula na concentração determinada acima por uma hora. O tratamento controle foi realizado através de submersão dos segmentos de colmo em água esterilizada nas mesmas condições (Figura 1B).

Após a inoculação, os colmos foram acondicionados em bandejas de polietileno contendo solo autoclavado para brotação (Figura 1C).

#### **5.2.4 Delineamento experimental**

O experimento de casa de vegetação foi conduzido na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina (EECAC), Universidade Federal Rural de Pernambuco, no período de setembro 2012 a fevereiro 2013. Após brotação dos colmos inoculados com Lxx, com 30 dias, plantas isoladas foram transferidas para vasos de polietileno com solo autoclavado, distribuídos obedecendo ao delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (Controle, Lxx), e cinco repetições (Figura 1D).



**Figura 1.** Montagem do experimento *in vivo* em casa de vegetação, mostrando o tratamento térmico dos colmos de cana-de-açúcar. (A) Inoculação dos colmos com a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). (B) Colmos inoculados colocados para brotação em bandejas. (C) Plantas já desenvolvida após dois meses de transplantio (D).

Após quatro meses do transplantio, foram coletadas folhas +1 [a primeira folha que apresenta bainha visível conforme denominação de Van Dillewijn (1952)], as amostras coletadas foram cortadas em frações menores, colocadas em tubos cônicos de 50 mL (Falcon), imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em gelo seco, até estocagem a -80°C.

### 5.2.5 Confirmação da inoculação com Lxx e colonização das plantas

A fim de confirmar a presença diferencial de Lxx nas amostras coletadas nos tratamentos do experimento em casa-de-vegetação, foi extraído DNA total do material vegetal coletado (Doyle e Doyle, 1991) para PCR convencional utilizando os seguintes primers específicos da região ITS do genoma de Lxx (Fegan *et al.*, 1998): LxxF (5'-AGGATTCGGTTCTCATCTCA-3') e LxxR (5'-AAGGAGCATCTGGCACCCT-3'). As reações para amplificação em *nested*-PCR (2x) foram: 96°C por 5 min; 35 ciclos de: 92°C por 15 s, 57°C por 30 s e 72°C por 30 s (amplicon de 305 pb); e extensão final a 72°C por 5 min (Fegan *et al.*, 1998).

Foi utilizada também a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a confirmação da presença diferencial de Lxx entre os tratamentos. Para a qPCR foram utilizados os mesmos primers específicos da região ITS de Lxx que na PCR convencional. As reações de qPCR foram conduzidas empregando a tecnologia SYBR Green® (Molecular Beacons) no sistema RotorGene 6000 (Corbett Research), disponibilizado pelo Laboratório de Genética Humana e Animal, do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco. A reação de amplificação foi realizada em volume de 15 µL, contendo 20 ng do DNA molde, 0,4 µM de cada primer, 2x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) e água ultrapura (Milli-Q) estéril.

A qPCR ocorreu com os seguintes parâmetros: 95°C por 5 min; seguidos de 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 10 s, anelamento a 57°C por 15 s, extensão a 60°C por 60 s. Ao final, o produto obtido foi submetido ao protocolo de dissociação ajustado de 60 a 95°C, para obtenção da curva de dissociação (*melting*). Foram comparados os valores de Cq (ciclo de quantificação) encontrados

nas plantas controle (não inoculadas) com as plantas inoculadas (Lxx), a fim de verificar a concentração relativa de DNA de Lxx nas plantas coletadas.

#### **5.2.6 Variáveis morfométricas**

Para um melhor entendimento sobre os mecanismos que conferem aumento na eficiência produtiva da cultura de cana-de-açúcar, foram mensuradas as variáveis morfométricas: comprimento da folha+1, altura da planta, número de perfilhos, número de entrenós e diâmetro do 4º entrenó a partir do ápice caulinar das plantas (Marafon, 2012). Os dados morfofisiológicos obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do programa estatístico Assistat 7.5 Beta.

#### **5.2.7 Extração de proteínas**

As proteínas totais da folha +1 de cana-de-açúcar foram extraídas utilizando-se método com fenol (Hurkman e Tanaka, 1986) com modificações conforme Boaretto (2012). Dois gramas de folhas congeladas foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de pó fino e homogeneizados em 15 mL de tampão de extração em tubos (50 mL) e mantidos sob agitação constante a 70 rpm a 4°C por 30 min. Foram adicionados 15 mL de fenol saturado com Tris-HCl (pH 8,5). Em seguida, os tubos foram novamente mantidos em agitação constante a 70 rpm a 4°C por 30 min.

Os tubos foram centrifugados a 10.000xg por 30 min a 4°C, e o sobrenadante (fase orgânica) foi coletado e transferido para tubo novo, sendo adicionado a este cinco volumes de 0,1 M de acetato de amônio dissolvido em metanol 100%. Os tubos foram mantidos a -20°C durante 18 h para precipitação das proteínas, e em

seguida centrifugados a 16.000xg por 30 min a 4°C. Após descarte do sobrenadante, o precipitado (*pellet*) foi lavado três vezes sob centrifugação a 16.000xg por 30 min a 4°C com 0,1 M de acetato de amônio dissolvido em metanol 100%, uma vez com metanol 100% e uma vez com acetona 100%. Antes de cada centrifugação, os tubos permaneceram por uma hora a -20°C. No final das lavagens, os tubos permaneceram abertos, acondicionados em gelo, em câmara de fluxo laminar até a secagem completa do *pellet*. Após secagem, os *pellets* foram solubilizados em solução de ureia 8 M e tioureia 2 M, e submetidos à sonicação em 60% de amplitude em cinco pulsos de 5 s intercalados com pausas de 10 s. As proteínas solúveis totais foram quantificadas conforme método descrito por Bradford (1976). As leituras foram realizadas em triplicata por meio de espectrofotômetro de luz visível (Biospectro SP-220) a 595 nm. A verificação da qualidade dos extratos de proteínas das amostras foi feita mediante visualização em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5%. Foi realizada extração de proteínas de cada uma das cinco réplicas biológicas de cada tratamento, sendo os extratos obtidos reunidos em um único tubo.

## **5.2.8 Eletroforese bidimensional**

### **5.2.8.1 Focalização isoelétrica (IEF)**

A IEF foi realizada em fita IPG de 11 cm e pH 3-10 linear (GE Life Sciences) para 150 µg de proteínas totais das amostras de folha dissolvidas em solução de ureia 7 M, tioureia 2 M, CHAPS 2% (m/v), 19,4 mM de DTT, anfolinas 0,5% (v/v) (IPG buffer, pH 3-10 linear; GE Life Sciences) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). A hidratação das fitas foi realizada em IPG-Box (GE Life Sciences) a

temperatura ambiente por 18 h. As fitas foram focalizadas no sistema Ettan IPGphor 3 (GE Life Sciences), em quatro etapas nas seguintes condições: i) 500 V, 1 h; ii) 800 V, 1 h; iii) 7.000 V; 1 h (gradiente); e iv) 2.200 V (constante). Após a focalização, as fitas foram armazenadas a -80°C até a realização da segunda dimensão.

#### **5.2.8.2 Eletroforese (2D-PAGE)**

Para a segunda dimensão (eletroforese), foram realizadas a redução e alquilação das fitas focalizadas anteriormente. Estas foram submetidas à redução através da imersão em tampão de equilíbrio contendo 2% DTT (ditiotreitól) e traços de corante bromofenol por 20 min. Decorrido esse tempo, as fitas foram transferidas e imersas em nova solução de equilíbrio contendo 4% de IAA (iodoacetamida) e traços do corante bromofenol por mais 20 min. A segunda dimensão, ou eletroforese, foi realizada no sistema Omniphor MV 20 (Biosystems) em SDS-PAGE 12.5%, utilizando uma fita de IEF por gel, constando das seguintes etapas: 40 mA por 15 min, 80 mA por 30 min, 100 mA por 2:30 h; voltagem fixa de 300 V. Foram obtidos géis em triplicata para cada tratamento analisado (Controle e Gd). Os géis foram mantidos por 30 min em solução fixadora (etanol 40%, ácido acético 10%) e, posteriormente, imersos na solução de coloração [metanol 20%, ácido acético 5% e água deionizada, solução de azul de *coomassie* (Phastgel Blue R, GE Life Sciences) 50%] durante 18 h. Em seguida, os géis foram submetidos à imersão em solução descorante (etanol 20%, ácido acético 5%) por 15 min, 45 min e duas vezes por 2 h. Após a descoloração, os géis foram armazenados em solução de preservação (ácido acético 5%).

### 5.2.9 Digitalização e análise de imagens

Os géis foram digitalizados com auxílio de *scanner* de transparência ImageScanner III (GE Life Sciences) calibrado para densidade ótica, utilizando-se o programa LabScan 6.0 (GE Life Sciences) com os seguintes parâmetros: modo de transparência, resolução de 150 DPI e filtro vermelho, ideal para coloração de géis com azul de *Coomassie*. Para a captura da imagem foi realizada previamente uma etapa de calibração do scanner com a fita de calibração Kodak 3, que apresenta valores de densidade ótica ou difusa definidos, conforme procedimentos recomendados pelo fabricante. As imagens dos géis foram analisadas no software de análise ImageMaster 2D Platinum v.7.05 (GE Life Sciences). Todas as triplicatas de géis de cada tratamento, ou réplicas técnicas, foram submetidas aos mesmos parâmetros de análise comparativa para detecção e seleção de *spots* (manchas coradas delimitadas e representativas de proteínas), conforme Pacheco *et al.* (2013), com inspeção visual para eliminação de interferentes como bolhas e artefatos da coloração. Nas comparações das triplicatas entre os tratamentos, foram selecionados como *spots* diferenciais aqueles que apresentaram razão de variação no parâmetro normalizado porcentagem de volume (%vol)  $\geq 1,5$  e ANOVA  $\leq 0,05$ . Estes *spots* selecionados foram denominados DEPs (proteínas diferencialmente expressas).

### 5.2.10 Digestão com tripsina

Os *spots* com variação significativa entre tratamentos (proteínas com acúmulo diferencial estatisticamente significativo) foram excisados manualmente de uma das réplicas técnicas (géis) com auxílio de bisturi e incubados em solução descolorante contendo metanol 50% e ácido acético 2,5% durante 18 h, em

temperatura ambiente, para remoção do corante. Após desidratação em acetonitrila 100%, as proteínas (*spots*) sofreram redução e em seguida aquilação. Inicialmente, os fragmentos de gel foram reidratados com 10 mM DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 30 min a 60°C. O excesso do líquido foi removido e substituído por 30 µL de solução 10 mM IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio. Em seguida, os fragmentos foram mantidos no escuro por 30 min, a temperatura ambiente. O líquido excedente foi então removido, os fragmentos lavados com 100 mM de bicarbonato de amônio e novamente desidratados com acetonitrila 100%. Posteriormente a essas etapas, foram adicionados 30-50 µL (até cobrir o fragmento de gel) de solução com 20 ng/µL de tripsina para digestão da proteína, e as amostras foram incubadas em gelo por 30 min. Depois da reidratação, foi adicionada solução de bicarbonato de amônio 50 mM cobrindo todo o fragmento de gel, e a digestão mantida a 37°C por 16 h. Após este período, foram acrescentados à solução anterior 30-50 µL (até cobrir o fragmento de gel) de solução de extração [5% de ácido trifluoroacético (TFA) em 50% de acetonitrila], incubada por 1 h em gelo e centrifugada até 10.000xg para coleta e transferência do sobrenadante para outro tubo. A extração foi efetuada duas vezes. O sobrenadante de cada *spot* foi concentrado em concentrador a vácuo (*Speed-vac*, Eppendorf) e armazenado a -20°C até a realização das análises por espectrometria de massas.

#### **5.2.11 Espectrometria de massas**

Os espectros MS e MS/MS foram obtidos em espectrômetro Autoflex III MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonics) disponibilizado pela Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, CETENE, Recife-PE, usando matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma/C8982) e conforme os protocolos de

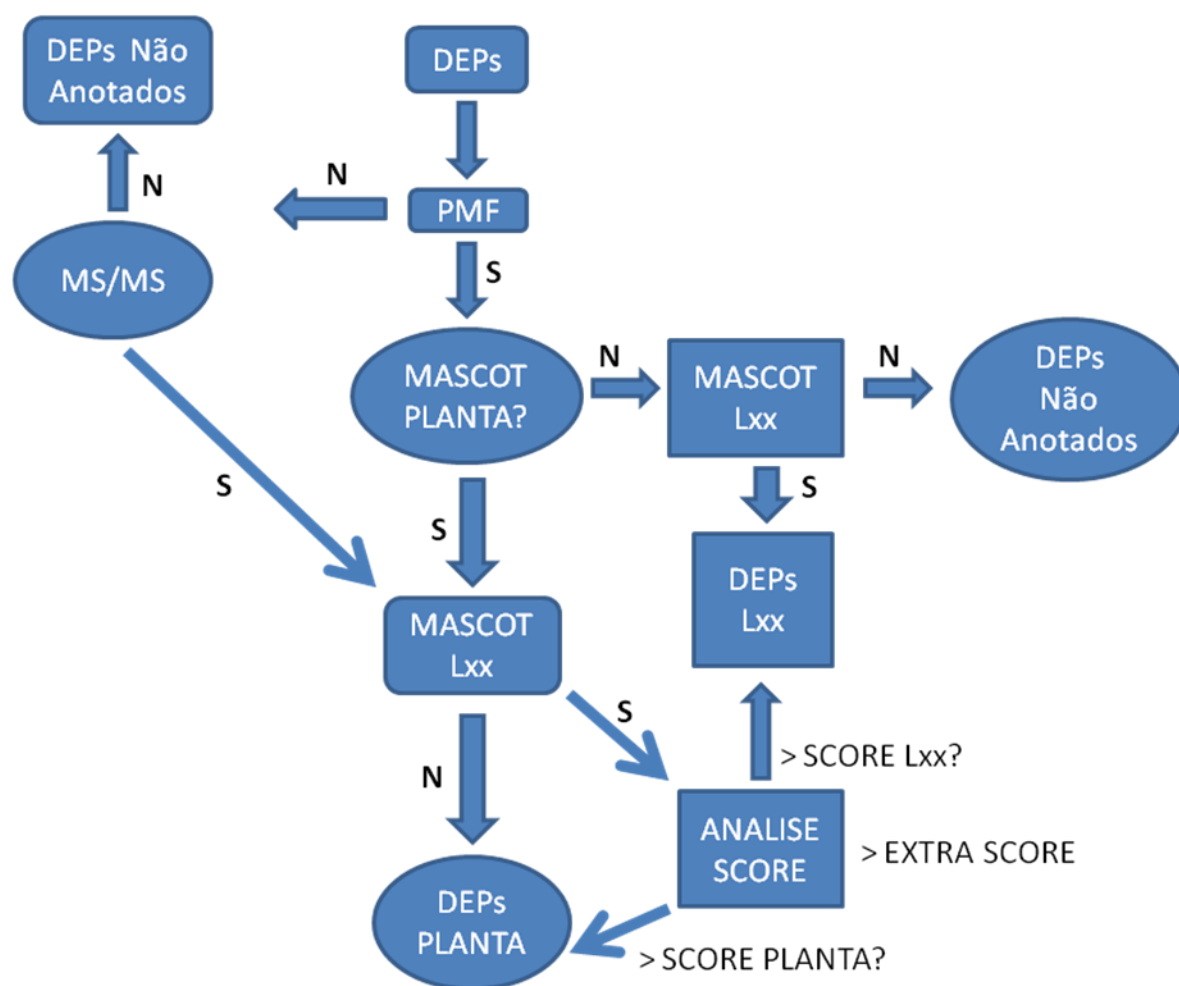
análise padronizados de: tipagem por massa de peptídeos (PMF - *peptide mass fingerprinting*; método refletido positivo RP\_Proteomics\_HPC) e busca de íons (*ion search*, método LIFT). Os íons foram acelerados a 19 KV, laser Nd:YAG smartbeam 355 nm, 100 Hz.

## 5.2.12 Análises de bioinformática

### 5.2.12.1 Identificação presumível

Para MS, os espectros foram identificados através da análise dos arquivos *peaklist.xml* no software Mascot (Matrix Inc.) pelo método de PMF contra os bancos de dados de: i) cana-de-açúcar (Saccharum\_7061) e Lxx (Lxx\_proteome) disponibilizados em colaboração com o Laboratório de Espectrometria de Massas Dalton (<http://daltonlab.iqm.unicamp.br>), do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, coordenado pelo Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo; e ii) Viridiplantae e Actinobacteria disponíveis na versão *online* do Mascot (<http://www.matrixscience.com>); utilizando-se os seguintes parâmetros: base de dados: Swissprot, Saccharum\_7061 ou Lxx\_proteome; taxonomia: Viridiplantae ou Actinobacteria; modificação fixa: carbamidometil (C); modificação variável: oxidação (M); e tolerância 200 ppm. Para a análise de dados MS/MS, realizada para as amostras não identificáveis via PMF, os espectros foram identificados através da análise dos respectivos arquivos *peaklist.xml* pelo método de busca de íons (*ion search*) contra os mesmos bancos de dados e parâmetros citados anteriormente, exceto: tolerância MS/MS 0,6 Da; e valor específico de massa/carga ( $m/z$ ) de cada respectivo íon precursor. Foram consideradas significativas as identificações com *score* maior que o valor limite (*cut-off*). O *score* equivale a -

$10.\log(P)$ , sendo  $P$  a probabilidade de a similaridade encontrada ser ao acaso. Valores de *score* acima do valor limite têm significância estatística ( $p < 0,05$ ). A identificação de DEPs em bancos de dados de origem vegetal ou bacteriana seguiu o fluxograma apresentado na Figura 2, para discriminar proteínas produzidas pela cana-de-açúcar ou por Lxx, e resultou na anotação de cada DEP associado a acessos do banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org>) e os respectivos descritores (Tabela 5).



**Figura 2.** Fluxograma da análise de identificação dos DEPs/MS (Proteínas diferencialmente expressas/Espectrometria de massas); PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*); MS/MS (Espectrometria de massas em *Tandem*) A base de dados de plantas refere-se sequencialmente ao banco de dados de cana-de-açúcar (*Saccharum\_7061*, Laboratório MS Dalton - <http://daltonlab.iqm.unicamp.br> , IQ-Unicamp) e Viridiplantae/Swissprot. A base de dados de Lxx refere-se sequencialmente ao banco de dados de *Leifsonia xyli* subsp.*xyli* (Lxx\_proteome, Laboratório MS Dalton - <http://daltonlab.iqm.unicamp.br> , IQ-Unicamp) e Actinobacteria/Swissprot.

### 5.2.12.2 Ontologia gênica (GO)

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas do UniProt através da ferramenta *Retrieve ID* e submetidas à análise de distribuição de ontologia gênica (GO) por processo biológico, e mapeadas comparativamente na espécie modelo *Arabidopsis thaliana* com o programa MapMan-Mercator (Lohse *et al.*, 2014; <http://mapman.gabipd.org/web/guest/mercator>) ajustado para base de dados de *A. thaliana* (TAIR proteins release 10) e *Blast\_cutoff* 80%. A distribuição de termos GO, ou categorias funcionais, do conjunto de DEPs de cada tratamento foi utilizada na comparação entre o controle (plantas não inoculadas com Lxx) e plantas inoculadas com Lxx.

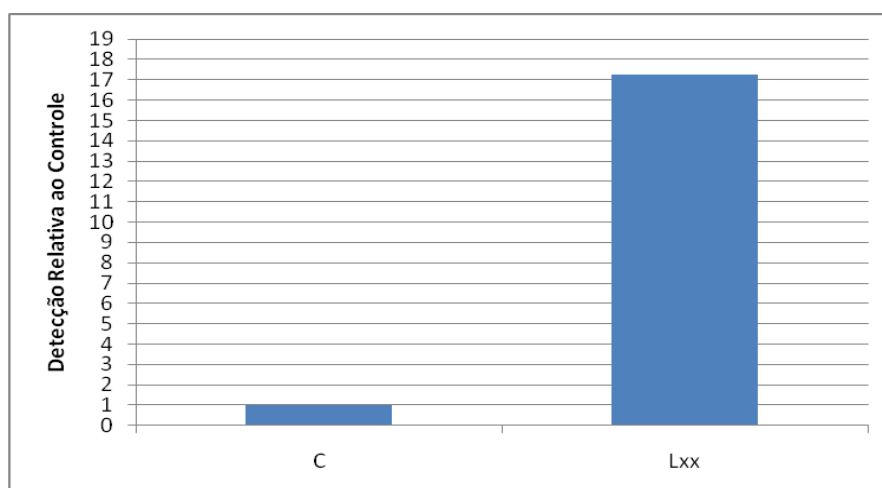
Adicionalmente, foi realizada análise de enriquecimento de termos de GO no programa Panther (Mi *et al.*, 2013; <http://www.pantherdb.org> acessado de <http://geneontology.org>) com parâmetros padronizados para mapeamento no banco de dados de proteínas/GO de *A. thaliana*. Para esta análise, cada acesso UniProt identificador das DEPs de cana-de-açúcar foi necessariamente mapeado para seu acesso UniProt mais similar no proteoma de *A. thaliana*, através do alinhamento das respectivas sequências FASTA no programa BLASTP/NCBI (parâmetros: database UniProtKB/Swissprot; organismo *Arabidopsis thaliana* (taxid:3702); *e-value*  $\leq 10^{-5}$ ). O conjunto de DEPs mais acumuladas no tratamento inoculado com Lxx foi considerado como lista de análise (*analyzed list*), a qual foi comparada com: i) o conjunto de DEPs mais acumuladas no tratamento não inoculado com Lxx ou controle; e ii) proteoma de referência obtido a partir do genoma de *A. thaliana*. O tipo de análise realizado no programa Panther foi o teste de super-representação,

com correção de Bonferroni e base de dados de ontologia (completa para processos biológicos) atualizada em junho/2015.

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Confirmação da inoculação com *L. xyli* subsp. *xyli*

Foi realizada a extração de DNA total da folha +1 de todas as réplicas biológicas de cada tratamento para confirmação da presença da *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, através da técnica de *nested*-PCR (Franke-Whittle *et al.*, 2005) para detectar baixa quantidade de DNA bacteriano na amostra. No entanto, não foi possível obter produto de amplificação visualmente detectável, nem mesmo com maior número de ciclos e/ou teste em gradiente de temperatura de anelamento dos *primers*. Já pelo método de qPCR, as análises para detecção de Lxx mostraram que as plantas inoculadas com a bactéria apresentaram valores de quantificação cerca de dezessete vezes maiores que aqueles encontrados nas folhas de plantas controle não inoculadas (Figura 3). Esses dados confirmaram carga bacteriana cerca de 17 vezes maior nas plantas inoculadas.



**Figura 3.** Quantificação Relativa por PCR em tempo real das amostras de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) em relação ao controle (C).

### 5.3.2 Variáveis morfométricas

Estatisticamente, nenhuma variável morfométrica apresentou diferença significativa entre tratamentos, apenas tendência geral de menor crescimento foliar (7%), altura da planta (10%) e diâmetro de entrenó, devido a possíveis efeitos inibidores de crescimento típicos deste fitopatógeno, tais como o encurtamento de entrenós (Ponte *et al.*, 2010). Este sintoma é característico da RSD e foi verificado no tratamento inoculado com Lxx a partir do comprimento médio de entrenós (razão entre altura da planta e o número de entrenós): no controle, o comprimento médio de entrenó foi de 14,5 cm, e nas plantas inoculadas com Lxx foi de 12,4 cm (Tabela 1). Estes resultados podem ser discutidos em relação à idade das plantas: na coleta, estavam com 4 meses, muito anterior à idade de 9 meses no qual os sintomas da RSD são mais evidentes e a capacidade de detecção via PCR é efetiva (Urashima e Grachet, 2012).

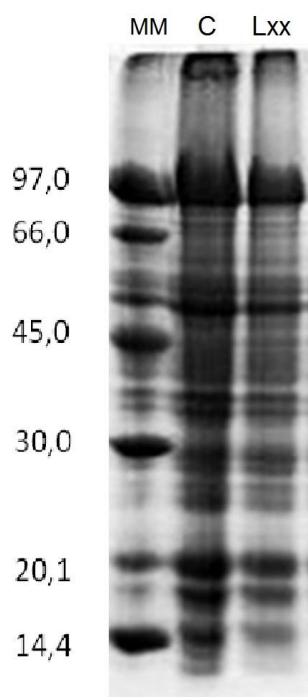
**Tabela 1.** Médias dos parâmetros morfométricos de cana-de-açúcar aos 120 dias após inoculação ou não com Lxx. Valores acompanhados pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

| Parâmetro                    | Controle | Lxx    | Diferença | Variação % |
|------------------------------|----------|--------|-----------|------------|
| Comprimento da Folha +1 (cm) | 68,00 a  | 62,8 a | -5,20     | -7,65      |
| Altura da planta (m)         | 1,25 a   | 1,12 a | -0,13     | -10,22     |
| Diâmetro do entrenó 4 (cm)   | 2,46 a   | 2,42 a | -0,04     | -1,63      |
| Nº de entrenós               | 8,60 a   | 9,00a  | 0,40      | 4,65       |
| Nº de perfilhos              | 3,60 a   | 3,60 a | 0,00      | 0,00       |

### 5.3.3 Extração de proteínas

O protocolo descrito por Hurkman e Tanaka (1986) e modificado por Boaretto (2012) para extração de proteínas totais foliares possibilitou recuperar e solubilizar proteínas em uma grande amplitude de massa molecular compatível com as análises posteriores. A visualização das proteínas extraídas em gel SDS-

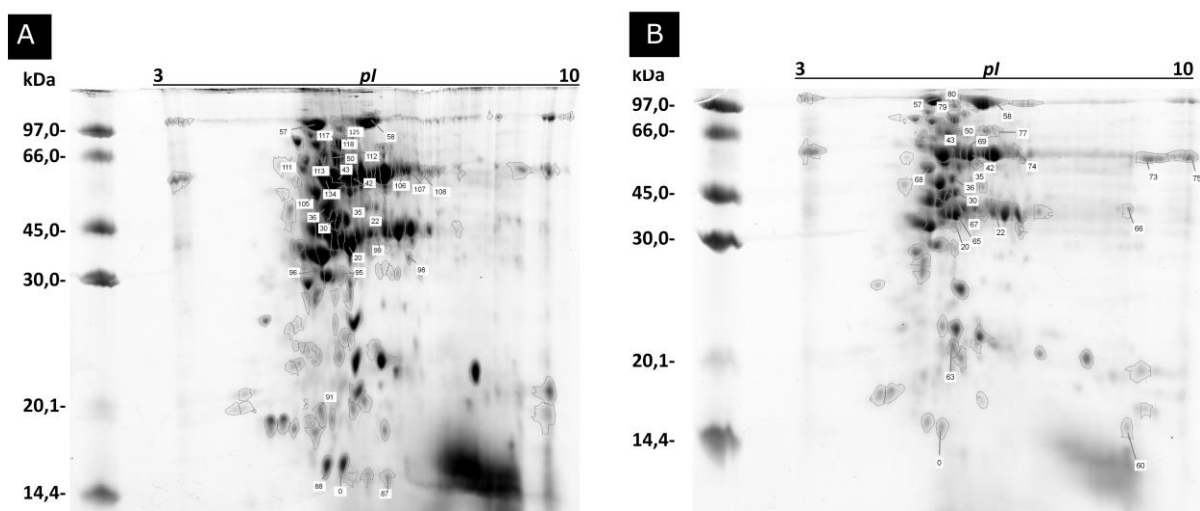
PAGE permitiu observar bandas bem definidas e ausência de rastros, apontando para a integridade e baixa concentração de interferentes (Figura 4). Realizaram-se cinco extrações de proteínas independentes, correspondendo a cada réplica biológica. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos independentemente e, posteriormente, misturados em um único tubo. O agrupamento das amostras visou reduzir a variação biológica, aumentando a capacidade de detecção de diferenças entre os tratamentos (Diz *et al.*, 2009). Outra vantagem dessa metodologia é permitir a análise de maior número de amostras em menor tempo e consumo de material.



**Figura 4.** SDS-PAGE com proteínas totais de amostras de folha de cana-de-açúcar não inoculadas (C) e inoculadas com a bactéria *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx). Marcador molecular de alto peso (MM), em kDa.

### 5.3.4 Eletroforese bidimensional (2D)

Foram obtidos três géis 2D-PAGE (réplicas técnicas) das réplicas biológicas reunidas de cada tratamento analisado para a variedade de cana-de-açúcar RB867515, inoculada ou não com Lxx. Exemplos destes géis são mostrados na Figura 5. Cada gel foi digitalizado em *scanner* de transparência calibrado para densidade ótica, e os arquivos de imagem foram utilizados para análise no programa ImageMaster Platinum v.7.05.



**Figura 5.** Imagens de géis 2D-PAGE utilizando extrato de proteínas totais de folha. A) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar não inoculado (Controle). B) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx).

### 5.3.5. Digitalização e análise de imagens

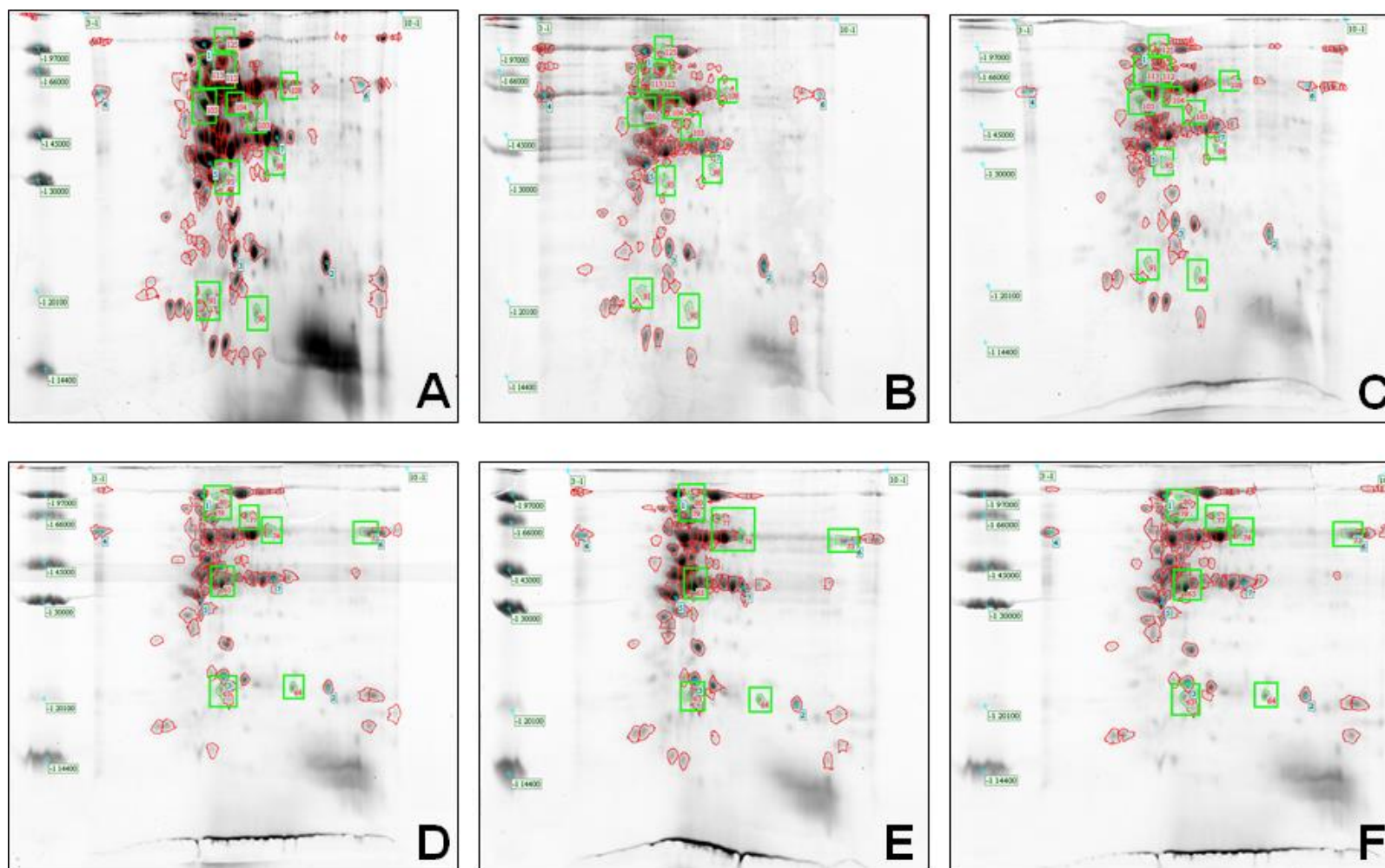
Os arquivos de imagem digitalizados foram analisados no programa ImageMaster Platinum v.7.05. Foi observado que as réplicas de um mesmo tratamento apresentaram similaridade significativa e foram, portanto analisáveis, conforme a média de coeficientes de correlação obtida de 0,859 no tratamento controle e 0,789 no tratamento inoculado com Lxx.

A eletroforese 2D permitiu a detecção de 766 *spots* nas amostras de réplicas técnicas dos tratamentos, distribuídos em média a 157 *spots*/gel (variando

de 144 a 180) no tratamento controle e 99 *spots*/gel (variando de 89 a 109) no tratamento inoculado com Lxx.

Após a análise comparativa entre os tratamentos das imagens digitalizadas (Figura 6), foram detectados 138 *spots* representativos de proteínas distintas, dos quais 51 foram detectados apenas no tratamento não inoculado com Lxx e 27 foram detectados apenas em plantas inoculadas com Lxx (Tabela 2). Dentre estes *spots*, denominados como exclusivos por não terem sido detectados via 2D-PAGE no outro tratamento, alguns não foram coletados por não apresentarem variação significativa na %vol (ANOVA  $\leq 0,05$ ) entre tratamentos.

Os demais 60 *spots* foram detectados em ambos os tratamentos (comuns), dos quais 23 tiveram maior acúmulo no controle não inoculado e 37 apresentaram maior acúmulo em plantas inoculadas com Lxx. Dos 23 *spots* comuns com maior acúmulo no tratamento controle, apenas quatro apresentaram variação significativa na %vol (ANOVA  $\leq 0,05$ ) e razão de variação (*ratio*)  $\geq 1,5$ . No tratamento inoculado com Lxx, 11 dos 37 *spots* comuns foram significativamente variáveis, dos quais 10 também tiveram (*ratio*)  $\geq 1,5$ . Deste modo, foram excisados dos géis 56 *spots* considerados DEPs, para identificação via MS.



**Figura 6.** Imagens de 2D-PAGE digitalizadas e após determinação de spots comuns (verdes) e exclusivos (vermelhos) em análise no programa ImageMaster Platinum 7.05. A, B e C: 2D-PAGE de amostras não inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp *xyli* (Lxx); D, E e F: 2D-PAGE de amostras inoculadas com Lxx.

**Tabela 2.** Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol  $\geq 1,5$  para cada tratamento controle (não inoculado) e Lxx (inoculado).

| Descrição                 | Tratamentos   |           |
|---------------------------|---------------|-----------|
|                           | Não inoculado | Inoculado |
| Spots analisados          | 74            | 64        |
| Média/réplica             | 157           | 99        |
| Comuns                    | 60            | 60        |
| Maior acúmulo             | 23            | 37        |
| ANOVA $\leq 0,05$         | 4             | 11        |
| e <i>ratio</i> $\geq 1,5$ | 4             | 10        |
| Exclusivos <sup>1</sup>   | 51            | 27        |
| ANOVA $\leq 0,05$         | 26            | 16        |
| DEPs <sup>2</sup>         | 30            | 26        |

<sup>1</sup>Não detectados no outro tratamento por 2D-PAGE.

<sup>2</sup>Proteínas diferencialmente expressas (*spots* comuns com ANOVA significativa e *Ratio*  $> 1,5$  + exclusivos com ANOVA significativa).

### 5.3.6. Espectrometria de massas (PMF, MS/MS)

Os DEPs selecionados a partir da análise comparativa em 2D-PAGE foram analisados em espectrometria de massas para sua identificação presumível em banco de dados de acesso público. Foram obtidos espectros de massa conforme descrito na Tabela 3. Na análise realizada em espectrômetro MALDI-ToF/ToF via PMF e busca de íons, apenas uma amostra do total de 56 digeridas com tripsina não resultaram em espectros de massa com qualidade necessária para análise no programa Mascot. A análise complementar por sequenciamento *de novo* das nove DEPs não identificadas está em andamento (dados não apresentados).

**Tabela 3.** Tabela de eficiência da análise em espectrometria de massas para as DEPs selecionadas para identificação.

| Descrição                      | Total | %      |
|--------------------------------|-------|--------|
| Deps coletados                 | 56    | 100,00 |
| Analizados PMF                 | 56    | 100,00 |
| Analisáveis                    | 55    | 98,21  |
| Identificados <sup>1</sup>     | 44    | 78,57  |
| Não identificados <sup>2</sup> | 3     | 5,36   |
| Analizados MS/MS               | 3     | 5,36   |
| Analisáveis                    | 3     | 5,36   |
| Identificados <sup>1</sup>     | 3     | 5,36   |
| Não identificados <sup>2</sup> | 0     | 0,00   |
| Anotados                       | 47    | 83,93  |
| Não identificados              | 9     | 16,07  |

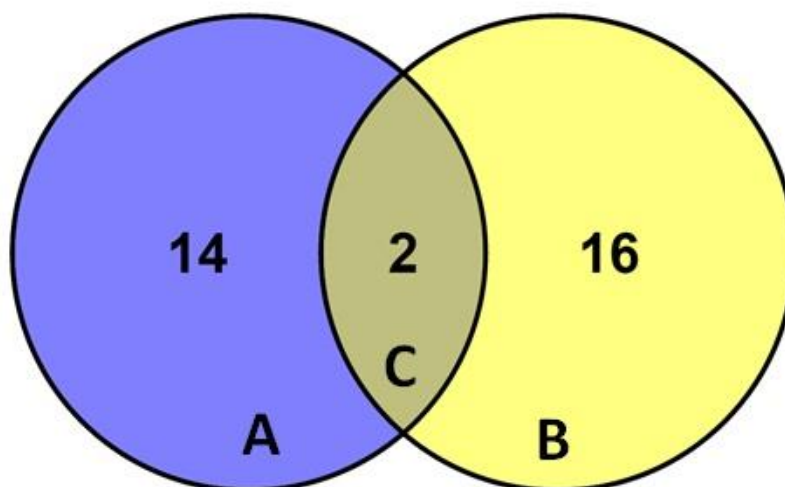
<sup>1</sup>Com score Mascot significativo ( $p < 0,05$ )

<sup>2</sup>Sem score Mascot significativo ( $p > 0,05$ )

### 5.3.7. Análises de Bioinformática

Conforme descrito anteriormente (Tabela 3), *spots* detectados e selecionados como significativamente variáveis entre tratamentos (DEPs) foram submetidos à análise por espectrometria de massas para obtenção de espectros com perfil  $m/z$  específicos, visando identificação presumível (*in silico*) e anotação em bancos de dados, para inferências funcionais potencialmente relacionadas com respostas moleculares da cana-de-açúcar aos tratamentos. A distribuição das anotações obtidas (Figura 7) demonstrou uma quantidade pouco maior de DEPs no tratamento inoculado com Lxx do que no tratamento controle, não inoculado. Ao contrário do esperado para um diagrama de Venn com estes tipos de dados, ou seja, com proteínas diferencialmente acumuladas em cada um dos conjuntos comparados, houve sobreposição de anotações entre DEPs de ambos os tratamentos: duas anotações foram iguais para *spots* diferentes oriundos dos dois tratamentos (proteínas Q40677, Q8H1X3).

## Não inoculado Inoculado Lxx



**Figura 7.** Diagrama de Venn representando as anotações de *spots* diferencialmente expressos na folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 nos tratamentos controle (não inoculado, A) ou inoculado com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (B), e identificados como proteínas da planta hospedeira. As duas anotações comuns no diagrama (C) referem-se à mesmas anotações para *spots* diferentes (proteínas Q40677, Q8H1X3). Os conjuntos A, B e C correspondem às identificações na Tabela 5.

### 5.3.7.1 Identificação presumível e anotação das DEPs

A identificação das proteínas selecionadas como diferenciais é apresentada nas Tabelas 4, 5 e 6, obtida através da análise dos arquivos *peaklist.xml* oriundos de PMF e/ou MS/MS no programa Mascot e considerando apenas as associações significativas ( $p \leq 0,05$ ). Com base no fluxograma da Figura 2, as proteínas foram presumivelmente discriminadas por organismo de origem, ou seja, cana-de-açúcar, *Leifsonia xyli* subsp. *Xyli* ou indeterminado, de acordo com a maior similaridade estatística obtida com o programa Mascot.

**Tabela 4.** Distribuição da identificação obtida para as DEPs selecionadas, conforme táxon de maior similaridade pela análise no programa Mascot.

| Descrição         | DEPs  |        |
|-------------------|-------|--------|
|                   | Total | %      |
|                   | 56    | 100,00 |
| Com identificação | 47    | 83,93  |
| Viridiplantae     | 41    | 73,21  |
| Poaceae           | 34    | 60,71  |
| <i>Saccharum</i>  | 27    | 48,21  |
| Actinobacteria    | 6     | 10,71  |
| <i>Leifsonia</i>  | 6     | 10,71  |
| Sem identificação | 9     | 16,07  |

**Tabela 5.** Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado *Leifsonia xyli* subsp *xyli* (Lxx) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE.

| Spot ID                    | Ratio Lxx/C | ANOVA    | Categoria GO        | Acesso     | Proteínas                            | Score | Organismo                              | pI    |      | MM (Da) |        |
|----------------------------|-------------|----------|---------------------|------------|--------------------------------------|-------|----------------------------------------|-------|------|---------|--------|
| Mais abundante em controle |             |          |                     |            |                                      |       |                                        | Cal   | Obs  | Cal     | Obs    |
| 0                          | 0,48        | 0,03418  | Fotossíntese        | J9QE65     | RuBisCO subunidade menor             | 86    | <i>Saccharum hybrid cultivar GT28</i>  | 8,84  | 5,89 | 19.392  | 6.429  |
| 87                         | Excl.       | 0,04905  |                     | Q6ENP6     | Proteína Fe-S centro de reação PS I  | 85    | <i>Saccharum officinarum</i>           | 6,51  | 6,81 | 9.406   | 15.889 |
| 88                         | Excl.       | 0,00302  |                     | J9QE65     | RuBisCO subunidade menor             | 137   | <i>Saccharum cultivar GT28</i>         | 8,84  | 5,79 | 19.392  | 17.139 |
| 102                        | Excl.       | 0,00336  |                     | I3V633     | Subunidade Fe-S citocromo b6-f       | 54    | <i>Saccharum hybrid cultivar ROC22</i> | 6,06  | 6,04 | 20.941  | 45.811 |
| 103                        | Excl.       | 2,04E-05 |                     | Q8H1X3     | C4 PEP-carboxilase                   | 60    | <i>Saccharum hybrid cultivar</i>       | 5,94  | 6,82 | 108.924 | 48.331 |
| 106                        | Excl.       | 0,01184  |                     | Q6ENV5     | RuBisCO subunidade maior             | 169   | <i>Saccharum officinarum</i>           | 6,33  | 6,9  | 53.323  | 57.293 |
| 107                        | Excl.       | 0,04057  |                     | Q6ENV5     | RuBisCO subunidade maior             | 144   | <i>S. officinarum</i>                  | 6,33  | 7,08 | 53.323  | 58.537 |
| 108                        | Excl.       | 0,00095  |                     | Q6ENV5     | RuBisCO subunidade maior             | 75    | <i>S. officinarum</i>                  | 6,33  | 7,51 | 53.323  | 59.464 |
| 125                        | Excl.       | 0,00017  |                     | Q8L6C3     | PEP-carboxilase                      | 132   | <i>Saccharum spontaneum</i>            | 5,78  | 6,06 | 109.123 | 10.319 |
| 20                         | 0,14        | 2,5E-05  | Metabolismo/Energia | Q40677     | Frutose-bisfosfato aldolase          | 69    | <i>Oryza sativa subsp. Japonica</i>    | 6,38  | 6,03 | 42.212  | 35.568 |
| 105                        | Excl.       | 2,3E-05  |                     | A0A059Q0K1 | Fosfoglicerato quinase               | 94    | <i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>  | 8,61  | 5,63 | 50.982  | 52.166 |
| 117                        | Excl.       | 0,00209  |                     | Q7SIC9     | Transquetolase                       | 94    | <i>Zea mays</i>                        | 5,47  | 5,95 | 73.347  | 75.501 |
| 90                         | Excl.       | 3,89E-04 | Desenvolvimento     | I3V631     | Nucleosídeo-2P quinase               | 89    | <i>Saccharum hybrid cultivar ROC22</i> | 6,6   | 6,3  | 16.823  | 16.823 |
| 91                         | Excl.       | 0,00059  |                     | Q6ENS9     | Fator de iniciação de tradução IF-1  | 57    | <i>S. officinarum</i>                  | 9,73  | 5,68 | 12.424  | 20.668 |
| 96                         | Excl.       | 0,00598  |                     | Q9SIJ3     | Proteína com repetição F-box/kelch   | 62    | <i>Arabidopsis thaliana</i>            | 9,08  | 5,57 | 49.435  | 31.755 |
| 112                        | Excl.       | 0,00036  |                     | Q9MAP8     | $\beta$ -1,3-galactosiltransferase 6 | 64    | <i>A. thaliana</i>                     | 6,74  | 6,06 | 45.137  | 63.596 |
| 95                         | Excl.       | 0,00057  | Resposta/Estresse   | S4WDN5     | Ascorbato peroxidase                 | 64    | <i>Sarum hybrid cultivar GT28</i>      | 5,68  | 6,1  | 27.556  | 30.480 |
| 98                         | Excl.       | 0,00073  |                     | A0A059Q216 | Peroxidase                           | 57    | <i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>  | 5,33  | 7,2  | 9.036   | 34.580 |
| 137                        | Excl.       | 0,0113   | Desconhecida        | A0A059Q001 | Proteína desconhecida                | 60    | <i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>  | 10,08 | 7,04 | 18.332  | 19.180 |

| Spot ID                     | Ratio Lxx/C | ANOVA   | Categoria GO        | Acesso                 | Proteínas                                                    | Score                     | Organismo                                  | pl   | MM (Da) |         |        |
|-----------------------------|-------------|---------|---------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------|------|---------|---------|--------|
| Mais abundante no Inoculado |             |         |                     |                        |                                                              |                           |                                            | Cal  | Obs     | Cal     | Obs    |
| 30                          | 1,56        | 0,00708 | Fotossíntese        | Q7XPL2                 | Coproporfirinogênio-III oxidase dependente de O <sub>2</sub> | 60                        | <i>Oryza sativa subsp. Japonica</i>        | 6,23 | 5,76    | 44.129  | 43.989 |
| 58                          | 1,63        | 0,00081 |                     | Q8H1X3                 | C4 PEP-carboxylase                                           | 253                       | <i>Saccharum hybrid cultivar</i>           | 5,94 | 6,4     | 108.924 | 97.083 |
| 60                          | Excl.       | 0,02053 |                     | Q41048                 | Proteína intensificadora de reação com O <sub>2</sub> 3-1    | 62                        | <i>Zea mays</i>                            | 9,77 | 9,14    | 23.119  | 17.088 |
| 66                          | Excl.       | 0,00253 |                     | Q9LRS0                 | (S)-2-hidroxi-ácido oxidase 1                                | 64                        | <i>Arabidopsis thaliana</i>                | 8,99 | 8,87    | 40.338  | 40.100 |
| 22                          | 5,36        | 0,01213 | Metabolismo/Energia | P34921                 | Gliceraldeído-3-P desidrogenase                              | 62                        | <i>Dianthus caryophyllus</i>               | 6,46 | 6,5     | 37.105  | 40.469 |
| 36                          | 2,70        | 0,04469 |                     | Q6ENW6                 | ATP sintase α                                                | 73                        | <i>Saccharum officinarum</i>               | 5,87 | 5,68    | 55.773  | 47.472 |
| 42                          | 4,46        | 0,0116  |                     | Q6ENW6                 | ATP sintase α                                                | 225                       | <i>S.officinarum</i>                       | 5,87 | 6,14    | 55.773  | 56.432 |
| 43                          | 9,09        | 0,00904 |                     | Q6ENV6                 | ATP sintase β                                                | 194                       | <i>S. officinarum</i>                      | 5,31 | 6,54    | 53.987  | 56.618 |
| 50                          | 1,71        | 5,6E-05 |                     | P49087                 | Subunidade A da ATPase V/H <sup>+</sup>                      | 81                        | <i>Zea mays</i>                            | 5,89 | 5,82    | 62.198  | 63.481 |
| 63                          | Excl.       | 1,4E-05 |                     | A0A059Q290             | Glicose-1-P adenililtransferase                              | 73                        | <i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>      | 6,58 | 5,85    | 58.365  | 21.009 |
| 67                          | Excl.       | 0,00693 |                     | Q40677                 | Frutose-bisfosfato aldolase                                  | 61                        | <i>Oryza sativa subsp. japonica</i>        | 6,38 | 5,71    | 42.208  | 42.451 |
| 69                          | Excl.       | 0,0037  |                     | Q6ENW6                 | ATP sintase α                                                | 215                       | <i>Saccharum officinarum</i>               | 5,87 | 5,9     | 55.773  | 56.581 |
| 75                          | Excl.       | 0,00555 | Desenvolvimento     | Q6ENV6                 | ATP sintase β                                                | 142                       | <i>S. officinarum</i>                      | 5,31 | 9,82    | 53.987  | 57.462 |
| 134                         | Excl.       | 0,0362  |                     | Q6ENV6                 | ATP sintase β                                                | 131                       | <i>S. officinarum</i>                      | 5,31 | 5,85    | 53.987  | 55.380 |
| 35                          | 5,42        | 0,00058 |                     | A0A059Q3A6             | Proteína ribossômica L12 50S                                 | 51                        | <i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>      | 7,82 | 5,99    | 17.395  | 49.698 |
| 68                          | Excl.       | 0,0025  |                     | -                      | Resposta a desenvolvimento                                   | 59                        | <i>Nicotiana benthamiana</i>               | 8,48 | 5,37    | 112.748 | 50.740 |
| 73                          | Excl.       | 1,7E-05 | Q9FYV3              | Fator de elongação 1-α | 63                                                           | <i>S.officinarum</i>      | 9,08                                       | 9,16 | 49.747  | 56.280  |        |
| 79                          | Excl.       | 0,00058 | Q8M9L8              | Maturase K             | 66                                                           | <i>Impatiens capensis</i> | 9,53                                       | 5,75 | 61.056  | 75.311  |        |
| 57                          | 0,35        | 0,13756 | Resposta/Estresse   | -                      | Resposta a estresse 1                                        | 72                        | <i>Saccharum hybrid cultivar SP80-3280</i> | 4,96 | 5,57    | 80.355  | 95.807 |
| 74                          | Excl.       | 0,00029 |                     | -                      | Resposta a estresse 2                                        | 138                       | <i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>      | 6,58 | 6,96    | 56.746  | 57.817 |
| 77                          | Excl.       | 1,9E-05 |                     | P43237                 | Alérgeno Ara h1                                              | 130                       | <i>Arachis hypogaea</i>                    | 6,43 | 6,45    | 70.639  | 66.729 |
| 80                          | Excl.       | 0,00028 |                     | Q2QVG9                 | Chaperona ClpC2                                              | 136                       | <i>Oryza sativa subsp. Japonica</i>        | 6,62 | 5,82    | 102.068 | 90.798 |

<sup>1</sup>Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase; Excl.: exclusivo, ou detectado apenas no tratamento com maior abundância; \*Anotação presumível comum a diferentes proteínas de ambos os tratamentos.

Foi observada a identificação significativa de seis proteínas selecionadas como diferenciais com acessos de Lxx (Tabela 6), especificamente da estirpe CTCB07, utilizada neste trabalho.

**Tabela 6.** Anotação presumível das DEPs de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado (Lxx) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE.

| Spot ID                            | Ratio<br>Lxx/C | ANOVA       | Acesso | Proteínas                        | Score | Organismo                                                | pI         |            | MM (Da)    |            |
|------------------------------------|----------------|-------------|--------|----------------------------------|-------|----------------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Mais abundante em controle</b>  |                |             |        |                                  |       |                                                          | <b>Cal</b> | <b>Obs</b> | <b>Cal</b> | <b>Obs</b> |
| 6                                  | 0,60           | 0,006077330 | Q6AG22 | 6-Fosfofrutoquinase              | 46    | <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (strain CTCB07) | 5,77       | 6,77       | 38.300     | 22.992     |
| 99                                 | Excl.          | 0,023162900 | Q6AF66 | Triptofano sintase $\alpha$      | 46    | <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (strain CTCB07) | 5,02       | 6,64       | 26.808     | 39.888     |
| 113                                | Excl.          | 0,000000029 | Q6ACE0 | Proteína desconhecida            | 47    | <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (strain CTCB07) | 6,09       | 5,75       | 70.293     | 64.246     |
| 118                                | Excl.          | 0,025691600 | Q6AF72 | Fosforibosil-AMP ciclo-hidrolase | 58    | <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (strain CTCB07) | 6,18       | 6,04       | 11.168     | 89.354     |
| <b>Mais abundante no inoculado</b> |                |             |        |                                  |       |                                                          | <b>Cal</b> | <b>Obs</b> | <b>Cal</b> | <b>Obs</b> |
| 65                                 | Excl.          | 0,000000621 | -      | Desconhecido                     | 26    | <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (strain CTCB07) | 9,25       | 5,88       | 25.966     | 35.955     |
| 74,1                               | Excl.          | 0,000286000 | -      | Desconhecido                     | 70    | <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (strain CTCB07) | 5,29       | 5,59       | 19.545     | 57.630     |

Excl.: exclusivo, ou detectado apenas no respectivo tratamento.

Dentre as seis DEPs presumivelmente identificadas como codificadas por genes de Lxx, quatro mostraram maior acúmulo no tratamento não inoculado, enquanto outras dois DEPs de Lxx tiveram maior acúmulo no tratamento inoculado. As nove DEPs/*spots* que não puderam ser significativamente identificadas são apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7.** Tabela descritiva das DEPs sem anotação presumível ou similaridade encontrada por identificação via PMF/MS/MS/Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado (Lxx) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) observados na 2D-PAGE.

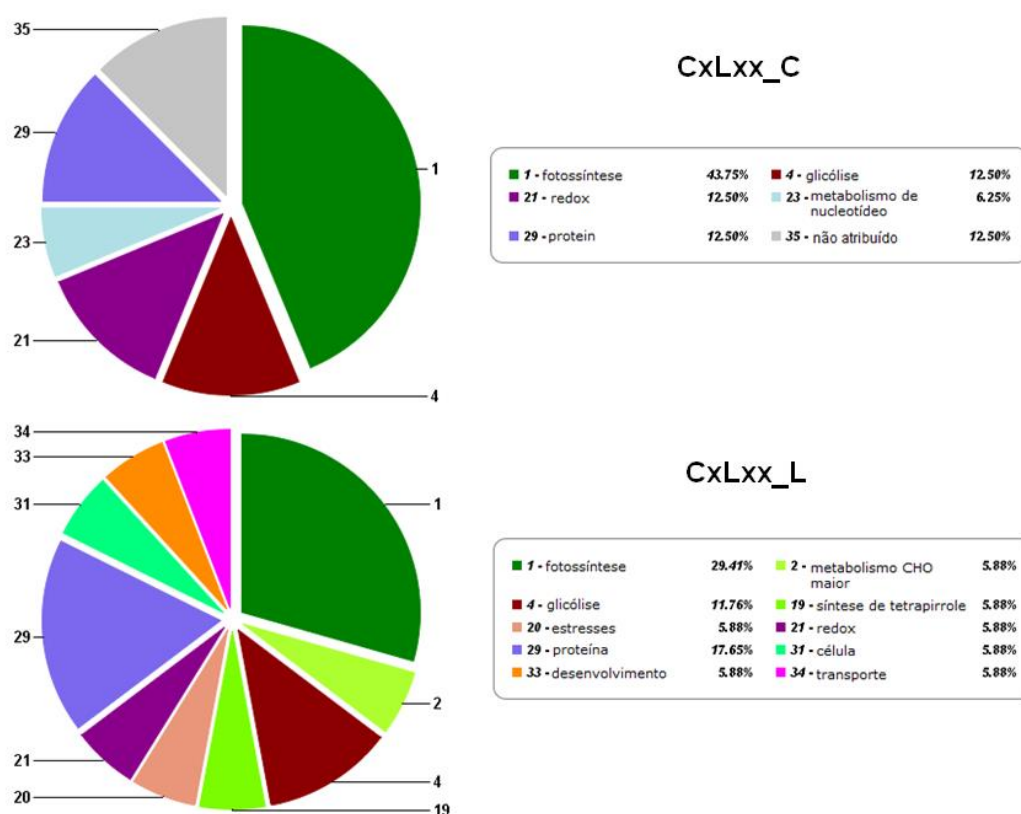
| Match ID                           | Ratio Lxx:C | ANOVA    | pI   | MM (Da) |
|------------------------------------|-------------|----------|------|---------|
| <b>Mais abundantes no controle</b> |             |          |      |         |
| 89                                 | Excl.       | 0,001943 | 5,58 | 19.421  |
| 90                                 | Excl.       | 0,000389 | 6,75 | 19.415  |
| 92                                 | Excl.       | 0,001505 | 6,21 | 21.023  |
| 94                                 | Excl.       | 0,001388 | 5,65 | 24.080  |
| 104                                | Excl.       | 0,000234 | 6,26 | 53.685  |
| <b>Mais abundantes inoculado</b>   |             |          |      |         |
| 34                                 | 1.5         | 0,001943 | 6,49 | 47.507  |
| 64                                 | Excl.       | 0,000047 | 7,4  | 20.889  |
| 76                                 | Excl.       | 0,031193 | 6,37 | 66.610  |
| 78                                 | Excl.       | 0,004804 | 6,56 | 67.662  |

Excl.: exclusivo, ou detectado apenas no respectivo tratamento.

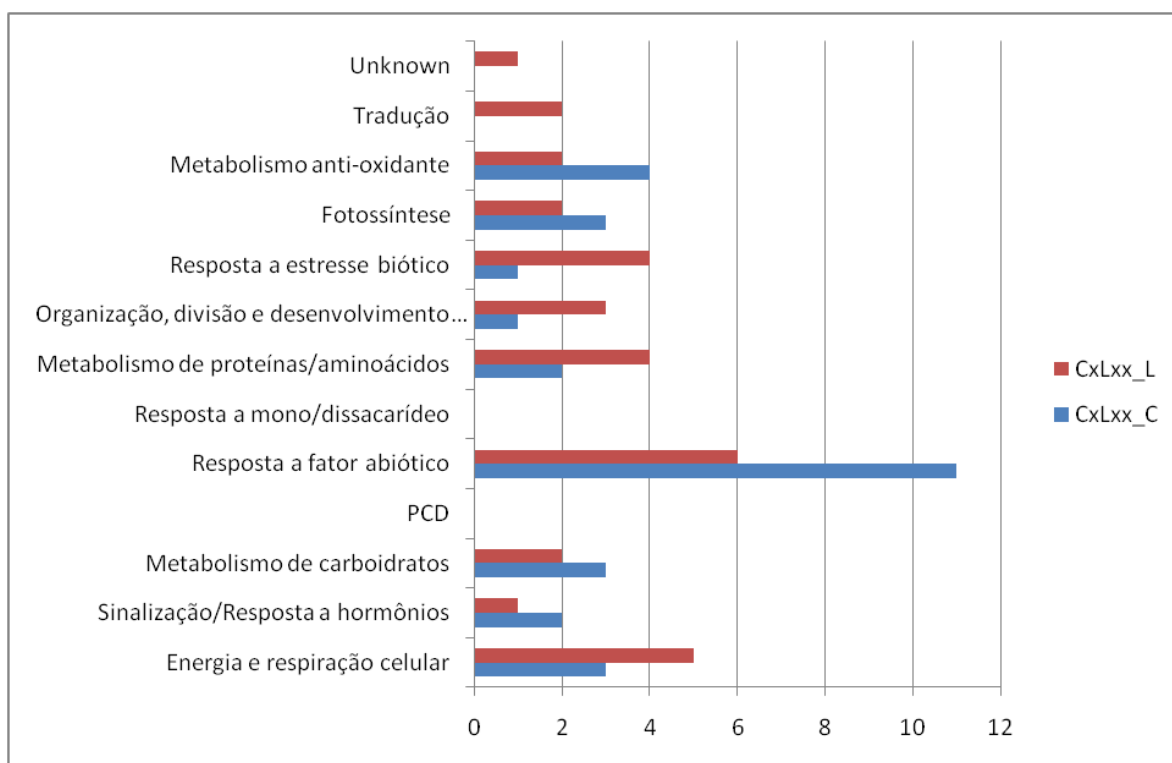
### 5.3.7.2 Ontologia gênica (GO) e enriquecimento de termos GO

No mapeamento dos acessos UniProt identificadores das proteínas similares às DEPs de cana-de-açúcar junto ao banco de dados de *Arabidopsis thaliana*, para viabilizar a análise de ontologia gênica no programa Mercator, foi verificada associação significativa para 16 das 19 (82%) DEPs mais acumuladas no tratamento controle, e para 17 das 22 (77%) DEPs mais acumuladas no tratamento inoculado com Lxx.

A distribuição e frequência obtidas de termos de GO para processo biológico referentes aos tratamentos é apresentada na Figura 8, na qual são destacados os setores correspondentes a cada categoria na classificação utilizada em *A. thaliana*, modelo para organismos vegetais. Esta distribuição foi também utilizada para comparação quantitativa (Figura 9, embora não significativa estatisticamente) e identificação dos processos biológicos mais variáveis entre os tratamentos controle (plantas não inoculadas com Lxx) e plantas inoculadas com Lxx, considerando os conjuntos de DEPs.



**Figura 8.** Categorização da ontologia gênica das *DEPs* de cana-de-açúcar expressas sob inoculação com a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e não inoculado. CxLxx\_C (controle x *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* plantas controle), CxLxx\_L (controle x *L. xyli* subsp. *xyli* plantas inoculadas). Os números ligados aos setores do gráfico são identificadores das categorias raiz de processo biológico, também representados nos respectivos quadros; nestes, é indicada a frequência (%) de cada processo biológico conforme o número de termos de GO encontrados para cada conjunto de DEPs, de cada tratamento.



**Figura 9.** Distribuição dos DEPs de acordo com as categorias funcionais de cana-de-açúcar expressos sob inoculação com a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e não inoculado (C).

As DEPs de cana-de-açúcar selecionadas de cada tratamento e mapeadas nas respectivas proteínas ortólogas de *A. thaliana* também foram analisadas quanto ao enriquecimento de termos de GO no programa Panther. A frequência dos termos GO associados às DEPs do tratamento inoculado (DEPs-Lxx) foram comparadas à frequência dos mesmos termos GO associados às DEPs do tratamento não inoculado (DEPs-C), e também em relação à frequência destes termos no proteoma de referência obtido a partir do genoma de *A. thaliana*. Nesta análise, apenas quatro categorias de termos GO, ou processos biológicos, mostraram-se significativamente variáveis entre os tratamentos (Tabela 8) quando a comparação foi entre termos de DEPs-Lxx com o proteoma de referência e com DEPs do controle.

**Tabela 8.** Teste de super-representação no enriquecimento de termos de ontologia gênica para processo biológico via ortologia com *A. thaliana*, com uso do programa Panther.

| Base de Dados GO / Referência      |                                          | # REF | Expect | #DEPs-Lxx | P-value |
|------------------------------------|------------------------------------------|-------|--------|-----------|---------|
| <i>Processo biológico completo</i> |                                          |       |        |           |         |
| <b>Proteoma <i>A. thaliana</i></b> |                                          |       |        |           |         |
|                                    | geração de precursores/energia           | 414   | 0,25   | 5         | 0,00622 |
| <b>REF: DEPs-C</b>                 |                                          | -     | 6,40   | 7         | ns      |
| <i>Processo biológico Slim</i>     |                                          |       |        |           |         |
| <b>Proteoma <i>A. thaliana</i></b> |                                          |       |        |           |         |
|                                    | geração de precursores/energia           | 444   | 0,27   | 5         | 0,00072 |
|                                    | transporte de cátions                    | 489   | 0,29   | 4         | 0,02600 |
| <b>REF: DEPs-C</b>                 |                                          |       |        |           |         |
|                                    | metabolismo de compostos com nucleobases | 8     | 8,53   | 4         | 0,00925 |

ns: não-significativo.

## 5.4 DISCUSSÃO

### *Confirmação da inoculação com Leifsonia xyli subsp. xyli*

A variedade comercial RB867515 de cana-de-açúcar é descrita como suscetível, mas não resistente, ao raquitismo-da-soqueira (RSD), doença causada pela Lxx (Lima, 2008; Ponte *et al.*, 2010). Neste trabalho, dada a necessidade de estabelecer contraste experimental entre os tratamentos para o patossistema da RSD, foi verificada a carga bacteriana diferencial de Lxx, sendo detectada concentração do patógeno cerca de 17 vezes maior nas plantas inoculadas em relação às aquelas não inoculadas. Utilizando o mesmo par de iniciadores, esta detecção foi possível apenas via qPCR, em tempo real, não havendo amplificação detectável por PCR convencional nem por *nested*-PCR. Provavelmente, a carga bacteriana absoluta de Gd foliar em ambos os tratamentos ainda era reduzida, uma vez que as plantas estavam com 120 dias na coleta das amostras, portanto ainda imaturas para acúmulo de sacarose e maior colonização pelo fitopatógeno. A Lxx costuma ocorrer em maior concentração nos vasos de xilema do colmo, e em geral é necessária alta concentração bacteriana para os métodos de detecção, dos quais a qPCR tem se mostrado como mais sensível (Liu *et al.*, 2013). A confirmação de carga bacteriana relativa ~17x maior permitiu a obtenção de contraste entre os tratamentos para este fitopatossistema, com diferenças refletidas nos perfis proteômicos analisados.

## 2D-PAGE e MS

A análise dos arquivos de imagem digitalizados obtidos após eletroforese bidimensional das amostras de cada tratamento demonstrou baixa variação experimental entre as réplicas do mesmo tratamento, o que favoreceu a confiabilidade dos resultados. Apesar de as amostragens do proteoma nos tratamentos não terem sido muito próximas (157 e 99 *spots*/gel), a normalização realizada pelo programa Image Master permitiu a comparação. Do total de proteínas distintas detectadas (138) na comparação entre os tratamentos, observou-se que foram obtidas quantidades diferentes de *spots* exclusivos de cada tratamento (51 e 27), assim como de *spots* comuns significativamente variáveis mais abundantes em cada tratamento (4 e 10).

Do total representando proteínas distintas, 56 *spots* ou 40,6% foram considerados DEPs e submetidos à identificação via MS, constituindo a fração do proteoma analisado que se mostrou diferencial entre os tratamentos com ou sem inoculação de Lxx, em metodologia 2D-PAGE que favorece significativamente a detecção de proteínas e peptídeos mais abundantes na amostra biológica (produtos de genes mais expressos). Este quadro sugere que a maior concentração (17x) do patógeno Lxx alterou significativamente o proteoma foliar de cana-de-açúcar, principalmente a fração do proteoma foliar composta por produtos de genes com maior intensidade de expressão. Para nosso conhecimento, na literatura há disponibilidade de apenas um estudo proteômico de cana-de-açúcar infectada com Lxx, em amostra restrita às folhas imaturas acima do meristema apical (*leaf-roll* ou cartucho foliar; Carvalho, 2012), fotossinteticamente inativas. Os resultados aqui apresentados são pioneiros pelo foco nas alterações no proteoma foliar fotossinteticamente ativo do hospedeiro.

Apenas uma das 56 DEPs não resultou em espectros de massa adequados para análise de identificação presumível, e a eficiência de anotação foi 83,9%, permitindo inferir possíveis aspectos funcionais e interações entre o proteoma diferencial e os processos fisiológicos e metabólicos. As DEPs ainda sem identificação estão sendo submetidas ao sequenciamento *de novo* (dados não apresentados), para completar o perfil proteômico diferencial obtido.

#### *Identificação presumível e anotação das DEPs*

O fluxograma de análise para identificação e definição do organismo de origem mais provável das DEPs (Figura 2) permitiu discriminar as proteínas diferenciais de cana-de-açúcar e de Lxx potencialmente envolvidas na interação entre este hospedeiro e o fitopatógeno. Conforme esperado, a maior parte (quase 3/4) das DEPs foi identificada como sendo produzida pelo hospedeiro vegetal, enquanto cerca de 1/10 foi atribuído ao patógeno Lxx e 1/6 não teve identificação significativa (Tabela 4).

Quase metade das DEPs foi anotada especificamente como proteína do complexo *Saccharum*, reforçando a identificação apesar de o banco de dados de cana-de-açúcar utilizado ter apenas 7.062 sequências de proteínas e o banco de dados Viridiplantae ter 515.203 sequências de proteínas. As demais DEPs de cana-de-açúcar mostraram-se similares a proteínas de outras espécies vegetais, notadamente gramíneas (mais de 60% do total de DEPs). Das seis DEPs anotadas como proteína de actinobactérias, todas foram associadas especificamente à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* da mesma estirpe utilizada na inoculação das plantas, também validando a identificação.

### *DEPs da planta hospedeira*

Com base na identificação das DEPs de cana-de-açúcar (Tabela 5) mais abundantes em cada tratamento contrastante para carga bacteriana com Lxx, as mesmas foram agrupadas a seguir por categoria principal de ontologia gênica por processo biológico, conforme base de dados UniProt.

Fotossíntese. Nas plantas controle foram encontradas como DEP proteínas principais tanto do esquema Z dos tilacoides, como a subunidade Fe-S citocromo b6-f (I3V633) e proteína Fe-S do centro de reação PS I (Q6ENP6), quanto da fixação de CO<sub>2</sub>, como as subunidades da RuBisCO codificadas pelo genoma plastidial (três *spots* da subunidade maior, Q6ENV5) ou nuclear (dois *spots* da subunidade menor, J9QE65), e as formas de PEP-carboxilase específica de plantas C4 (Q8H1X3) ou inespecífica (Q8L6C3), sugerindo que em baixa concentração do patógeno Lxx a planta parece favorecer a manutenção do fluxo de elétrons e prótons nos tilacoides para a produção de NADPH e ATP e sua subsequente utilização na fixação de CO<sub>2</sub>. Notadamente nesta última etapa, verificou-se nas plantas controle maior abundância das enzimas concentradora de CO<sub>2</sub> (em duas formas) e fixadora para o ciclo de Calvin, o que indica predominância para a fotossíntese na tradução em plantas menos infectadas.

Já nas plantas infectadas, com carga 17 vezes maior de Lxx, apenas a anotação para PEP-carboxilase específica de plantas C4 foi diferencialmente acumulada (*spot* 103 exclusivo do controle, e *spot* 58 comum mais frequente em plantas inoculadas), indicando que nesta variedade o mecanismo concentrador de CO<sub>2</sub> mediado por esta C4-PEP-carboxilase (C4-PEPC) pode ser mais relevante na manutenção da fotossíntese quando o patossistema RSD está se estabelecendo. Esta enzima, específica de plantas C4, foi comprovadamente associada à resposta

de tolerância ao estresse por déficit hídrico também em planta C3 por transgenia, sendo rapidamente ativada por sinalização mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ , óxido nítrico (NO) e quinases (Qian *et al.*, 2015). Uma vez que a colonização e entupimento do xilema por Lxx pode aumentar o estresse por déficit hídrico em plantas de cana-de-açúcar infectadas (Pontes *et al.*, 2010), é provável que a maior expressão da C4-PEPC no tratamento com Lxx esteja associada a mecanismos de resposta da planta comuns à seca e a fitopatógenos de xilema. A proteína intensificadora de reação com  $\text{O}_2$  3-1 (Q41048) integra o complexo de fotólise da água no PS II, e também já foi descrita como mais expressa em variedade de cana-de-açúcar tolerante à seca em condição de campo sem irrigação (Ribeiro, 2010).

Foram identificadas como mais acumuladas em plantas inoculadas com Lxx duas oxidases de vias metabólicas primárias em plantas, entretanto já descritas como responsivas e até moduladoras de resistência a fitopatógenos. A coproporfirinogênio-III oxidase dependente de  $\text{O}_2$  (Q7XPL2) sintetiza protoporfirinogênio IX, que é precursor na síntese de grupos heme e grupos tetrapirróis das clorofilas *a* e *b*, mas também atua na ativação de respostas de defesa e morte celular programada (PCD, *programmed cell death*) contra patógenos via sinalização por ácido acetilsalicílico, como relatado em plantas mutantes para o patossistema fúngico modelo míldio (*Golovinomyces cichoracearum*)-*Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2013). Já a glicolato oxidase, ou (S)-2-hidroxi-ácido oxidase 1 (Q9LRS0), integra a via de fotorrespiração e catalisa no peroxissomo a oxidação do glicolato a glioxilato, produzindo  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposto em seguida pela catalase. Essa enzima é um componente principal da resistência inespecífica de plantas a fitopatógenos, e é considerada fonte alternativa de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tanto em interações do tipo gene-a-gene (patógeno-específica) quanto em

interações da planta com ampla gama de patógenos (inespecífica), ligada à deposição de calose e à perda de eletrólitos para resposta de hipersensibilidade (Rojas *et al.*, 2012). Assim, a infecção com Lxx parece estar associada a respostas na planta hospedeira para redução e ajuste da fotossíntese, simultaneamente à ativação da fotorrespiração e vias oxidativas para produção de ROS relevantes na defesa contra Lxx.

Metabolismo/Energia. Nas plantas não inoculadas com Lxx, foi observada maior abundância das enzimas frutose-bisfosfato aldolase provavelmente citossólica (2 *spots* anotados como Q40677: *spot* 20 comum mais abundante no controle e *spot* 67 exclusivo de plantas inoculadas com Lxx) e fosfoglicerato quinase (A0A059Q0K1), ambas integrantes da glicólise/gluconeogênese e descritas como muito reguláveis em resposta a patógenos, regulação esta que pode ser determinante da resistência ou susceptibilidade em função da rapidez e da intensidade da resposta de defesa (Mutuku e Nose, 2012).

Também foi mais expressa no controle uma transquetolase (Q7SIC9) cloroplastidial, que integra o ciclo de Calvin e também a via oxidativa das pentoses fosfato, produzindo eritrose-4-P precursora das vias do ácido shikímico e, subsequentemente, dos fenilpropanoides. Em plantas, a redução da atividade da transquetolase está associada à diminuição da fotossíntese e ao menor acúmulo de açúcares (sem degradação de amido), aminoácidos aromáticos, intermediários (ácidos cafeico e hidroxicinâmico) e produtos (ácido clorogênico, tocoferol e lignina) do metabolismo dos fenilpropanoides, clorofila e carotenoides (Henkesa *et al.*, 2001). Em cana-de-açúcar não inoculada com Lxx, a transquetolase foi significativamente mais abundante, corroborando esta associação na qual parece ser inibida pelo patógeno.

Nas plantas com maior carga de Lxx, foi observada maior frequência de proteínas associadas à produção de energia metabólica fotossintética, representadas por três *spots* anotados como ATP sintase  $\alpha$  (Q6ENW6) e três como  $\beta$  (Q6ENV6), ambas cloroplastidiais, e também pela subunidade A da ATPase V/H<sup>+</sup> vacuolar (P49087) associada ao transporte de H<sup>+</sup>. Em citros, foi demonstrado que o patógeno bacteriano *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, causador do cancro cítrico, produz durante a infecção o peptídeo XacPNP, que mantém ou até melhora a performance fotossintética do tecido infectado. Esta observação pode indicar que a diminuição da fotossíntese é um mecanismo eficiente de defesa contra fitopatógenos biotróficos (Garavaglia *et al.*, 2010; Keinath *et al.*, 2010).

Adicionalmente, nas plantas inoculadas houve maior acúmulo da gliceraldeído-3-P desidrogenase (P34921) citossólica, enzima de catálise reversível na glicólise/gluconeogênese, e da glicose-1-P adenililtransferase (A0A059Q290) cloroplastidial, enzima chave direcionadora para biossíntese de amido. Este quadro sugere que: nas plantas infectadas a produção de energia metabólica esteja ocorrendo prioritariamente de forma significativamente mais dependente da fase fotoquímica da fotossíntese/fotorrespiração do que da glicólise; e que a biossíntese de amido esteja sendo favorecida por mecanismo de regulação associado à Lxx, talvez de maneira similar à indução de acúmulo de amido por sinalização volátil de fitopatógeno já relatada em outras plantas hospedeiras (ex. patossistema *Arabidopsis-Alternaria alternata*; Li *et al.*, 2010), ou através de mecanismos de interação semelhante àqueles observados entre cana-de-açúcar e microssimbiontes.

Desenvolvimento. Foi observada na cana-de-açúcar expressão diferencial de proteínas relacionadas a processos reguladores e de transdução de sinais potencialmente associados à interação com Lxx. Nas plantas controle, a nucleosídeo-2P quinase (I3V631) está envolvida com sinalização e regeneração de nucleosídeos-3-P, e já foi descrita como responsiva ao estresse por choque de alta temperatura via autofosforilação em células de cana-de-açúcar (mas não em células de tabaco), e aumento da atividade ligada à manutenção da síntese proteica sob estresse por calor (Dharmasiri *et al.*, 2010). O RNAm codificante da nucleosídeo-2P quinase 1 tem expressão fortemente induzida em folhas de arroz infectadas pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, ácido salicílico, ácido jasmônico e ácido abscísico (Cho *et al.*, 2004), entretanto sua tradução se mostrou significativamente inibida em folhas de cana-de-açúcar infectadas por Lxx, sugerindo que os mecanismos de interação deste patógeno com a cana-de-açúcar excluem resposta do hospedeiro através desta quinase, e/ou podem incluir mecanismo de controle pós-transcricional para diminuir sua síntese.

Outra proteína mais acumulada no controle foi o fator de iniciação de tradução IF-1 (Q6ENS9) cloroplastidial, que além de crucial na tradução de RNAs da planta hospedeira, também é necessário para o acúmulo de vírus fitopatogênicos específicos de floema (Reinbold *et al.*, 2013). Alguns fatores de iniciação de tradução do hospedeiro atuam no desenvolvimento de sintomas induzidos por bactéria fitopatogênicas necrotróficas via PCD, conforme descrito em tomate infectado com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Hopkins *et al.*, 2008), e portanto a maior expressão desta proteína nas plantas não infectadas

parece condizente com a ecologia biotrófica de Lxx, um patógeno específico de xilema.

As proteínas com repetição F-box/kelch (Q9SIJ3) em plantas têm sido associadas com respostas a diversos fatores de estresse, tanto abióticos quanto bióticos, e são reguladas por microRNAs (miRNAs) para silenciamento da expressão (Pandey *et al.*, 2013). Apesar de sua função molecular ainda ser desconhecida, são induzidas por nematoides fitopatogênicos e fortemente associadas à maior suscetibilidade da planta hospedeira à infecção e colonização por estes organismos (Curtis *et al.*, 2013), e podem estar relacionadas com o controle da planta hospedeira sobre a intensidade de nodulação na interação com microrganismos fixadores de N<sub>2</sub> (Takahara *et al.*, 2013). Conforme os resultados obtidos, Lxx pode ter atuado na inibição do acúmulo desta proteína em cana-de-açúcar.

Localizada no aparato de Golgi, a  $\beta$ -1,3-galactosiltransferase 6 (Q9MAP8) tem domínios transmembranares que atuam na modificação de proteínas via glicosilação, e sua maior atividade por transgenia é relacionada a maiores crescimento vegetativo, teor de clorofila, eficiência fotossintética, ganho de biomassa e teor de pectina na parede celular (Qin *et al.*, 2013). A maior expressão desta proteína no tratamento controle sugere que a inibição de sua síntese por Lxx esteja relacionada com os sintomas de redução do crescimento e menor performance fisiológica da plantas infectadas.

Nas plantas infectadas por Lxx, a maior parte das DEPs está diretamente ligada ao processamento de RNAm e à tradução. Por exemplo, a maior abundância da enzima maturase K (Q8M9L8) cloroplastidial, responsável pelo processamento de RNAm dos transcritos codificados pelo genoma cloroplastidial, da proteína

ribossômica L12 50S (A0A059Q3A6) e do fator de alongação da tradução 1- $\alpha$  (Q9FYV3), fundamentais na síntese de proteínas, sugerem manutenção da tradução de componentes fotossintéticos mesmo durante a patogênese por Lxx.

Por outro lado, a maior abundância de uma proteína associada a resposta a desenvolvimento nas plantas inoculadas com Lxx sugere que processos de controle da transcrição e do ciclo celular são significativos neste fitopatossistema. Esta proteína nuclear atua como fator de transcrição modulador da fase G1 da divisão celular e é responsiva ao baixo acúmulo de sacarose (Hirano *et al.*, 2008). Ela tem sido descrita também como alvo de alterações no transcriptoma do hospedeiro vegetal causadas por geminivírus, que utilizam a maquinaria de replicação da planta para amplificação de seu genoma através do controle de genes do ciclo celular, no sentido de ativar genes das fases S e G2 e inibir genes das fases G1 e M, ou seja, ativando replicação de DNA/síntese de proteínas e inibindo a mitose (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2008).

Resposta/Estresse. Nas plantas controle foi observada maior abundância de enzimas do metabolismo antioxidante, também ligadas a mecanismos de defesa contra patógenos através do aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS, principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e sua exportação para a matriz extracelular, uma barreira de defesa importante (Swaroop Rani e Podile, 2014). A maior abundância de ascorbato peroxidase (S4WDN5) e peroxidase (A0A059Q216) em cana-de-açúcar não inoculada com Lxx indica que a menor atividade antioxidante parece ser especificamente importante na resposta do hospedeiro à Lxx. Estas enzimas foram também descritas como inibidas na resposta de citros à bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Swaroop Rani e Podile, 2014), e induzidas na

resposta de tomate resistente à bactéria *Ralstonia solanacearum* com aumento na produção de ROS simultânea à maior atividade antioxidante (Mandal *et al.*, 2011).

Peroxidases foram também inibidas durante a infecção de tomate com *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Savior *et al.*, 2012), o que corrobora possível similaridade funcional na resposta observada em cana-de-açúcar à Lxx, uma vez que *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* era anteriormente classificada como *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (Evtushenko *et al.*, 2000).

Nas plantas inoculadas com Lxx, a importância do metabolismo antioxidante na resposta ao patógeno foi restrita ao maior acúmulo de Resposta a estresse 1. Alguns fitopatógenos bacterianos super expressam e secretam essa enzima para sobreviver à defesa oxidativa ativada pela planta hospedeira, tal como ocorre no patossistema *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e *Arabidopsis*, e são fatores de virulência necessários para a patogênese (Guo *et al.*, 2012).

Alguns fitopatógenos podem modular a ação de hormônios vegetais para favorecer a colonização do hospedeiro, e essa modulação depende da interação entre fatores de avirulência liberados pelo patógeno e proteínas-alvo produzidas pela planta. Um exemplo é a alteração da sinalização por ácido jasmônico causada pela interação entre o fator AvrB de *Pseudomonas syringae* e proteínas de *Arabidopsis* tais como quinases ativadas por mitógeno e a Resposta a estresse 2 que resultam em maior suscetibilidade ao patógeno (Cui *et al.*, 2010). Uma Resposta a estresse 2 de arroz foi associada à imunidade inata contra fitopatógenos fúngico (*Magnaporthe grisea*) e bacteriano (*Xanthomonas oryzae*), através de interação e ativação com proteínas de defesa e transdução de sinais Rac1 e RAR (Thao *et al.*, 2007). As chaperonas têm função de ligação a outras proteínas para manter e/ou regular sua atividade e transporte (Sjögren *et al.*, 2014).

Foram identificadas como DEPs em plantas inoculadas com Lxx uma proteína de Resposta a estresse 1 e uma chaperona cloroplastidial ClpC2 (Q2QVG9), que podem ser proteínas-alvo de fatores produzidos pela Lxx em mecanismos moleculares responsáveis por manter sua patogenicidade em cana-de-açúcar.

Também foi significativamente mais abundante em plantas inoculadas uma proteína alergênica Ara h1 (P43237), uma cupina (Becker e Jappe, 2014) já descrita como o principal alergênico de algumas leguminosas, regulado por glicosilação e que tem funções na planta como reserva nitrogenada e defesa contra patógenos e herbívoros (Kang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010). O maior acúmulo em plantas inoculadas por Lxx sugere fortemente que esta proteína atue em mecanismo de resposta de defesa contra Lxx mediado por função intracelular similar a de proteínas de defesa relacionadas à patogenicidade PR-10, que, embora não tenha o modo de ação molecular elucidado, já descrito como alergênica de plantas expressa em resposta a fitopatógenos (Sinha *et al.*, 2014).

Proteínas de função desconhecida. Foi encontrada como DEPs apenas uma proteína desconhecida (A0A059Q001), mais abundante no controle e, portanto, presumivelmente inibida por Lxx.

#### *DEPs do patossistema*

Conforme apresentado na Tabela 6, foram identificados *spots* com variação significativa no acúmulo e anotação presumível para codificação pelo patógeno Lxx. A detecção de proteínas diferenciais de bactéria inoculada era esperada devido ao contraste dos tratamentos no experimento, e pelo fato de o tratamento térmico dos propágulos de cana-de-açúcar não eliminar totalmente sua microbiota

original. A maior parte das DEPs de Lxx foi detectada no tratamento controle, onde a abundância de células de Lxx foi 17 vezes menor que no tratamento inoculado, no qual se considerou ocorrer a patogênese entre cana-de-açúcar e Lxx, dada a grande diferença na concentração bacteriana.

No controle, Lxx acumulou maior quantidade das enzimas envolvidas na produção de precursores e síntese de aminoácidos, tais como a 6-fosfofrutoquinase (Q6AG22) da glicólise e as enzimas de biossíntese de aminoácidos triptofano sintase  $\alpha$  (Q6AF66) e fosforibosil-AMP ciclo-hidrolase (Q6AF72), envolvida na síntese de histidina. Este acúmulo diferencial sugere que em baixa concentração na planta hospedeira, Lxx mantém o metabolismo biotrófico em nível pouco ou não patogênico. Curiosamente, polimorfismos na triptofano sintase  $\alpha$  podem estar associados à variação na patogenicidade de bactérias, como relatado para o patógeno humano intracelular-obrigatório *Chlamydia trachomatis* (Shaw *et al.*, 2000).

Nas plantas inoculadas, Lxx acumulou maior quantidade da Resposta a estresse 3, uma oxidoredutase envolvida na  $\beta$ -oxidação mitocondrial e/ou peroxissômica importante para que fitopatógenos de gramíneas utilizem lipídeos do hospedeiro como fonte de carbono e energia (Kretschmer *et al.*, 2012), e que desta maneira pode ter papel fundamental no aumento da colonização do xilema de cana-de-açúcar pela Lxx. Foram também identificadas proteínas de Lxx sem função conhecida, mas significativamente mais abundante no controle ou quando em plantas inoculadas.

Este quadro sugere que o proteoma de Lxx, quando em elevada concentração na cana-de-açúcar, tende a favorecer significativamente via metabólica alternativa à glicólise para uso de fontes de carbono do hospedeiro.

### *DEPs não identificados*

As nove DEPs/spots sem similaridade nos bancos de dados acessados estão em identificação via MS, uma vez que constituem conjunto de proteínas significativamente variáveis em resposta à inoculação e colonização de cana-de-açúcar com Lxx.

### *Ontologia gênica (GO)*

A categorização associada a processo biológico permitiu observar que após inoculação com Lxx a planta reduziu fotossíntese de 43,7% do total de ontologias para 29,4%, assim como reduziu pela metade a frequência das atividades de metabolismo redox, e de nucleotídeos (Figura 9). A inoculação com Lxx também parece ter levado ao aumento de ontologias ligadas ao metabolismo de carboidratos maiores (6%), síntese de clorofila e a respostas a estresse, como esperado. Com a maior presença de Lxx, houve também menor aumento nas ontologias ligadas à glicólise e ao metabolismo de proteínas, sugerindo que no RSD diversos metabólitos precursores são mais necessários, assim como energia da respiração.

Com a análise quantitativa (não estatística) apresentada na Figura 10 foi possível verificar objetivamente, conforme nomenclatura padronizada de GO para plantas e em relação ao controle, que nas plantas inoculadas com Lxx houve redução das ontologias associadas ao metabolismo antioxidante, fotossíntese, resposta a fatores abióticos e sinalização. Por outro lado, nas plantas inoculadas com Lxx foi verificado aumento na quantidade de ontologias associadas à tradução, resposta a estresse biótico (como esperado), divisão celular, metabolismo de

proteínas e respiração. Este quadro indica alteração no proteoma e, por consequência, da fisiologia da planta hospedeira para o estabelecimento da RSD.

Com base nos resultados obtidos com o teste de super-representação/enriquecimento de termos de ontologia gênica para processo biológico, via ortologia com *A. thaliana* (Tabela 8), foi identificada uma ontologia com variação significativa entre os tratamentos controle e inoculado com Lxx: metabolismo de compostos com nucleobases. Na comparação entre o proteoma diferencial mais abundante nas plantas inoculadas com Lxx e o proteoma de referência, foi possível detectar duas categorias de processo biológico significativamente diferentes, nas duas bases de dados GO consideradas (completa e *slim*, ou condensada): geração de precursores/energia e transporte de cátions. Estes resultados corroboraram as análises de GO anteriores, e estatisticamente comprovaram que o proteoma foliar de cana-de-açúcar responde diferencialmente à maior concentração do fitopatógeno de xilema Lxx, inibidor do crescimento.

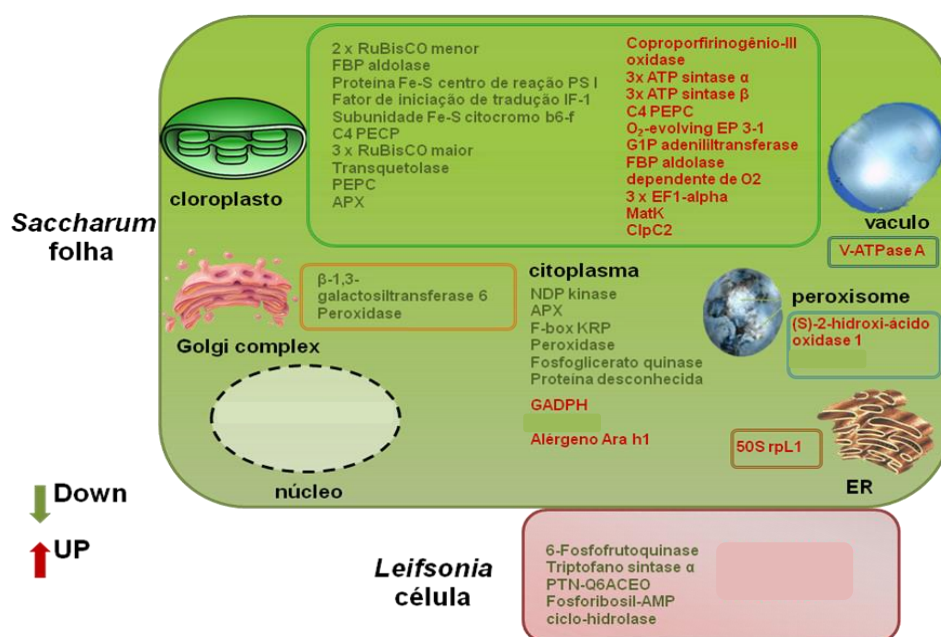
#### Modelo esquemático do mecanismo em resposta à inoculação com Lxx

Com base nos resultados, a Figura 10 sumariza os resultados do estudo e esquematizam as respostas de cana-de-açúcar ao patógeno *Leifsonia xyli* subsp *xyli*. Durante o processo de desenvolvimento da planta, a cana-de-açúcar é frequentemente infestada por patógenos (incluindo bactérias, fungos e vírus) que são os principais estresses bióticos. Independentemente do fato da interação entre a planta e o agente patogênico ser uma reação resistente (interação não

compatível) ou uma reação susceptível (interação compatível), é devida à interação entre o gene de resistência a doenças da planta hospedeira e o gene de avirulência correspondente de micróbios patogênicos, o qual pode induzir o resultado da expressão de coordenação de uma série de genes de defesa na planta hospedeira. No entanto, nas reações de interação compatível ou não-compatível, os genes diferenciais têm diferenças significativas na distribuição espacial, expressão e intensidade (Graham e Graham, 1991).

Em cana-de-caçúcar houve uma diminuição geral de proteínas envolvidas na fotossíntese após a infecção com Lxx. Sabe-se que as plantas infectadas por algum patógeno são geralmente caracterizadas pela taxa fotossintética diminuída, o que sugere que a fotossíntese é uma das principais atividades reprimidas durante a defesa de resposta ao hospedeiro (Scharte *et al.*, 2005). A diminuição geral de proteínas envolvidas na fotossíntese após a infecção com Lxx, provavelmente está indicando o redirecionamento do metabolismo celular para a síntese de compostos implicados na resposta de defesa da planta (Di Carli *et al.*, 2012).

A inibição de enzimas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo em plantas como milho e arroz, infectadas por vírus já é conhecida (Wu *et al.*, 2013). De forma similar, proteínas relacionadas com a resposta ao estresse abiótico tiveram a expressão diminuída em plantas inoculadas com Lxx. Em contrapartida, proteínas relacionadas a resposta ao estresse biótico foram induzidas na interação cana-de-açúcar-Lxx. Alguns fitopatógenos podem modular a ação de hormônios vegetais para favorecer a colonização do hospedeiro, e essa modulação depende da interação entre fatores de avirulência liberados pelo patógeno e proteínas-alvo produzidas pela planta.



**Figura 10.** Modelo Esquemático dos processos de regulação proteica foliar em plantas de cana-de-açúcar associadas à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). Proteínas em verde mais abundante nas plantas controle e proteínas em vermelho mais abundante nas plantas inoculadas com a bactéria.

## 5.5 CONCLUSÃO

Na interação cana-de-açúcar/Lxx foram identificadas proteínas responsivas a estresses bióticos, defesa e metabolismo de carboidrato;

Identificação de proteínas candidatas relacionadas a doença abre caminho para novas pesquisas para um melhor entendimento da interação cana-de-açúcar/*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

## 5.6 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado por subsídios e bolsas de estudo da CAPES / REUNI e Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq). Os autores agradecem ao Prof. Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo (ESALQ/USP) pelo fornecimento da cepa CTC B07 de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Ao senhor Emanuel Sérgio Coqueiro do Santos

pelo auxílio financeiro ao projeto (BIOGENE) e ao Prof. Dr. Fábio César Gozzo pela disponibilização dos bancos de dados.

## 5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ascencio-Ibáñez JT, Sozzani R, Lee TJ, Chu TM, Wolfinger RD, Cella R and Hanley-Bowdoin L (2008) Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol* 148(1):436-54.
- Becker WM and Jappe U (2014) Peanut allergens. *Chem Immunol Allergy* 100:256-67.
- Boaretto LF (2012) Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose. Doutorado (Ciências) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 177p.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:48-254.
- Brencic A and Winans SC (2005) Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:155-94.
- Cardoso COM (1986) Isolamento da bactéria do raquitismo (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) no Brasil. *Boletim Técnico COPERSUCAR* 34:48-52.
- Carneiro Jr JB, Silveira SF and Ponte EC (2006) Sanidade e vigor de mudas de cana-de-açúcar infectadas por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e tratadas por termoterapia. *Fitopatol Bras* 31:183.
- Carvalho G (2012) Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B and Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803-14.
- Cho SM, Shin SH, Kim KS, Kim YC, Eun MY and Cho BH (2004) Enhanced expression of a gene encoding a nucleoside diphosphate kinase 1 (OsNDPK1) in rice plants upon infection with bacterial pathogens. *Mol Cells* 18(3):390-5.
- Cui H, Wang Y, Xue L, Chu J, Yan C, Fu J, Chen M, Innes RW and Zhou JM (2010) *Pseudomonas syringae* effector protein AvrB perturbs *Arabidopsis* hormone signaling by activating MAP kinase 4. *Cell Host Microbe* 7(2):164-75.

- Curtis RH, Pankaj, Powers SJ, Napier J, Matthes MC (2013) The Arabidopsis F-box/Kelch-repeat protein At2g44130 is upregulated in giant cells and promotes nematode susceptibility. *Mol Plant Microbe Interact* 26(1):36-43.
- De Wit PJ (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci* 64:2726-2732.
- Dharmasiri S, Harrington HM and Dharmasiri N (2010) Heat shock modulates phosphorylation status and activity of nucleoside diphosphate kinase in cultured sugarcane cells. *Plant Cell Rep* 29(11):1305-14.
- Di Carli M, Benvenuto E and Donini M (2012) Recent insights into plant-virus interactions through proteomic analysis. *J Proteome Res* 11(10):4765-80.
- Diz AP, Truebano M and Skibinski DO (2009) The consequences of sample pooling in proteomics: an empirical study. *Electrophoresis* 30(17):2967-75.
- Dos Santos MF, Muniz de Pádua VL, de Matos Nogueira E, Hemerly AS and Domont GB (2010) Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *J Proteomics* 73:917-931.
- Doyle JJ and Doyle JL (1991) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1:13-15.
- Evtushenko LI, Dorofeeva LV, Subbotin AS, Cole JR and Tiedje JM (2000) *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. *Int J Syst Evol Microbiol* 1:371-80.
- FAO (2013) Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/> (Dec 14, 2013).
- Franke-Whittle IH, O'Shea MG, Leonard GJ and Sly L (2005) Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. *Microb Ecol* 50:128-139.
- Fegan M, Croft BJ, Teakle DS, Hayward AC and Smith GR (1998) 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 Pathol* 47:495-504.
- Garavaglia BS, Thomas L, Gottig N, Zimaro T, Garofalo CG, Gehring C and Ottado J (2010) Shedding light on the role of photosynthesis in pathogen colonization and host defense. *Commun Integr Biol* 3(4):382-4.
- Graham TL and Graham MY (1991) Cellular coordination of molecular responses in plant defense. *Molecular Plant-Microbe interactions* 4:415-422.
- Guo M, Block A, Bryan CD, Becker DF and Alfano JR (2012) *Pseudomonas syringae* Catalases Are Collectively Required for Plant Pathogenesis. *J Bacteriol* 194(18):5054-64.
- Guo CY, Wu GH, Xing J, Li WQ, Tang DZ and Cui BM (2013) A mutation in a coproporphyrinogen III oxidase gene confers growth inhibition, enhanced

- powdery mildew resistance and powdery mildew-induced cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 32(5):687-702.
- Heath MC (1991) The role gene-for-gene interactions in the determination of host species specificity. *Phytopathology* 81:127-130.
- Henkesa S, Sonnewald U, Badur R, Flachmann R and Stitt M (2001) A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 13:535-551.
- Hirano H, Harashima H, Shinmyo A and Sekine M (2008) *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1 is involved in G1 phase cell cycle arrest caused by sucrose starvation. *Plant Mol Biol* 66(3):259-75.
- Hopkins MT, Lampi Y, Wang TW, Liu Z and Thompson JE (2008) Eukaryotic translation initiation factor 5A is involved in pathogen-induced cell death and development of disease symptoms in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148(1):479-89.
- Hurkman WJ and Tanaka CK (1986) Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Plant Physiol* 81:802-806.
- Kang IH, Srivastava P, Ozias-Akins P and Gallo M (2007) Temporal and spatial expression of the major allergens in developing and germinating peanut seed. *Plant Physiol* 144(2):836-45.
- Keinath NF, Kierszniowska S, Lorek J, Bourdais G, Kessler SA, Shimosato-Asano H, Grossniklaus U, Schulze WX, Robatzek S and Panstruga R (2010) PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity. *J Biol Chem* 285(50):39140-9.
- Kretschmer M, Klose J and Kronstad JW (2012) Defects in mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation influence virulence in the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* 11(8):1055-66.
- Lery LM, Hemerly AS, Nogueira EM, Von Krüger WM and Bisch PM (2011) Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *Mol Plant Microbe Interact* 24:562-576.
- Li J, Shefcheck K, Callahan J and Fenselau C (2010) Primary sequence and site-selective hydroxylation of prolines in isoforms of a major peanut allergen protein Ara h 2. *Protein Sci* 19(1):174-82.
- Lima RMP (2008) Caracterização de variedades de cana-de-açúcar quanto a resistência a tolerância ao raquitismo-da-soqueira. Dissertação de mestrado. PPG Genética e Melhoramento de Plantas. Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- Liu J, Xu L, Guo J, Chen R, Grisham MP and Que Y (2013) Development of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane. *Biomed Res Int* 2013:357692.
- Lohse M, Nagel A, Herter T, May P, Schroda M, Zrenner R, Tohge T, Fernie AR, Stitt M and Usadel B (2014). Mercator: a fast and simple web server for

- genome scale functional annotation of plant sequence data. *Plant Cell Environ* 37(5):1250-8.
- Mandal S, Das RK and Mishra S (2011) Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiol Biochem* 49(2):117-23.
- Marafon AC (2012) Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimentoprático. Embrapa Tabuleiros Costeiros 29 p.
- Marin FR (2007) Características: cana-de-açúcar. Agência de Informação da Embrapa, Brasília, [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_11\\_711200516716.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_11_711200516716.html) (May 23, 2011).
- Metzler MC, Laine MJ and De Boer SH (1997) The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. *FEMS Microbiol Lett* 150:1-8.
- Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT and Thomas PD (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nature Protocols* 8:1551-1566.
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H and Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19613-8.
- Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Van Sluys MA, Kitajima JP, Truffi D, do Amaral AM, Harakava R, de Oliveira JC, Wood D, de Oliveira MC *et al.* (2004) The Genome Sequence of the Gram-Positive Sugarcane Pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Mol Plant Microbe Interact* 17:827-836.
- Monteiro-Vitorello CB, Zerillo MM, Van Sluys MA and Camargo LEA (2009) Genome sequence – based insights into the biology of the sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* In: Robert W (ed) *Plant Pathogenic Bacteria: genomics and molecular biology*. Horizon Press, pp 135-146.
- Mutuku JM and Nose A (2012) Changes in the contents of metabolites and enzyme activities in rice plants responding to *Rhizoctonia solani* Kuhn infection: activation of glycolysis and connection to phenylpropanoid pathway. *Plant Cell Physiol* 53(6):1017-32.
- Nogueira FT, De Rosa VE Jr, Menossi M, Ulian EC and Arruda P (2003) RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiol* 132:1811-24.
- Pacheco CM, Pestana-Calsa MC, Gozzo FC, Nogueira RJMC, Menossi M and Calsa T Jr (2013) Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. *J Proteome Res* 12:5681-95.
- Pandey A and Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837-846.
- Pandey B, Gupta OP, Pandey DM, Sharma I and Sharma P (2013) Identification of new stress-induced microRNA and their targets in wheat using computational approach. *Plant Signal Behav* 8(5):e23932.

- Ponte EC, Silveira SF, Carneiro Jr JB and Lima RMP (2010) 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 phytopathol* 36:4.
- Qian B, Li X, Liu X, Chen P, Ren C and Dai C (2015) Enhanced drought tolerance in transgenic rice over-expressing of maize C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene via NO and Ca<sup>(2+)</sup>. *J Plant Physiol* 175:9-20.
- Qin LX, Rao Y, Li L, Huang JF, Xu WL and Li XB (2013) Cotton GalT1 encoding a putative glycosyltransferase is involved in regulation of cell wall pectin biosynthesis during plant development. *PLoS One* 8(3):e59115.
- Reinbold C, Lacombe S, Ziegler-Graff V, Scheidecker D, Wiss L, Beuve M, Caranta C and Brault V (2013) Closely related poleroviruses depend on distinct translation initiation factors to infect *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 26(2):257-65.
- Ribeiro ILAC (2010) Proteômica de cana-de-açúcar em condição de estresse hídrico. 139 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Wang K, Ryu CM, Kaundal A and Mysore KS (2012) Glycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24(1):336-52.
- Rosa DD (2006) Uma abordagem genômica para o entendimento fastidioso de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. 79 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Rossetto R and Santiago AD (2007) Cana-de-açúcar: doenças. [http://www.agencia.cnpia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_55\\_711200516718.html](http://www.agencia.cnpia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_55_711200516718.html) (Jun 13, 2011).
- Salvaudon L, Héraudet V and Shykoff JA (2005) Parasite-host fitness trade-offs change with parasite identity: genotype-specific interactions in a plant-pathogen system. *Evolution* 59:2518-24.
- Savior A, Teper D, Gartemann KH, Eichenlaub R, Chalupowicz L, Manulis-Sasson S, Barash I, Tews H, Mayer K, Giannone RJ, Hettich RL and Sessa G (2012) The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection. *J Proteome Res* 11(2):736-50.
- Scharte J, Schon and Weis E (2005) Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Cell and Env* 28: 1421-1435.
- Shaw AC, Christiansen G, Roepstorff P and Birkelund S (2000) Genetic differences in the *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase alpha-subunit can explain variations in serovar pathogenesis. *Microbes Infect* 2(6):581-92.
- Sinha M, Singh RP, Kushwaha GS, Iqbal N, Singh A, Kaushik S, Kaur P, Sharma S and Singh TP (2014) Current Overview of Allergens of Plant Pathogenesis Related Protein Families. *The Scientific World Journal* 2014:1-19.

- Sjögren LL, Tanabe N, Lymperopoulos P, Khan NZ, Rodermeel SR, Aronsson H and Clarke AK (2014) Quantitative analysis of the chloroplast molecular chaperone ClpC/Hsp93 in *Arabidopsis* reveals new insights into its localization, interaction with the Clp proteolytic core, and functional importance. *J Biol Chem* 289(16):11318-30.
- Swaroop Rani T and Podile AR (2014) Extracellular matrix-associated proteome changes during non-host resistance in citrus-Xanthomonas interactions. *Physiol Plant* 150(4):565-79.
- Takahara M, Magori S, Soyano T, Okamoto S, Yoshida C, Yano K, Sato S, Tabata S, Yamaguchi K, Shigenobu S, Takeda N, Suzaki T and Kawaguchi M (2013) Too much love, a novel Kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Cell Physiol* 54(4):433-47.
- Thao NP, Chen L, Nakashima A, Hara S, Umemura K, Takahashi A, Shirasu K, Kawasaki T and Shimamoto K (2007) RAR1 and HSP90 form a complex with Rac/Rop GTPase and function in innate-immune responses in rice. *Plant Cell* 19(12):4035-45.
- Tokeshi H (1997) Doenças da cana-de-açúcar. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A and Camargo LEA (eds) Manual de Fitopatologia Doenças das plantas cultivadas. Agronômica Ceres, São Paulo, pp. 207-225.
- Urashima AS and Grachet NG (2012) Métodos de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e efeito da termoterapia na brotação das gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. *Trop Plant Pathol* 37:1.
- Van Dillewijn C and Waltham M (1952) Botany of sugarcane. New York: Chronica Botanica 371p.
- Wang WX, Vinocur B, Shoseyov O and Altman A (2001) Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Horticulturae* 560:285-292.
- Wu L, Han Z, Wang S, Wang X, Sun A, Zu X and Chen Y (2013) Comparative proteomic analysis of the plant-virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. *J Proteomics* 26(89):124-40.

## 6. Capítulo III

Proteômica da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em interação com fitopatógeno (*Leifsonia xyli subps. xyli*) e endofítico (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)

Renata Rodrigues de Almeida<sup>1</sup>, Tercilio Calsa Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética, Centro de Ciências e Biologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

Artigo a ser submetido à revista **Genetics and Molecular Biology**.

## Resumo

Estudos moleculares da interação planta-microrganismo podem revelar a importância da transdução de diferentes vias de respostas que são inibidas ou ativadas por diversas proteínas, quando plantas são submetidas a estresses. A análise proteômica busca avaliar níveis de inibição, superexpressão e síntese diferencial dessas proteínas, monitorando seu envolvimento nas vias de sinalização e defesa das plantas durante estresses. No presente trabalho, foi analisado o proteoma da interação da cana-de-açúcar com o patógeno (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; Lxx) e com o simbiote (*Gluconacetobacter diazotrophicus*; Gd) através de eletroforese bidimensional (2-DE) associada à espectrometria de massas (MS). Colmos de cana-de-açúcar (variedade RB867515) foram tratados termicamente e submersos em suspensão de células de Lxx (estirpe CTC B07) mais Gd (estirpe BR 11281) nas concentrações de  $10^9$  ml<sup>-1</sup> e  $10^6$  ml<sup>-1</sup>. Após quatro meses foi coletada a folha +1 e em seguida realizada a extração de proteínas totais, referentes aos tratamentos inoculado (Lxx+Gd) e não-inoculado (Controle), em triplicata, e quantificadas. Os extratos proteicos foram aplicados em strips de 11cm, pH 3-10, em seguida focalizados em sistema IPGPhor. Os mapas 2-DE obtidos foram analisados no software ImageMaster 2D Platinum v.7.05. Os espectros tríticos foram obtidos no espectrômetro MALDI-ToF-ToF, Autoflex III. As proteínas diferencialmente expressas (DEPs) foram identificadas por PMF (*Peptide Mass Fingerprint*) contra a base de dados: Swissprot, Saccharum\_7061, Gd\_proteome e Lxx\_proteome; taxonomia: Viridiplantae, Proteobacteria e Actinobacteria. Os resultados da eletroforese bidimensional com a interação cana-de-açúcar/Lxx+Gd mostraram que 138 *spots* apresentaram nível de expressão alterado. A análise por espectrometria de massa identificou 56 proteínas responsivas a estresses bióticos, defesa e metabolismo de carboidratos. Variações detectadas no proteoma foliar de cana-de-açúcar contribuem de forma significativa para o melhor entendimento da interação cana-de-açúcar x patógeno/simbiote uma vez que foi possível observar mecanismos moleculares utilizados pelas plantas com elevado potencial de utilidade em estratégias de seleção, melhoramento genético e estudos moleculares nesta cultura para otimização da Fixação Biológica de Nitrogênio e da resistência ao Raquitismo da Soqueira.

**Palavras-chave:** Espectrometria de Massa; *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; *Gluconacetobacter diazotrophicus*; Fixação de Nitrogênio; Raquitismo-da-Soqueira; Proteômica.

## Abstract

Molecular studies of plant-microorganism interaction may reveal the importance of the different transduction pathways responses that are activated or inhibited by various proteins when plants are subjected to stress. The proteomic analysis seeks to assess levels of inhibition, overexpression and differential synthesis of these proteins by monitoring their involvement in signaling pathways and protection of plants for stress. In this study, we analyzed the proteome of the interaction of sugarcane with the pathogen (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; Lxx) and the symbiont (*Gluconacetobacter diazotrophicus*; Gd) by two-dimensional electrophoresis (2-DE) associated with spectrometry mass (MS). Sugarcane stalks (variety RB867515) were heat-treated and immersed in Lxx cell suspension (strain B07 CTC) plus Gd (BR strain 11281) at concentrations of  $10^9$  ml<sup>-1</sup> and  $10^6$  ml<sup>-1</sup>. After four months was collected +1 leaf and then performed the extraction of total proteins, relative to the inoculated treatments (Lxx+Gd) and non-inoculated (Control) in triplicate, and quantified. The protein extracts were applied to strips of 11 cm, pH 3-10, and then focused on IPGphor system. 2-DE maps were analyzed in ImageMaster 2D Platinum v.7.05 software. Tryptic spectra were obtained in the MALDI-ToF-ToF spectrometer, Autoflex III. The differentially expressed proteins (DEPs) were identified by PMF (Peptide Mass Fingerprint) against the database: Swissprot, Saccharum\_7061, Gd\_proteome and Lxx\_proteome; taxonomy: Viridiplantae, Proteobacteria and Actinobacteria. The results of two-dimensional electrophoresis with sugarcane/Lxx +Gd interaction showed that 138 spots presented altered expression level. The analysis by mass spectrometry identified 56 proteins responsive to biotic stresses, defense and carbohydrate metabolism. Variations detected in significantly leaf proteome of sugarcane contribute to a better understanding of sugarcane x pathogen interaction / symbiont, since it was possible to observe molecular mechanisms used by plants with high potential for use in selection strategies, breeding and molecular studies in this culture to optimize the Biological Nitrogen Fixation and resistance Ratoon Stunting Disease.

**Keywords:** Mass Spectrometry; *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; *Gluconacetobacter diazotrophicus*, Nitrogen Fixation; Ratoon Stunting Disease; Proteomics.

## 6.1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar tornou-se, ao longo dos séculos, uma importante cultura, sendo cultivadas em regiões tropicais e subtropicais do globo. Apesar de mais de cem países a plantarem, apenas dez países concentram 80% produção mundial, sendo o Brasil o primeiro colocado e a Índia o segundo. Visando aumentar a produção de bioetanol significativamente, o Brasil expandiu a cultura da cana-de-açúcar a partir da década de 1970 (Rodrigues, 2010). O bioetanol, extraído a partir da cana-de-açúcar, apresenta alto potencial de geração de bioenergia (Waclawovsky *et al.*, 2010), que vem se tornando cada vez mais viável pelo desenvolvimento biotecnológico no melhoramento da cana-de-açúcar, através da manipulação genética das culturas (Menossi *et al.*, 2008; Waclawovsky *et al.*, 2010).

No ambiente, as plantas vivem em associação com microrganismos que podem colonizar sua superfície ou habitar os espaços intercelulares, causando doenças e grandes perdas ou se envolvendo na fixação de nitrogênio, beneficiando as culturas (Souza, 2001). O estudo da diversidade microbiana, associada à cultura, apresenta uma alternativa para melhorar as características e sustentabilidade da planta (Luvizotto, 2008).

A associação com microrganismos pode desencadear uma resposta a estresses bióticos, com a indução ou não da resistência nas plantas através de uma complexa rede de percepção, amplificação a transdução de sinais (De Wit, 2007), seja patogênico ou endofítico, mas com mecanismos de defesa distintos.

Pesquisas de expressão diferencial apontam que alterações substanciais na expressão gênica do hospedeiro são detectadas após o contato com diversos tipos de micro-organismos, patogênicos ou não, e que a indução dessa ampla

gama de estratégias de defesa demanda uma redistribuição massiva de energia durante todo o processo (Bolton, 2009; Soto *et al.*, 2009).

Dentre os patógenos que infectam a cana-de-açúcar, destaca-se o raquitismo da soqueira (RSD), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) (Rossetto e Santiago, 2007; Evtushenko *et al.*, 2000). A Lxx é considerada um patógeno oculto já que os sintomas provocados em cana-de-açúcar são discretos quando comparados aos sintomas causados por bactérias necrogênicas (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2009). O sintoma externo observável é o raquitismo (encurtamento dos entrenós), não sendo facilmente reconhecido no campo, uma vez que podem ser confundidos com fatores abióticos (Monteiro-Vitorello *et al.*, 2009).

Bactérias diazotróficas se destacam, sendo capazes de promover o crescimento vegetal, através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de compostos de fosfato e zinco e a secreção de bacteriocinas, que auxiliam o controle biológico de pragas e patógenos em plantas (Azevedo *et al.*, 2000; Baldani *et al.*, 2000; Lodewyckx *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2010; Lery *et al.*, 2011). Com isso, é possível utilizar potencial biotecnológico destas bactérias, estimulando uma agricultura de baixos custo e impacto ambiental. A *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) é uma bactéria endofítica com capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e foi originalmente isolada do interior de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar (Cavalcante e Döbereiner, 1988).

As interações entre simbioses/patógenos e plantas ativam uma combinação de mecanismos de defesa constitutivos de forma a favorecer ou limitar o crescimento do micro-organismo. Isso ocorre pela percepção dos estresses e, conseqüentemente, alteração do perfil de expressão gênica que leva a transcrição

e tradução de perfis proteicos distintos em condições de estresse (Colson e Deverall, 1996; Vallad e Goodman, 2004; Postel e Kemmerling, 2009).

Carvalho (2012) realizou um estudo proteômico em variedades de cana-de-açúcar em resposta à colonização por Lxx, onde se identificou proteínas exclusivas relacionadas ao crescimento, ciclo e sinalização celular e hormonal em plantas inoculadas, enquanto que em plantas não inoculadas foi observada a repressão de proteínas da via de estresse e metabolismo primário. Adicionalmente, Lery e colaboradores (2011), investigando aspectos moleculares da interação de Gd com dois genótipos de cana-de-açúcar, identificaram proteínas com papéis fundamentais no reconhecimento celular da planta. Da mesma forma, Dos Santos e colaboradores (2010), reportaram proteínas diferencialmente expressas associadas a carboidratos, metabolismo energético e processo de degradação, no estudo da proteômica da *G. diazotrophicus* co-cultivada com cana-de-açúcar.

Esse estudo objetivou identificar os peptídeos produzidos diferencialmente em planta inoculada com ambas as bactérias (Gd e Lxx) e ou não inoculada, auxiliando o entendimento das vias metabólicas ativadas ou inibidas, para enfrentar o estresse causado por esses micro-organismos.

## **6.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.2.1 Material vegetal e inoculante**

Os entrenós de colmos de cana-de-açúcar variedade RB867515 foram fornecidos gentilmente pela RIDESA/EECAC (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro/Estação Experimental de Cana-de-

Açúcar de Carpina-UFRPE). A estirpe da bactéria *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) CTC B07, foi fornecida pelo Departamento de Fitopatologia e Nematologia-ESALQ/USP (Piracicaba-SP), enquanto a estirpe da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* BR 11281 foi fornecida pelo CENA/USP (Centro de Energia Nuclear na Agricultura/ Universidade São Paulo).

### 6.2.2 Tratamento Térmico

A fim de minimizar infecções nos rebolos da variedade RB867515 contendo uma gema lateral, para experimento em casa de vegetação realizou-se tratamento térmico de acordo com metodologia apresentada por Tokeshi (2005). Os rebolos de cana-de-açúcar foram colocados em sacos de polipropileno e submersos em água a 50,5°C por 2 h (Figura 1A). Após a submersão, os rebolos foram deixados em temperatura ambiente para permitir o resfriamento dos mesmos e prosseguir com a inoculação da bactéria.

### 6.2.3 Preparo do inóculo e inoculação dos propágulos

O inóculo da bactéria *G. diazotrophicus* (Gd) estirpe BR 11281 foi cultivado em meio DYGS (Rodriguez Neto *et al.*, 1986) a 28°C e 130 rpm. O crescimento foi acompanhado até que o inóculo atingisse densidade ótica 0,5 a 540 nm, correspondendo a aproximadamente  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup> (Canuto *et al.*, 2003; Canuto, 2008). Uma alíquota do inóculo de Gd foi diluída em 2 L de água estéril, para obtenção de suspensão com aproximadamente  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. A estirpe da bactéria *Leifsonia xyli subsp. xyli* (Lxx) CTC B07, foi crescida em meio líquido MSC new modificado por Monteiro-Vitorello e colaboradores (2004) por dez dias a 28°C, 130 rpm. O crescimento foi acompanhado até que o inóculo de Lxx atingisse

densidade ótica 0,335 a 600 nm, correspondendo a aproximadamente  $10^{12}$  células.mL<sup>-1</sup> (Rosa, 2006). Uma alíquota do inóculo de Lxx foi diluída em 2 L de água estéril, para obtenção de suspensão com aproximadamente  $10^9$  células.mL<sup>-1</sup>. Para o experimento, os segmentos de colmo tratados termicamente foram submersos na mistura 1:1 das suspensões bacterianas na concentração determinada acima por 1 h. O tratamento controle foi realizado através de submersão dos segmentos de colmo em água esterilizada, nas mesmas condições (Figura 1B). Após a inoculação, os segmentos de colmo foram acondicionados em bandejas de polietileno contendo solo autoclavado para brotação (Figura 1C).

#### **6.2.4 Delineamento experimental**

O experimento de casa de vegetação foi conduzido na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina (EECAC), Universidade Federal Rural de Pernambuco, no período de setembro 2012 a fevereiro 2013. Após brotação dos colmos inoculados com Gd e Lxx, aos 30 dias, plantas foram transferidas para vasos de polietileno. Os vasos contendo solo autoclavado, cada um contendo uma planta, foram dispostos de maneira a caracterizar o delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (Controle, Mista) e cinco repetições cada (Figura 1D).



**Figura 1.** Montagem do experimento *in vivo* em casa de vegetação, mostrando o tratamento térmico dos colmos de cana-de-açúcar. (A) Inoculação dos colmos com as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). (B) Colmos inoculados colocados para brotação em bandejas (C). Plantas já desenvolvidas após dois meses de transplantio (D).

Após quatro meses do transplantio, foram coletadas folhas +1 [a primeira folha que apresenta bainha visível conforme denominação de Van Dillewijn (1952)]. As amostras coletadas foram cortadas em frações menores, colocadas em tubos cônicos de 50 mL (Falcon), imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em gelo seco, até estocagem a -80°C.

### 6.2.5 Confirmação da inoculação com (Lxx e Gd) e colonização das plantas

A fim de confirmar a presença diferencial de Lxx e de Gd nas amostras coletadas nos tratamentos do experimento em casa-de-vegetação, foi extraído DNA total do material vegetal coletado (Doyle e Doyle, 1991) para PCR convencional utilizando os seguintes primers específicos da região ITS do genoma de Lxx (Fegan *et al.*, 1998): LxxF (5'-AGGATTCGGTTCTCATCTCA-3') e LxxR (5'-AAGGAGCATCTGGCACCCT-3'). As reações para amplificação em *nested*-PCR (2x) foram: 96°C por 5 min; 35 ciclos de: 92°C por 15 s, 57°C por 30 s e 72°C por 30 s (amplicon de 305 pb); e extensão final a 72°C por 5 min (Fegan *et al.*, 1998).

Foi utilizada também a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a confirmação da presença diferencial de Lxx entre os tratamentos. Para a qPCR foram utilizados os mesmos primers específicos da região ITS de Lxx que na PCR convencional. As reações de qPCR foram conduzidas empregando a tecnologia SYBR Green® (Molecular Beacons) no sistema RotorGene 6000 (Corbett Research), disponibilizado pelo Laboratório de Genética Humana e Animal, do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco. A reação de amplificação foi realizada em volume de 15 µL, contendo 20 ng do DNA molde, 0,4 µM de cada primer, 2x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) e água ultrapura (Milli-Q) estéril. A qPCR ocorreu com os seguintes parâmetros: 95°C por 5 min; seguidos de 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 10 s, anelamento a 57°C por 15 s, extensão a 60°C por 60 s. Ao final, o produto obtido foi submetido ao protocolo de dissociação ajustado de 60 a 95°C, para obtenção da curva de dissociação (*melting*). Foram comparados os valores de C<sub>q</sub> (ciclo de quantificação) encontrados nas plantas controle (não inoculadas) com as plantas

inoculadas (Lxx), a fim de verificar a concentração relativa de DNA de Lxx nas plantas coletadas.

Para a confirmação da presença diferencial de Gd nas amostras coletadas nos tratamentos do experimento em casa-de-vegetação, foi extraído DNA total do material vegetal coletado (Doyle e Doyle, 1991) para PCR convencional utilizando os seguintes *primers* específicos da região do gene 16S rRNA de Gd: GdF (5'-TGAGTAACGCGTAGGGATCTG-3') e GdR (5'-GGAAACAGCCATCTCTGACTG-3'). As reações para amplificação em *nested*-PCR (2x) foram: 92°C por 5 min, 28 ciclos de: 60,5°C por 30 s, 72°C por 1 min (amplicon de 915 pb) e 92°C por 1 min; anelamento final a 60,5°C por 15 s, e extensão final a 72°C 10 min (conforme Franke-Whittle *et al.*, 2005).

Foi utilizada também a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a confirmação da presença diferencial da bactéria entre os tratamentos. Para a qPCR foram utilizados os mesmos *primers* específicos da região 16s rRNA de Gd que na PCR convencional. As reações de qPCR foram conduzidas empregando a tecnologia SYBR Green® (Molecular Beacons) no sistema RotorGene 6000 (Corbett Research), disponibilizado pela Plataforma Tecnológica de Genômica e Expressão Gênica do Laboratório Central do CCB/UFPE. A reação de amplificação foi realizada em volume de 15 µL, contendo 20 ng do DNA molde, 0,4 µM de cada *primer*, 2x Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) e água ultrapura (Milli-Q) estéril. A qPCR ocorreu com os seguintes parâmetros: 95°C por 5 min; seguidos de 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 10 s, anelamento a 56°C por 15 s, extensão a 60°C por 120 s. Ao final, o produto obtido foi submetido ao protocolo de dissociação ajustado de 60 a 95°C, para obtenção da curva de dissociação (*melting*). Foram comparados os valores de C<sub>q</sub> (ciclo de quantificação)

encontrados nas plantas controle (não inoculadas) com as plantas inoculadas (Gd), a fim de verificar a concentração relativa de DNA de Gd nas plantas coletadas.

#### **6.2.6 Variáveis morfométricas**

Para um melhor entendimento sobre os mecanismos que conferem aumento na eficiência produtiva da cultura de cana-de-açúcar no experimento, foram mensurados os parâmetros morfométricos: comprimento da folha+1, altura da planta, número de perfilhos, número de entrenós e diâmetro do 4º entrenó a partir do ápice caulinar das plantas (Marafon, 2012). Os dados morfofisiológicos obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do programa estatístico Assistat 7.5 Beta.

#### **6.2.7 Extração de proteínas**

As proteínas totais da folha +1 de cana-de-açúcar foram extraídas utilizando-se método com fenol (Hurkman e Tanaka, 1986) modificações conforme Boaretto (2012). Dois gramas de folhas congeladas foram macerados em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de pó fino e homogeneizados em 15 mL de tampão de extração em tubos (50 mL) e mantidos sob agitação constante a 70 rpm a 4°C por 30 min. Foram adicionados 15 mL de fenol saturado com Tris-HCl (pH 8,5). Em seguida, os tubos foram novamente mantidos em agitação constante a 70 rpm a 4°C por 30 min.

Os tubos foram centrifugados a 10.000xg por 30 min a 4°C, e o sobrenadante (fase orgânica) foi coletado e transferido para tubo novo, sendo adicionado a este 5 volumes de 0,1 M de acetato de amônio dissolvido em metanol 100%. Os tubos

foram mantidos a -20°C durante 18 h para precipitação das proteínas, e em seguida centrifugados a 16.000xg por 30 min a 4°C. Após descarte do sobrenadante, o precipitado (*pellet*) foi lavado três vezes sob centrifugação a 16.000xg por 30 min a 4°C com 0,1 M de acetato de amônio dissolvido em metanol 100%, uma vez com metanol 100% e uma vez com acetona 100%. Antes de cada centrifugação, os tubos permaneceram por uma hora a -20°C. No final das lavagens, os tubos permaneceram abertos, acondicionados em gelo, em câmara de fluxo laminar até a secagem completa do *pellet*. Após secagem, os *pellets* foram solubilizados em solução de ureia 8 M e tioureia 2 M, e submetidos à sonicação em 60% de amplitude em cinco pulsos de 5 s intercalados com pausas de 10 s. As proteínas solúveis totais foram quantificadas conforme método descrito por Bradford (1976). As leituras foram realizadas em triplicata por meio de espectrofotômetro de luz visível (Biospectro SP-220) a 595 nm. A verificação da qualidade dos extratos de proteínas das amostras foi feita mediante visualização em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5%. Foi realizada extração de proteínas de cada uma das cinco réplicas biológicas de cada tratamento, sendo os extratos obtidos reunidos em um único tubo.

## **6.2.8 Eletroforese bidimensional**

### **6.2.8.1 Focalização isoelétrica (IEF)**

A IEF foi realizada em fita IPG de 11 cm e pH 3-10 linear (GE Life Sciences) para 150 µg de proteínas totais das amostras de folha dissolvidas em solução de ureia 7 M, tioureia 2 M, CHAPS 2% (m/v), 19,4 mM de DTT, anfolinas 0,5% (v/v) (IPG buffer, pH 3-10 linear; GE Life Sciences) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). A hidratação das fitas foi realizada em IPG-Box (GE Life Sciences) a

temperatura ambiente por 18 h. As fitas foram focalizadas no sistema Ettan IPGphor 3 (GE Life Sciences), em quatro etapas nas seguintes condições: i) 500 V, 1 h; ii) 800 V, 1 h; iii) 7.000 V; 1 h (gradiente); e iv) 2.200 V (constante). Após a focalização, as fitas foram armazenadas a -80°C até a realização da segunda dimensão.

#### **6.2.8.2 Eletroforese (2D-PAGE)**

Para a segunda dimensão (eletroforese), foram realizadas a redução e alquilação das fitas focalizadas anteriormente. Estas foram submetidas à redução através da imersão em tampão de equilíbrio contendo 2% DTT (ditiotreitól) e traços de corante bromofenol por 20 min. Decorrido esse tempo, as fitas foram transferidas e imersas em nova solução de equilíbrio contendo 4% de IAA (iodoacetamida) e traços do corante bromofenol por mais 20 min. A segunda dimensão, ou eletroforese, foi realizada no sistema Omniphor MV 20 (Biosystems) em SDS-PAGE 12,5%, utilizando uma fita de IEF por gel, constando das seguintes etapas: 40 mA por 15 min, 80 mA por 30 min, 100 mA por 2,5 h; voltagem fixa de 300 V. Foram obtidos géis em triplicata para cada tratamento analisado (Controle e Gd). Os géis foram mantidos por 30 min em solução fixadora (etanol 40%, ácido acético 10%) e, posteriormente, imersos na solução de coloração [metanol 20%, ácido acético 5% e água deionizada, solução de azul de *coomassie* (Phastgel Blue R, GE Life Sciences) 50%] durante 18 h. Em seguida, os géis foram submetidos à imersão em solução descorante (etanol 20%, ácido acético 5%) por 15 min, 45 min e duas vezes por 2 h. Após a descoloração, os géis foram armazenados em solução de preservação (ácido acético 5%).

### 6.2.9 Digitalização e análise de imagens

Os géis foram digitalizados com auxílio de *scanner* de transparência ImageScanner III (GE Life Sciences) calibrado para densidade ótica, utilizando-se o programa LabScan 6.0 (GE Life Sciences) com os seguintes parâmetros: modo de transparência, resolução de 150 dpi e filtro vermelho, ideal para coloração de géis com azul de *Coomassie*. Para a captura da imagem foi realizada previamente uma etapa de calibração do scanner com a fita de calibração Kodak 3, que apresenta valores de densidade ótica ou difusa definidos, conforme procedimentos recomendados pelo fabricante. As imagens dos géis foram analisadas no software de análise ImageMaster 2D Platinum v.7.05 (GE Life Sciences). Todas as triplicatas de géis de cada tratamento, ou réplicas técnicas, foram submetidas aos mesmos parâmetros de análise comparativa para detecção e seleção de *spots* (manchas coradas delimitadas e representativas de proteínas), conforme Pacheco et al. (2013), com inspeção visual para eliminação de interferentes como bolhas e artefatos da coloração. Nas comparações das triplicatas entre os tratamentos, foram selecionados como *spots* diferenciais aqueles que apresentaram razão de variação no parâmetro normalizado porcentagem de volume (%vol)  $\geq 1,5$  e ANOVA  $\leq 0,05$ . Estes *spots* selecionados foram denominados DEPs (proteínas diferencialmente expressas).

### 6.2.10 Digestão com tripsina

Os *spots* com variação significativa entre tratamentos (proteínas com acúmulo diferencial estatisticamente significativo) foram excisados manualmente de uma das réplicas técnicas (géis) com auxílio de bisturi e incubados em solução

descolorante contendo metanol 50% e ácido acético 2,5% durante 18 h, em temperatura ambiente, para remoção do corante. Após desidratação em acetonitrila 100%, as proteínas (*spots*) sofreram redução e em seguida aquilação. Inicialmente, os fragmentos de gel foram reidratados com 10 mM DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 30 min a 60°C. O excesso do líquido foi removido e substituído por 30 µL de solução 10 mM IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio. Em seguida, os fragmentos foram mantidos no escuro por 30 min, a temperatura ambiente. O líquido excedente foi então removido, os fragmentos lavados com 100 mM de bicarbonato de amônio e novamente desidratados com acetonitrila 100%. Posteriormente a essas etapas, foram adicionados 30-50 µL (até cobrir o fragmento de gel) de solução com 20 ng/µL de tripsina para digestão da proteína, e as amostras foram incubadas em gelo por 30 min. Depois da reidratação, foi adicionada solução de bicarbonato de amônio 50 mM cobrindo todo o fragmento de gel, e a digestão mantida a 37°C por 16 h. Após este período, foram acrescentados à solução anterior 30-50 µL (até cobrir o fragmento de gel) de solução de extração [5% de ácido trifluoroacético (TFA) em 50% de acetonitrila], incubada por 1 h em gelo e centrifugada até 10.000xg para coleta e transferência do sobrenadante para outro tubo. A extração foi efetuada duas vezes. O sobrenadante de cada *spot* foi concentrado em concentrador a vácuo (*Speed-vac*, Eppendorf) e armazenado a -20°C até a realização das análises por espectrometria de massas.

#### **6.2.11 Espectrometria de massas**

Os espectros MS e MS/MS foram obtidos em espectrômetro Autoflex III MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonics) disponibilizado pela Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, CETENE, Recife-PE, usando matriz de

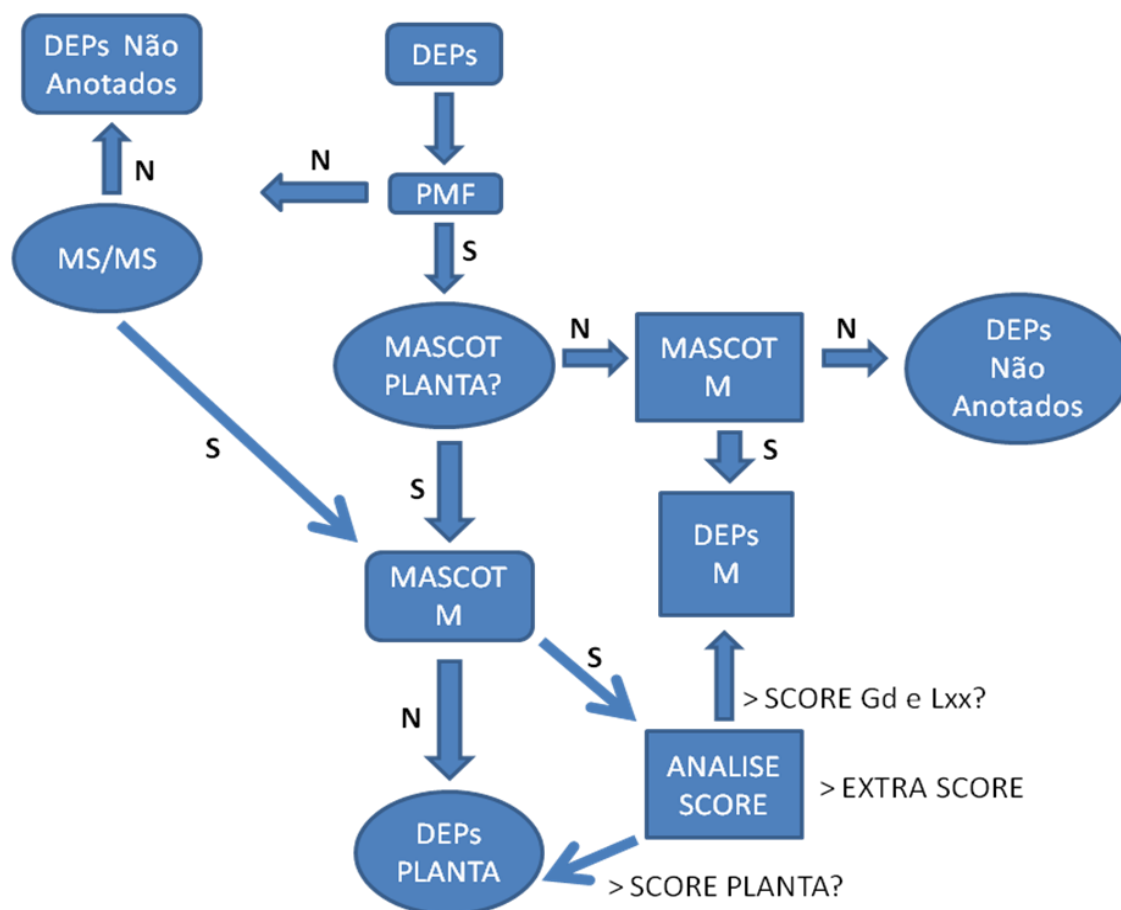
ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma/C8982) e conforme os protocolos de análise padronizados de: tipagem por massa de peptídeos (PMF - *peptide mass fingerprinting*; método refletido positivo RP\_Proteomics\_HPC) e busca de íons (*ion search*, método LIFT). Os íons foram acelerados a 19 KV, laser Nd:YAG smartbeam 355 nm, 100 Hz.

## 6.2.12 Análises de bioinformática

### 6.2.12.1 Identificação presumível

Para MS, os espectros foram identificados através da análise dos arquivos *peaklist.xml* no software Mascot (Matrix Inc.) pelo método de PMF contra os bancos de dados de: i) cana-de-açúcar (Saccharum\_7061), Gd (Gd\_proteome) e Lxx (Lxx\_proteome) disponibilizados em colaboração com o Laboratório de Espectrometria de Massas Dalton (<http://daltonlab.iqm.unicamp.br>), do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, coordenado pelo Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo; e ii) Viridiplantae, Proteobacteria e Actinobacteria disponíveis na versão *online* do Mascot (<http://www.matrixscience.com>); utilizando-se os seguintes parâmetros: base de dados: Swissprot, Saccharum\_7061, Gd\_proteome ou Lxx\_proteome; taxonomia: Viridiplantae, Proteobacteria ou Actinobacteria; modificação fixa: carbamidometil (C); modificação variável: oxidação (M); e tolerância 200 ppm. Para a análise de dados MS/MS, realizada para as amostras não identificáveis via PMF, os espectros foram identificados através da análise dos respectivos arquivos *peaklist.xml* pelo método de busca de íons (*ion search*) contra os mesmos bancos de dados e parâmetros citados anteriormente, exceto: tolerância MS/MS 0,6 Da; e valor específico de massa/carga

(m/z) de cada respectivo íon precursor. Foram consideradas significativas as identificações com *score* maior que o valor limite (*cut-off*). O *score* equivale a  $-10 \cdot \log(P)$ , sendo P a probabilidade de a similaridade encontrada ser ao acaso. Valores de *score* acima do valor limite têm significância estatística ( $p < 0,05$ ). A identificação de DEPs em bancos de dados de origem vegetal ou bacteriana seguiu o fluxograma apresentado na Figura 2, para discriminar proteínas produzidas pela cana-de-açúcar ou por Lxx ou Gd, e resultou na anotação de cada DEP associado a acessos do banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org>) e os respectivos descritores (Tabela 5).



**Figura 2.** Fluxograma da análise de identificação dos DEPs/MS (proteínas diferencialmente expressas/ Espectrometria de massa); PMF (*Peptide mass Fingerprinting*); MS/MS (Espectrometria de massas em *Tandem*). A base de dados de plantas refere-se sequencialmente ao banco de dados de cana-de-açúcar (*Saccharum\_7061*, Laboratório MS Dalton - <http://daltonlab.iqm.unicamp.br> , IQ-Unicamp) e Viridiplantae/Swissprot. A base de dados de Lxx e Gd refere-se sequencialmente ao banco de dados de *Leifsonia xyli* subsp.*xyli* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Lxx\_proteome, Gd\_proteome Laboratório MS Dalton - <http://daltonlab.iqm.unicamp.br> , IQ-Unicamp) e Proteobacteria/Actinobacteria/Swissprot. M refere-se à inoculação mista de Lxx e Gd.

### 6.2.12.2 Ontologia gênica (GO)

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas do UniProt através da ferramenta *Retrieve ID* e submetidas à análise de distribuição de ontologia gênica (GO) por processo biológico, e mapeadas comparativamente na espécie modelo *Arabidopsis thaliana* com o programa MapMan-Mercator (Lohse et al., 2014; <http://mapman.gabipd.org/web/guest/mercator>) ajustado para base de dados de *A. thaliana* (TAIR proteins release 10) e *Blast\_cutoff* 80%. A distribuição de termos GO, ou categorias funcionais, do conjunto de DEPs de cada tratamento foi utilizada na comparação entre o controle (plantas não inoculadas com Lxx/Gd) e plantas inoculadas com Lxx+Gd.

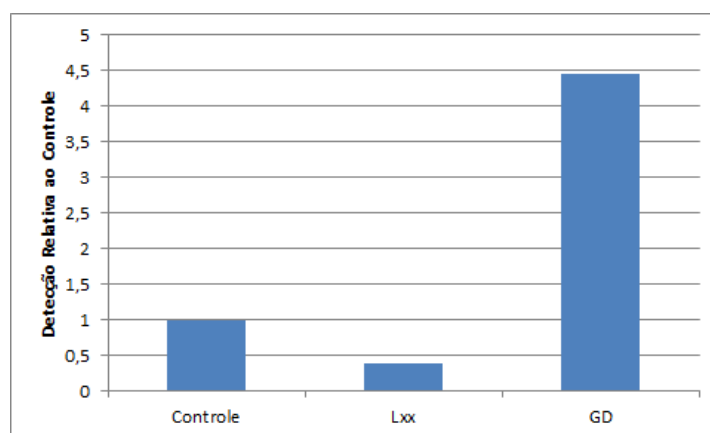
Adicionalmente, foi realizada análise de enriquecimento de termos de GO no programa Panther (Mi et al., 2013; <http://www.pantherdb.org> acessado de <http://geneontology.org>) com parâmetros padronizados para mapeamento no banco de dados de proteínas/GO de *A. thaliana*. Para esta análise, cada acesso UniProt identificador das DEPs de cana-de-açúcar foi necessariamente mapeado para seu acesso UniProt mais similar no proteoma de *A. thaliana*, através do alinhamento das respectivas sequências FASTA no programa BLASTP/NCBI (parâmetros: database UniProtKB/Swissprot; organismo *Arabidopsis thaliana* (taxid:3702); *e-value*  $\leq 10^{-5}$ ). O conjunto de DEPs mais acumulados no tratamento inoculado com Lxx+Gd foi considerado como lista de análise (*analyzed list*), a qual foi comparada com: i) o conjunto de DEPs mais acumulados no tratamento não inoculado com Lxx+Gd ou controle; e ii) proteoma de referência obtido a partir do genoma de *A. thaliana*. O tipo de análise realizada no programa Panther foi o teste de super-representação, com correção de Bonferroni e base de dados de ontologia (completa ou GO-*slim* para processos biológicos), atualizada em junho/2015.

## 6.3 RESULTADOS

### 6.3.1 Confirmação da inoculação com *L. xyli* subsp. *Xyli* e *G. diazotrophicus*

Foi realizada a extração de DNA total da folha +1 de todas as réplicas de cada tratamento para confirmação da presença das bactérias Lxx e Gd através da técnica de *nested*-PCR (Fegan *et al.*, 1998) para detectar baixa quantidade de DNA bacteriano na amostra. No entanto, não foi possível obter produto de amplificação visualmente detectável, nem mesmo com maior número de ciclos e/ou teste em gradiente de temperatura de anelamento dos *primers*.

Já pelo método por qPCR as análises para detecção de Lxx e Gd mostraram que as plantas inoculadas com ambas as bactérias apresentaram quantificação relativa pelo gene 16S rRNA de Gd mais que quatro vezes maior do que as plantas controle (não inoculadas), enquanto que a quantificação relativa pela região ITS de Lxx foi inibida cerca de 2,5 duas vezes em relação ao controle (Figura 3). A confirmação de carga bacteriana relativa 4, 5x maior para o endofítico e 2,5x menor para o patógeno permitiu a obtenção de contraste entre os tratamentos para esta interação planta-microrganismos, sugerindo competição entre Gd e Lxx, com diferenças refletidas nos perfis proteômicos analisados.



**Figura 3.** Quantificação relativa por PCR em tempo real das amostras de cana-de-açúcar inoculadas com ambas as bactérias *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd) em relação ao controle (C).

### 6.3.2 Variáveis Morfométricas

Estatisticamente, nenhuma variável morfométrica apresentou diferença significativa entre tratamentos. Foram medidos o comprimento da folha +1 (CF1), a altura da planta (h, do solo até a inserção das folhas), o número de entrenós (NE), o diâmetro do entrenó nº4 (DE4, 4º entrenó a partir da base do colmo) e o número de perfilhos (NP), apenas forte tendência de redução no perfilhamento (16%), devido a possíveis efeitos na regulação do desenvolvimento meristemático (Ponte *et al.*, 2010). Estes resultados podem ser discutidos em relação à idade das plantas: na coleta, estavam com 4 meses, muito anterior à idade de 9 meses no qual os sintomas da RSD e os efeitos da FBN são mais evidentes (Urashima e Grachet, 2012).

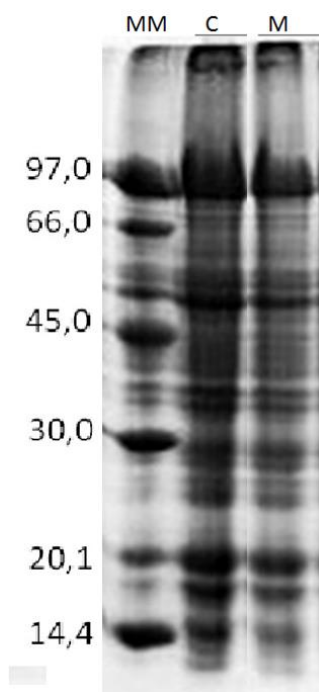
**Tabela 1.** Médias dos parâmetros morfométricos de cana-de-açúcar aos 120 dias após inoculação ou não com Lxx+Gd. . Valores acompanhados pela mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

| Parâmetro                    | Controle | Lxx+Gd | Diferença | Variação % |
|------------------------------|----------|--------|-----------|------------|
| Comprimento da Folha +1 (cm) | 68,0 a   | 66,4 a | -1,60     | -2,35      |
| Altura da planta (m)         | 1,25 a   | 1,21 a | -0,04     | -3,04      |
| Diâmetro do entrenó 4 (cm)   | 2,46 a   | 2,50 a | 0,04      | 1,63       |
| Nº de entrenós               | 8,6 a    | 8,4 a  | -0,20     | -2,33      |
| Nº de perfilhos              | 3,6 a    | 3,0 a  | -0,60     | -16,67     |

Em relação às plantas controle, os indivíduos inoculados com Lxx+Gd mostraram mínima diminuição do comprimento da folha+1, da altura e do número de entrenós.

### 6.3.3 Extração de proteínas

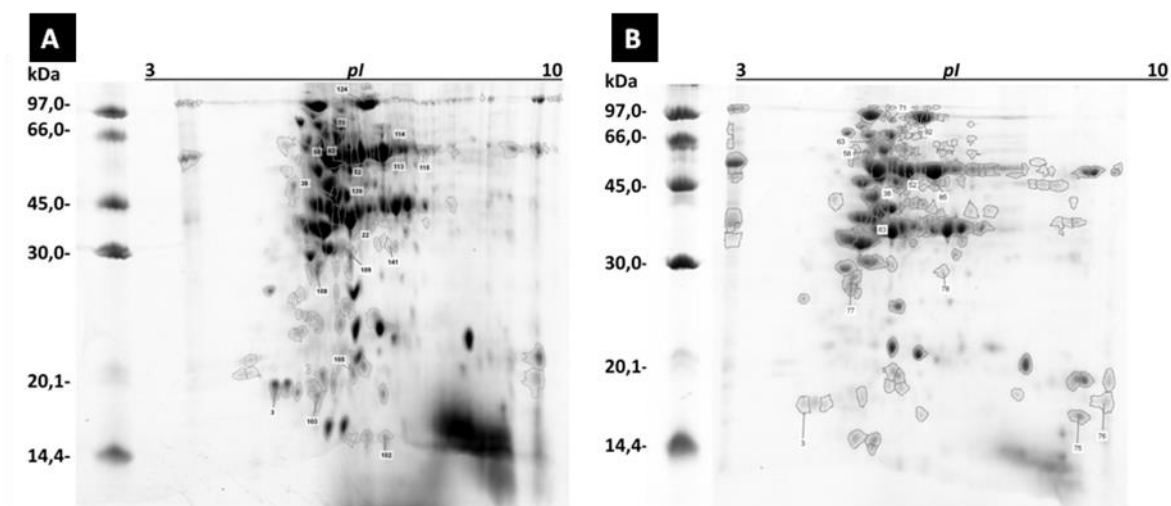
O protocolo descrito por Boaretto (2012) para extração de proteínas totais de folha mostrou-se adequado para obtenção de extrato proteico de folhas de cana-de-açúcar compatível com as análises posteriores. A visualização das proteínas extraídas em gel SDS-PAGE permitiu observar bandas bem definidas e ausência de rastros, apontando para integridade e baixa concentração de interferentes (Figura 4). Realizaram-se cinco extrações de proteínas independentes, correspondendo a cada réplica biológica. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos independentemente e, posteriormente, misturados em um único tubo. O agrupamento das amostras visou reduzir a variação biológica, aumentando a capacidade de detecção de diferenças entre os tratamentos (Diz *et al.*, 2009). Outra vantagem dessa metodologia é permitir a análise de maior número de amostras em menor tempo e consumo de material.



**Figura 4.** SDS-PAGE com proteínas totais de amostras de folha de cana-de-açúcar inoculadas com as bactérias *Leifsonia xyli subsp. xyli* e *Guconacetobacter diazotrophicus* (M) e não inoculadas (C). Marcador molecular de alto peso (MM).

### 6.3.4 Eletroforese bidimensional (2D)

Foram obtidos três géis 2D-PAGE (réplicas técnicas) das réplicas biológicas reunidas de cada tratamento analisado para a variedade de cana-de-açúcar RB867515, inoculada ou não com Lxx+Gd. Exemplos destes géis são mostrados na Figura 5. Cada gel foi digitalizado em *scanner* de transparência calibrado para densidade ótica, e os arquivos de imagem foram utilizados para análise no programa ImageMaster Platinum v.7.05.



**Figura 5.** Imagens de géis 2D-PAGE utilizando extrato de proteínas totais de folha. A) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar não inoculado (Controle), B) Extrato obtido de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Leifsonia xyli subsp. xyli* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

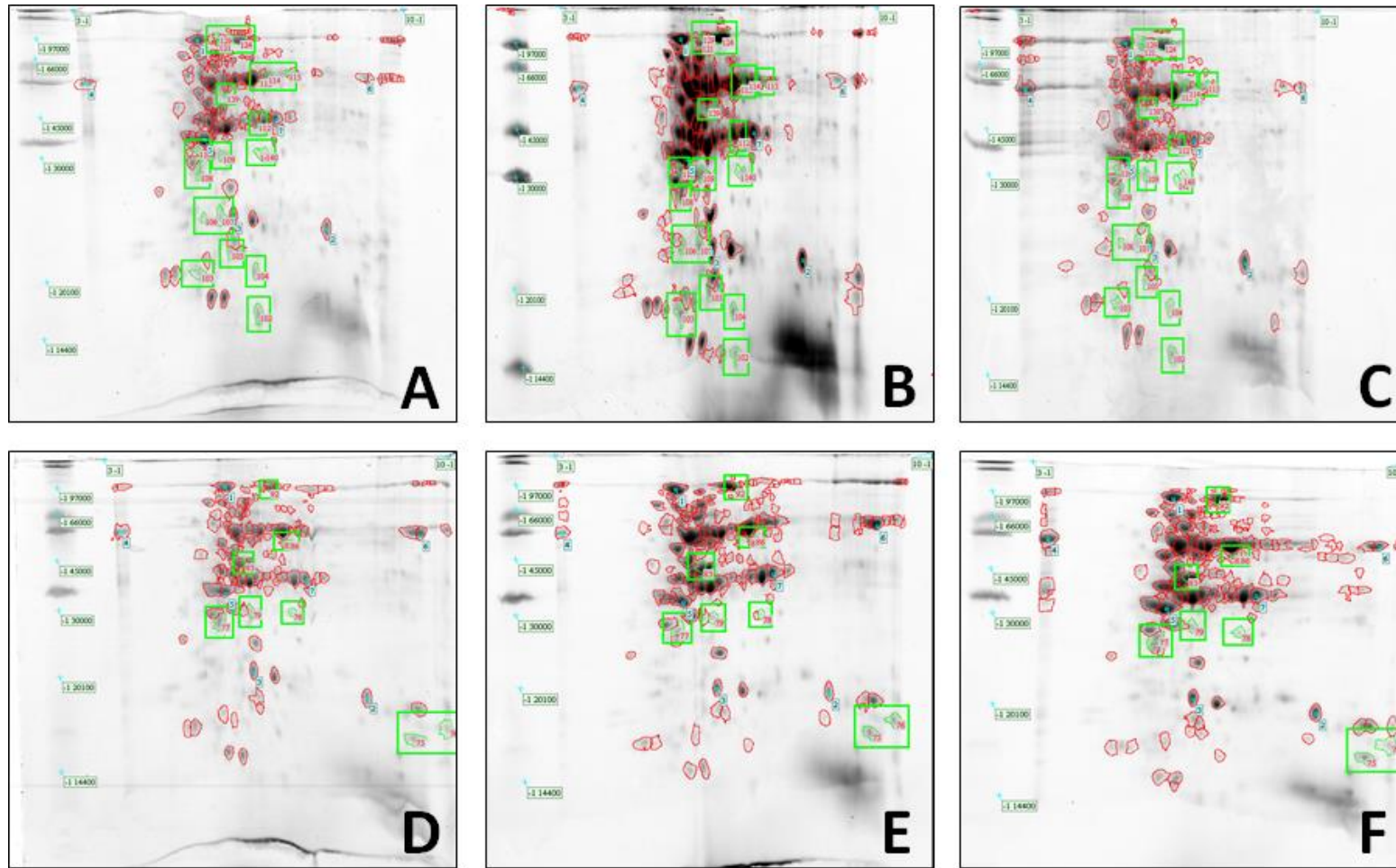
### 6.3.5. Digitalização e análise de imagens

Os arquivos de imagem digitalizados foram analisados no programa ImageMaster Platinum v.7.05. Foi observado que as réplicas de um mesmo tratamento apresentaram similaridade significativa e foram, portanto, analisáveis, conforme a média de coeficientes de correlação obtida de 0,858 no tratamento controle e 0,8436 no tratamento inoculado com Lxx+Gd.

A eletroforese 2D permitiu a detecção de 961 *spots* nas amostras de réplicas técnicas dos tratamentos, distribuídos em média a 162 *spots*/gel (variando de 149 a 184) no tratamento controle e 159 *spots*/gel (variando de 129 a 177) no tratamento inoculado com Lxx+Gd.

Após a análise comparativa entre os tratamentos das imagens digitalizadas (Figura 6), foram detectados 142 *spots* representativos de proteínas distintas, dos quais 40 foram detectados apenas no tratamento não inoculado com Lxx+Gd e 27 foram detectados apenas em plantas inoculadas com Lxx+Gd (Tabela 2). Dentre estes *spots*, denominados como exclusivos por não terem sido detectados via 2D-PAGE no outro tratamento, alguns não foram coletados por não apresentarem variação significativa na %vol (ANOVA  $\leq 0,05$ ) entre tratamentos.

Os demais 75 *spots* foram detectados em ambos os tratamentos (comuns), dos quais 46 tiveram maior acúmulo no controle não inoculado e 29 apresentaram maior acúmulo em plantas inoculadas com Lxx+Gd. Dos 46 *spots* comuns com maior acúmulo no tratamento controle, apenas quatro apresentaram variação significativa na %vol (ANOVA  $\leq 0,05$ ) e razão de variação (*ratio*)  $\geq 1,5$ . No tratamento inoculado com Lxx+Gd, oito dos 29 *spots* comuns foram significativamente variáveis, dos quais seis também tiveram (*ratio*)  $\geq 1,5$ . Deste modo, foram excisados dos géis 36 *spots* considerados DEPs, para identificação via MS.



**Figura 6.** Imagens de 2D-PAGE digitalizadas e após determinação de spots comuns e exclusivos em análise no programa ImageMaster Platinum 7.05. A, B e C: 2D-PAGE de amostras não inoculadas com Lxx+Gd; D, E e F: 2D-PAGE de amostras inoculadas com Lxx+Gd.

**Tabela 2.** Total de spots selecionados com a razão de variação de %vol  $\geq 1,5$  para cada tratamento controle (não inoculado) e Lxx+Gd (inoculado).

| Descrição                 | Tratamentos   |           |
|---------------------------|---------------|-----------|
|                           | Não inoculado | Inoculado |
| Spots analisados          | 86            | 56        |
| Média/réplica             | 162           | 159       |
| Comuns                    | 75            | 75        |
| Maior acúmulo             | 46            | 29        |
| ANOVA $\leq 0,05$         | 6             | 8         |
| e <i>ratio</i> $\geq 1,5$ | 4             | 6         |
| Exclusivos <sup>1</sup>   | 40            | 27        |
| ANOVA $\leq 0,05$         | 19            | 9         |
| DEPs <sup>2</sup>         | 23            | 13        |

<sup>1</sup>Não detectados no outro tratamento por 2D-PAGE.

<sup>2</sup>Proteínas diferencialmente expressas (*spots* comuns com ANOVA significativa e Ratio  $> 1,5$  + exclusivos com ANOVA significativa).

### 6.3.6. Espectrometria de massas (PMF, MS/MS)

Os DEPs selecionados a partir da análise comparativa em 2D-PAGE foram analisados em espectrometria de massas para sua identificação presumível em banco de dados de acesso público. Foram obtidos espectros de massa conforme descrito na Tabela 3. Na análise realizada em espectrômetro MALDI-ToF/ToF via PMF e busca de íons, todas as amostras do total de 36 digeridas com tripsina resultaram em espectros de massa com qualidade necessária para análise no programa Mascot. A análise complementar por sequenciamento *de novo* das seis DEPs não identificadas está em andamento (dados não apresentados).

**Tabela 3.** Tabela de eficiência da análise em espectrometria de massas para as DEPs selecionadas para identificação.

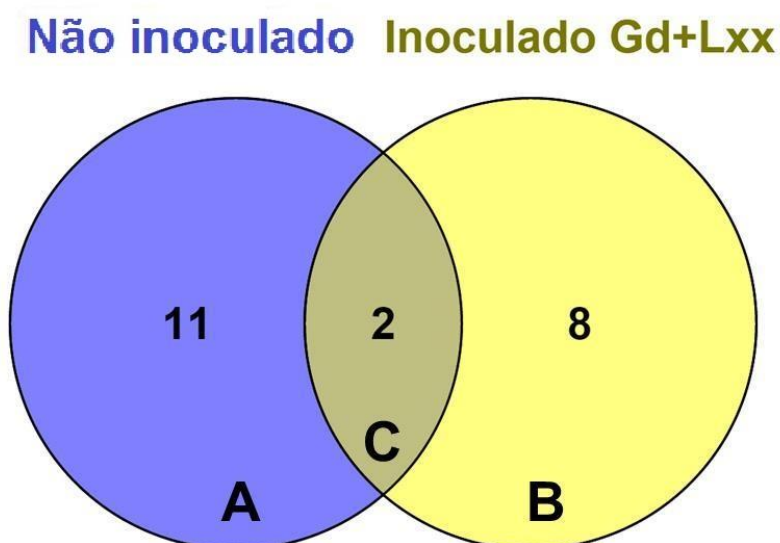
| Descrição                      | Total | %      |
|--------------------------------|-------|--------|
| Deps coletados                 | 36    | 100,00 |
| Analisados PMF                 | 36    | 100,00 |
| Analisáveis                    | 36    | 100,00 |
| Identificados <sup>1</sup>     | 27    | 75,00  |
| Não identificados <sup>2</sup> | 9     | 25,00  |
| Analisados MS/MS               | 9     | 25,00  |
| Analisáveis                    | 9     | 25,00  |
| Identificados <sup>1</sup>     | 3     | 8,33   |
| Não identificados <sup>2</sup> | 6     | 16,67  |
| Anotados                       | 30    | 83,33  |
| Não identificados              | 6     | 16,67  |

<sup>1</sup>Com score Mascot significativo ( $p < 0,05$ )

<sup>2</sup>Sem score Mascot significativo ( $p > 0,05$ )

### 6.3.7. Análises de Bioinformática

A busca dos espectros de massa produzidos para as DEP nos bancos de dados traducionais permitiu a identificação presumível (*in silico*) para inferências funcionais potencialmente relacionadas com respostas moleculares da cana-de-açúcar aos tratamentos. A distribuição das anotações obtidas (Figura 7) demonstrou uma quantidade pouco maior de DEPs no tratamento controle, não inoculado, do que no tratamento inoculado. Ao contrário do esperado para um diagrama de Venn com estes tipos de dados, ou seja, com proteínas diferencialmente acumuladas em cada um dos conjuntos comparados, houve sobreposição de anotações entre DEPs de ambos os tratamentos: duas anotações foram iguais para *spots* diferentes oriundos dos dois tratamentos (proteínas K4FC67 e S4WDN5).



**Figura 7.** Diagrama de Venn representando as anotações de *spots* diferencialmente expressos na folha de cana-de-açúcar da variedade RB867515 nos tratamentos controle (não inoculado, A) ou inoculado com Lxx+Gd (B), e identificados como proteínas da planta hospedeira. As duas anotações comuns no diagrama (C) referem-se à mesmas anotações para *spots* diferentes (proteínas K4FC67, S4WDN5). Os conjuntos A, B e C correspondem às identificações na Tabela 5.

### 6.3.7.1 Identificação presumível e anotação das DEPs

A identificação das proteínas selecionadas como diferenciais é apresentada nas Tabelas 4, 5 e 6, obtida através da análise dos arquivos *peaklist.xml* oriundos de PMF e/ou MS/MS no programa Mascot e considerando apenas as associações significativas ( $p \leq 0,05$ ). Com base no fluxograma da Figura 2, as proteínas foram presumivelmente discriminadas por organismo de origem, ou seja, cana-de-açúcar, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou indeterminado, de acordo com a maior similaridade estatística obtida com o programa Mascot.

**Tabela 4.** Distribuição da identificação obtida para as DEPs selecionadas, conforme táxon de maior similaridade pela análise no programa Mascot.

| Descrição                | DEPs  |        |
|--------------------------|-------|--------|
|                          | Total | %      |
|                          | 36    | 100,00 |
| Com identificação        | 30    | 83,33  |
| Viridiplantae            | 26    | 72,22  |
| Poaceae                  | 24    | 66,67  |
| <i>Saccharum</i>         | 18    | 50,00  |
| Bacteria                 | 4     | 11,11  |
| <i>Leifsonia</i>         | 2     | 5,56   |
| <i>Gluconacetobacter</i> | 2     | 5,56   |
| Sem identificação        | 6     | 16,67  |

**Tabela 5.** Anotação presumível das DEPs de cana-de-açúcar, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado (Lxx+Gd) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE.

| Spot                        | Ratio<br>Lxx+Gd/C | ANOVA   | Categoria           | Acesso     | Protein names                                             | Score | Organismo                                | pI    |      | MM (Da) |        |
|-----------------------------|-------------------|---------|---------------------|------------|-----------------------------------------------------------|-------|------------------------------------------|-------|------|---------|--------|
| Mais abundante no controle  |                   |         |                     |            |                                                           |       |                                          | Cal   | Obs  | Cal     | Obs    |
| 3                           | 0,175             | 0,01467 | Desenvolvimento     | B8AZX3     | Fator de replicação de DNA MCM6                           | 63    | <i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Indica</i> | 5,55  | 4,90 | 93.168  | 18.875 |
| 63                          | 0,377             | 0,01812 |                     | A2Y0T4     | Proteína ribossômica L10-2 60S                            | 66    | <i>O. sativa</i> subsp. <i>indica</i>    | 10,38 | 5,64 | 25.112  | 63.942 |
| 24                          | 0,562             | 0,01336 | Fotossíntese        | K4FC67     | Proteína intensificadora de reação com O <sub>2</sub> 1   | 53    | <i>Saccharum</i> hybrid cultivar         | 6,08  | 7,29 | 34949   | 39811  |
| 102                         | Excl.             | 0,04843 |                     | Q6ENP6     | Proteína Fe-S do centro de reação PS I                    | 85    | <i>Saccharum officinarum</i>             | 6,51  | 6,88 | 9.406   | 15.317 |
| 103                         | Excl.             | 0,00314 |                     | J9QE65     | RuBisCO subunidade menor                                  | 104   | <i>Saccharum</i> hybrid cultivar GT28    | 9,04  | 5,67 | 19.392  | 18.026 |
| 104                         | Excl.             | 0,00036 |                     | Q6ENW0     | Subunidade J da NADPH-quinona oxidoreductase              | 57    | <i>S. officinarum</i>                    | 6,04  | 6,83 | 18.771  | 18.229 |
| 108                         | Excl.             | 0,01901 |                     | P12329     | Proteína de ligação à clorofila a-b 1                     | 42    | <i>Zea mays</i>                          | 5,14  | 5,66 | 27.912  | 27.838 |
| 113                         | Excl.             | 0,01191 |                     | Q6ENV5     | RuBisCO subunidade maior                                  | 181   | <i>S. officinarum</i>                    | 6,96  | 7,14 | 58.817  | 57.293 |
| 114                         | Excl.             | 0,04056 |                     | Q6ENV5     | RuBisCO subunidade maior                                  | 169   | <i>S. officinarum</i>                    | 6,33  | 6,00 | 53.323  | 60.071 |
| 115                         | Excl.             | 0,00102 |                     | Q6ENV5     | RuBisCO subunidade maior                                  | 127   | <i>S. officinarum</i>                    | 6,33  | 7,54 | 53.323  | 59.974 |
| 124                         | Excl.             | 0,00001 |                     | Q9FS96     | C4 PEP-carboxilase                                        | 391   | <i>S. officinarum</i>                    | 5,91  | 6,50 | 108.942 | 96.579 |
| 141                         | Excl.             | 0,00090 |                     | A0A059PZZ1 | Fator de estabilidade/montagem PS II                      | 53    | <i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570    | 7,88  | 6,94 | 40.439  | 30.882 |
| 112                         | Excl.             | 0,03335 | Metabolismo/Energia | H9B8E3     | Gliceraldedo-3P desidrogenase                             | 56    | <i>Miscanthus sinensis</i>               | 5,46  | 6,91 | 33.903  | 41.439 |
| 105                         | Excl.             | 0,00140 | Resposta/Estresse   | Q9SZ77     | Proteína de transporte Sec1b                              | 65    | <i>Arabidopsis thaliana</i>              | 8,31  | 6,00 | 75.950  | 19.742 |
| 109                         | Excl.             | 0,00061 |                     | S4WDN5     | Ascorbato peroxidase                                      | 65    | <i>Saccharum.</i> hybrid cultivar        | 5,68  | 6,13 | 27.556  | 30.744 |
| Mais abundante no inoculado |                   |         |                     |            |                                                           |       |                                          |       |      |         |        |
| 76                          | Excl.             | 0,01099 | Desenvolvimento     | A0A059Q0K8 | Histona H3                                                | 61    | <i>Saccharum.</i> hybrid cultivar R570   | 11,15 | 9,63 | 15.455  | 17.301 |
| 52                          | 4,302             | 0,03673 | Fotossíntese        | Q6ENW6     | ATP sintase α                                             | 258   | <i>S. officinarum</i>                    | 5,87  | 6,17 | 55.774  | 55.445 |
| 58                          | 4,967             | 0,00988 |                     | Q43831     | Chaperonina de ligação à RuBisCO subunidade maior         | 93    | <i>Secale cereale</i>                    | 4,88  | 5,54 | 53.727  | 60.800 |
| 75                          | Excl.             | 0,00724 |                     | Q41048     | Proteína intensificadora de reação com O <sub>2</sub> 3-1 | 62    | <i>Zea mays</i>                          | 9,77  | 9,11 | 23.119  | 16.595 |
| 85                          | Excl.             | 0,00122 |                     | Q6ENW6     | ATP sintase α                                             | 123   | <i>S. officinarum</i>                    | 5,87  | 6,65 | 55.774  | 51.367 |

| Spot | Ratio<br>Lxx+Gd/C | ANOVA   | Categoria           | Acesso     | Protein names                                         | Score | Organismo                                      | pI   |      | MM (Da) |        |
|------|-------------------|---------|---------------------|------------|-------------------------------------------------------|-------|------------------------------------------------|------|------|---------|--------|
| 86   | Excl.             | 0,02078 |                     | K4FC67     | Proteína intensificadora de reação com O <sub>2</sub> | 71    | <i>Saccharum</i> hybrid cultivar               | 6,08 | 6,71 | 34.949  | 52.307 |
| 92   | Excl.             | 0,02298 |                     | Q8L6C3     | PEP-carboxilase                                       | 435   | <i>Saccharum spontaneum</i>                    | 5,91 | 6,36 | 108.942 | 88.850 |
| 38   | 2,355             | 0,00026 | Metabolismo/Energia | Q5MD11     | Glutamina sintetase                                   | 74    | <i>Saccharum officinarum</i>                   | 5,51 | 5,77 | 39.387  | 45.736 |
| 22   | 3,115             | 0,01571 | Resposta/Estresse   | A0A075TDY4 | Ascorbato peroxidase                                  | 71    | <i>Saccharum</i> hybrid cultivar Yacheng05-179 | 6,32 | 6,28 | 80.690  | 36.580 |
| 77   | Excl.             | 0,03110 |                     | -          | Resposta a estresse 1                                 | 62    | <i>Arabidopsis thaliana</i>                    | 6,85 | 5,31 | 17.613  | 27.797 |
| 79   | Excl.             | 0,00374 |                     | S4WDN5     | Ascorbato peroxidase                                  | 60    | <i>Saccharum</i> hybrid cultivar GT28          | 5,68 | 5,95 | 27.556  | 29.824 |

<sup>1</sup>Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase; Excl.: exclusivo, ou detectado apenas no tratamento com maior abundância; \*Anotação presumível comum a diferentes proteínas de ambos os tratamentos.

Foi observada a identificação significativa de quatro proteínas selecionadas como diferenciais com acessos de Lxx e de Gd (Tabela 6), especificamente das estirpes utilizadas neste trabalho.

**Tabela 6.** Anotação presumível das DEPs de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* ou *Gluconacetobacter diazotrophicus*, conforme maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) encontrada através do programa Mascot. *Ratio* refere-se à razão de variação entre as %vol do *spot* no tratamento inoculado (Lxx+Gd) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol do *spot* entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada *spot* são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE.

| Spot                        | Ratio<br>Lxx+Gd/C | ANOVA  | Score | Acesso | Protein names                       | Organism                                                                         | pI    |      | MM (Da) |        |
|-----------------------------|-------------------|--------|-------|--------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------|------|---------|--------|
| Mais abundante no controle  |                   |        |       |        |                                     |                                                                                  | Calc. | Obs. | Calc.   | Obs.   |
| 139                         | Excl.             | 0,0128 | 49    | A9H587 | Proteína desconhecida               | <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i><br>(strain ATCC 49037 / DSM 5601 / PAI5) | 6,96  | 6,24 | 22.336  | 50.907 |
| Mais abundante no inoculado |                   |        |       |        |                                     |                                                                                  |       |      |         |        |
| 71                          | Excl.             | 0,0292 | 62    | A9H549 | Succinato-semialdeído desidrogenase | <i>G. diazotrophicus</i> (strain ATCC 49037 /<br>DSM 5601 / PAI5)                | 6,14  | 5,88 | 101.855 | 88.521 |
| 78                          | Excl.             | 0,0052 | 47    | Q6AF54 | Proteína ribossômica S1 30S         | <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (strain<br>CTCB07)                      | 4.70  | 6,77 | 52.819  | 29.520 |
| 83                          | Excl.             | 0,0363 | 57    | Q6AC29 | Proteína desconhecida               | <i>L. xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (strain CTCB07)                                | 9,68  | 5,81 | 22.073  | 44.017 |

Excl.: exclusivo, ou detectado apenas no respectivo tratamento.

Dentre as duas DEPs presumivelmente identificadas como codificadas por genes de Gd, uma mostrou maior acúmulo no tratamento não inoculado, enquanto outra teve maior acúmulo no tratamento inoculado. As duas DEPs presumivelmente identificadas como codificadas por genes de Lxx mostraram maior acúmulo no tratamento inoculado. As seis DEPs/spots que não puderam ser significativamente identificadas são apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7.** Tabela descritiva das DEPs sem anotação presumível ou similaridade encontrada por identificação via PMF/MS/MS/Mascot. Ratio refere-se à razão de variação entre as %vol do spot no tratamento inoculado (Lxx+Gd) e no tratamento não inoculado (C). ANOVA refere-se ao valor p calculado para significância estatística da diferença na %vol do spot entre os tratamentos, sendo significativa se  $p \leq 0,05$ . Para cada spot são apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) observados na 2D-PAGE.

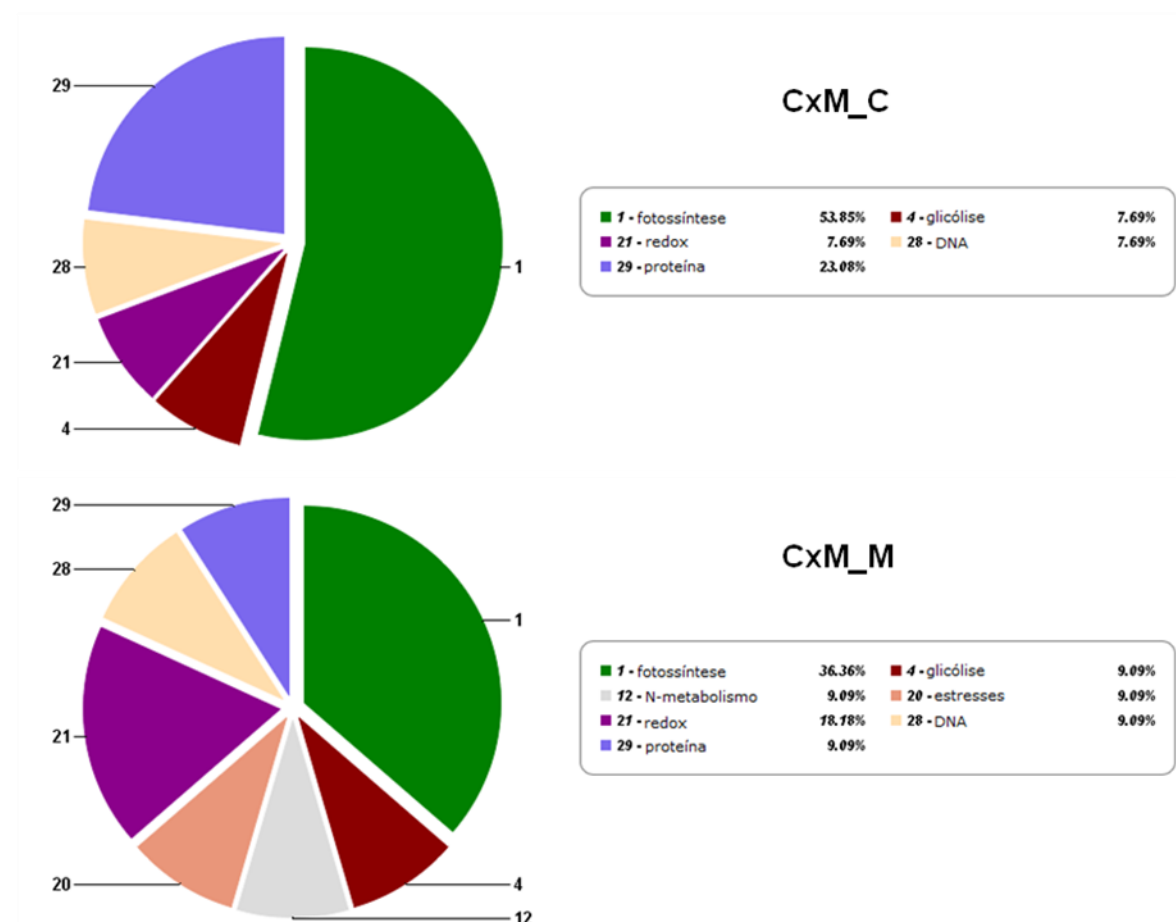
| Match ID                           | Ratio Lxx+Gd:C | ANOVA    | pIobs | Mobs (Da) |
|------------------------------------|----------------|----------|-------|-----------|
| <b>Mais abundante no controle</b>  |                |          |       |           |
| 106                                | Excl.          | 0,00136  | 5,65  | 24.080    |
| 107                                | Excl.          | 0,00218  | 6,01  | 24.034    |
| 110                                | Excl.          | 1.19E-07 | 5,57  | 31.755    |
| 121                                | Excl.          | 0,02574  | 6,04  | 89.354    |
| 140                                | Excl.          | 0,00730  | 6,99  | 30.666    |
| <b>Mais abundante no inoculado</b> |                |          |       |           |
| 61                                 | 1.89           | 0,01707  | 5,34  | 61.997    |

Excl.: exclusivo, ou detectado apenas no respectivo tratamento.

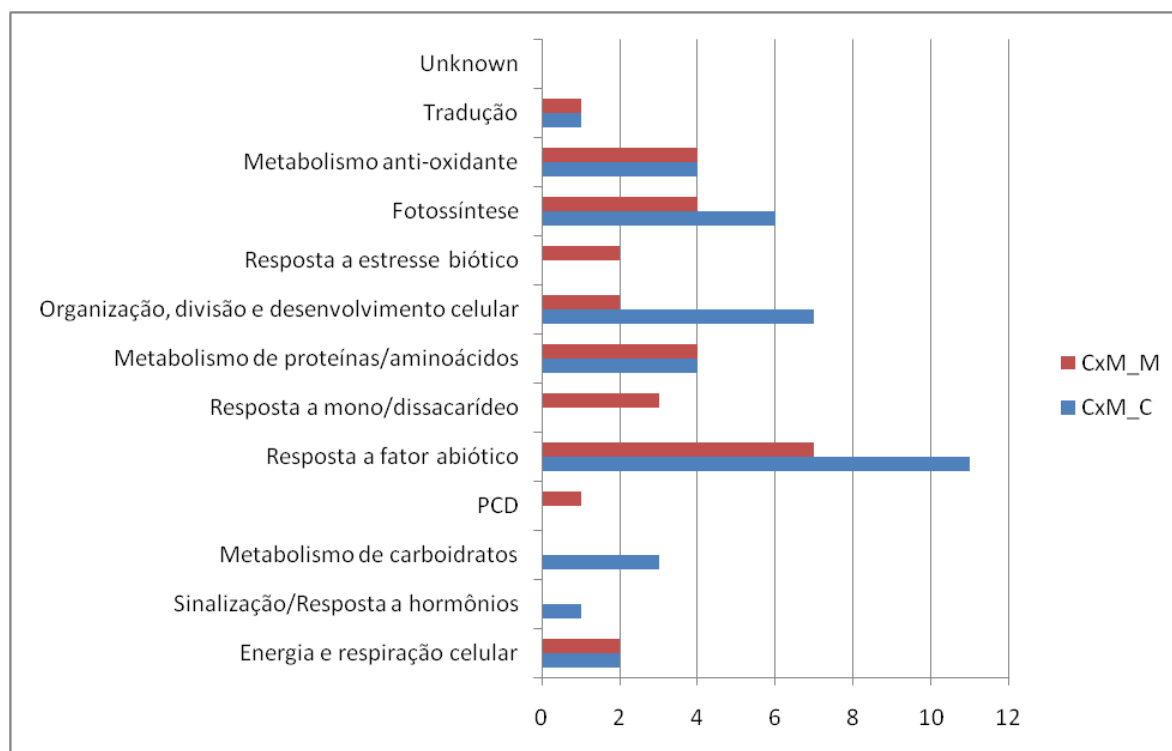
### 6.3.7.2 Ontologia gênica (GO) e enriquecimento de termos GO

No mapeamento dos acessos UniProt identificadores das proteínas similares às DEPs de cana-de-açúcar junto ao banco de dados de *Arabidopsis thaliana*, para viabilizar a análise de ontologia gênica no programa Mercator, foi verificada associação significativa para 13 das 15 (87%) DEPs mais acumuladas no tratamento controle, e para 11 das 11 (100%) DEPs mais acumuladas no tratamento inoculado com Lxx+Gd.

A distribuição e frequência obtidas de termos de GO para processos biológicos referentes aos tratamentos são apresentadas na Figura 8, na qual são destacados os setores correspondentes a cada categoria na classificação utilizada em *A. thaliana*, modelo para organismos vegetais. Esta distribuição foi também utilizada para comparação quantitativa (Figura 9, embora não significativa estatisticamente) e identificação dos processos biológicos mais variáveis entre os tratamentos controle (plantas não inoculadas com Lxx+Gd) e plantas inoculadas com Lxx+Gd, considerando os conjuntos de DEPs.



**Figura 8.** Categorização da ontologia gênica das DEPs de cana-de-açúcar expressas sob inoculação com as bactérias Lxx+Gd (M) e não inoculado (C). CxM\_C (controle x Lxx+Gd plantas controle), CxM\_M (controle x Lxx+Gd plantas inoculadas). Os números ligados aos setores do gráfico são identificadores das categorias raiz de processo biológico, também representados nos respectivos quadros; nestes, é indicada a frequência (%) de cada processo biológico conforme o número de termos de GO encontrados para cada conjunto de DEPs, de cada tratamento.



**Figura 9.** Distribuição dos DEPs de acordo com as categorias funcionais de cana-de-açúcar expressos sob inoculação com as bactérias Lxx+Gd (M) e não inoculado (C).

As DEPs de cana-de-açúcar selecionadas de cada tratamento e mapeadas nas respectivas proteínas ortólogas de *Arabidopsis thaliana* também foram analisadas quanto ao enriquecimento de termos de GO no programa Panther. A frequência dos termos GO associados às DEPs do tratamento inoculado com Lxx e Gd (DEPs-M) foram comparadas à frequência dos mesmos termos GO associados às DEPs do tratamento não inoculado (DEPs-C), e também em relação à frequência destes termos no proteoma de referência obtido a partir do genoma de *A. thaliana*. Nesta análise, apenas uma categoria de termos GO, ou processos biológicos, mostrou-se significativamente variável entre os tratamentos (Tabela 8) e, ainda, apenas quando a comparação foi entre termos de DEPs-M e do proteoma de referência.

**Tabela 8.** Teste de super-representação no enriquecimento de termos de ontologia gênica para processo biológico via ortologia com *A. thaliana*, com uso do programa Panther.

| Base de Dados GO / Referência        | # REF | Expect | #DEPs-M | P-value |
|--------------------------------------|-------|--------|---------|---------|
| <i>Processo biológico completo</i>   |       |        |         |         |
| <b>Proteoma <i>A. thaliana</i></b>   |       |        |         |         |
| resposta à alta intensidade luminosa | 147   | 0,06   | 3       | 0,04882 |
| <b>REF: DEPs-C</b>                   | -     | 3,38   | 6       | ns      |
| <i>Processo biológico Slim</i>       |       |        |         |         |
| <b>Proteoma <i>A. thaliana</i></b>   |       |        |         |         |
|                                      | -     | 6,88   | 5       | ns      |
| <b>REF: DEPs-C</b>                   | -     | 5,92   | 5       | ns      |

ns: não-significativo.

## 6.4 DISCUSSÃO

### 2D-PAGE e MS

A análise dos arquivos de imagem digitalizados obtidos após eletroforese bidimensional das amostras de cada tratamento demonstrou baixa variação experimental entre as réplicas do mesmo tratamento, o que favoreceu a confiabilidade dos resultados. As amostragens do proteoma nos tratamentos foram consideravelmente próximas (159 e 162 *spots*/gel), e a normalização realizada pelo programa Image Master permitiu a comparação. Do total de proteínas distintas detectadas (142) na comparação entre os tratamentos, observou-se que foram obtidas quantidades diferentes de *spots* exclusivos de cada tratamento (40 e 27), assim como de *spots* comuns significativamente variáveis mais abundantes em cada tratamento (4 e 6).

Do total representando proteínas distintas, 36 *spots* ou 25,3% foram considerados DEPs e submetidos à identificação via MS, constituindo a fração do proteoma analisado que se mostrou diferencial entre os tratamentos com ou sem inoculação com Lxx+Gd, em metodologia 2D-PAGE que favorece significativamente a detecção de proteínas e peptídeos mais abundantes na

amostra biológica (produtos de genes mais expressos). Este quadro sugere que a maior concentração do endofítico (4,5x) juntamente com a menor concentração do patógeno Lxx (2,5x) alterou significativamente o proteoma foliar de cana-de-açúcar, principalmente a fração do proteoma foliar composta por produtos de genes com maior intensidade de expressão. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo proteômico de cana-de-açúcar infectada simultaneamente com Lxx e Gd,

Todas as 36 DEPs resultaram em espectros de massa adequados para análise de identificação presumível, e a eficiência de anotação foi 83,3%, permitindo inferir possíveis aspectos funcionais e interações entre o proteoma diferencial e os processos fisiológicos e metabólicos. As DEPs ainda sem identificação estão sendo submetidas ao sequenciamento *de novo* (dados não apresentados), para completar o perfil proteômico diferencial obtido.

#### *Identificação presumível e anotação das DEPs*

O fluxograma de análise para identificação e definição do organismo de origem mais provável das DEPs (Figura 2) permitiu discriminar as proteínas diferenciais de cana-de-açúcar, de Lxx e de Gd potencialmente envolvidas na interação entre este hospedeiro, o fitopatógeno e o endofítico simbiote. Conforme esperado, a maior parte (quase 3/4) das DEPs foi identificada como sendo produzida pelo hospedeiro vegetal, enquanto cerca de 5% foi atribuída ao patógeno Lxx e 5% foi atribuída ao simbiote. Aproximadamente 1/6 não teve identificação significativa (Tabela 4).

Metade das DEPs foi anotada especificamente como proteína do complexo *Saccharum*, reforçando a identificação apesar de o banco de dados de cana-de-açúcar utilizado ter apenas 7.062 sequências de proteínas e o banco de dados

Viridiplantae ter 515.203 sequências de proteínas. As demais DEPs de cana-de-açúcar mostraram-se similares a proteínas de outras espécies vegetais, notadamente gramíneas (2/3 do total de DEPs). Das quatro DEPs anotadas como proteína de bactérias, duas foram associadas especificamente à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e duas foram associadas à *Gluconacetobacter diazotrophicus*, das mesmas estirpes utilizadas na inoculação das plantas, também validando a identificação.

#### *DEPs da planta hospedeira*

Com base na identificação das DEPs de cana-de-açúcar (Tabela 5) mais abundantes em cada tratamento contrastante para cargas bacterianas com Lxx e Gd, as mesmas foram agrupadas a seguir por categoria principal de ontologia gênica por processo biológico, conforme base de dados UniProt.

Fotossíntese. Nas plantas controle foram encontradas como DEP proteínas principais do esquema Z dos tilacoides proteína Fe-S do centro de reação PS I (Q6ENP6), proteína intensificadora de reação com O<sub>2</sub> (K4FC67) integrante do complexo de fotólise da água no PS II. Quanto da fixação de CO<sub>2</sub>, RuBisCO subunidade menor (J9QE65) e RuBisCO subunidade maior (três spots da subunidade maior, Q6ENV5); forma de PEP-carboxilase específica de plantas C4 (Q9FS96), subunidade J da NADPH-quinona oxidoreductase Q6ENW0; Proteína de ligação à clorofila a-b 1 (P12329); Fator de estabilidade/montagem PS II (A0A059PZZ1). Nas plantas infectadas as proteínas mais abundantes encontradas foram: ATP sintase  $\alpha$  (dois spots Q6ENW6); Chaperonina de ligação à RuBisCO subunidade maior (Q43831); Proteína intensificadora de reação com O<sub>2</sub> 3-1

(Q41048); Proteína intensificadora de reação com O<sub>2</sub> (K4FC67); PEP-carboxilase (Q8L6C3).

Metabolismo/Energia. A Gliceraldeído-3-P desidrogenase (GAPDH - H9B8E3) foi identificada apenas em plantas controle (não inoculado). Este quadro indica que Gd pode interferir na regulação de quais GAPDHs são mais produzidas e mais ativas no metabolismo de carboidratos, provavelmente mais adequadas para maior crescimento da planta quando em simbiose de FBN. Nas plantas com maior carga de Lxx e Gd, a enzima Glutamina sintetase (Q5MD11) foi mais abundante responsável pelo transporte do Nitrogênio. As alterações no hospedeiro em resposta a diferentes cenários patogênicos parecem funcionar de maneiras opostas, quer seja apoiando a estratégia de defesa em curso para finalmente moldar uma resposta eficiente à resistência ou sendo explorada pelo patógeno para promover e facilitar a infecção (Seifi *et al.*, 2013).

Desenvolvimento. A proteína Fator de replicação de DNA MCM6 (B8AZX3) foi mais abundante em plantas não inoculadas (controle), provável componente do complexo MCM2-7 (complexo MCM) que pode funcionar como uma helicase de DNA e que é essencial para sofrer uma única volta de iniciação de replicação e alongamento por ciclo celular em células eucariotas. Outra proteína abundante do controle foi a Proteína ribossômica L10-2 60S (A2Y0T4) componente da subunidade do ribossoma. Nas plantas inoculadas com as bactérias a proteína Histona H3 (A0A059Q0K8) foi aumentada, sugerindo como defesa da planta, contribuindo para uma maior resistência a um patógeno bacteriano biotrófico (Yang *et al.*, 2015).

Resposta/Estresse. Foi identificada apenas nas plantas não inoculadas, a Proteína de transporte Sec1b (Q9SZ77) é a constituinte principal do sistema de secreção Sec. Este sistema está envolvido na translocação de proteínas através da membrana citoplasmática e na inserção de proteínas integrais de membrana (Fekkes e Driessen, 1999). Nas plantas controle foi observada maior abundância de enzimas do metabolismo antioxidante, também ligadas a mecanismos de defesa contra patógenos através do aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS, principalmente  $H_2O_2$ ) e sua exportação para a matriz extracelular, uma barreira de defesa importante (Swaroop Rani e Podile, 2014) Proteína Ascorbato peroxidase (S4WDN5). Nas plantas inoculadas com Gd e Lxx, a maior abundância de ascorbato peroxidase (A0A075TDY4) e ascorbato peroxidase (S4WDN5) indica uma maior atividade antioxidante. Elas são enzimas importantes na resposta de defesa de plantas. A Proteína de Resposta a estresse 1 teve maior abundância nas plantas inoculadas devido ao estímulo das bactérias. Essas proteínas desempenham papel importante na manutenção de funções de proteínas e estruturas de proteínas, impedindo a acumulação de proteínas indesejadas e redobramento de proteínas desnaturadas durante o estresse estimulado (Fang *et al.*, 2015).

#### *DEPs do simbiote mais patossistema*

Conforme apresentado na Tabela 6, foram identificados *spots* com variação significativa no acúmulo e anotação presumível para codificação pelo patógeno Lxx e pelo simbiote Gd. A detecção de proteínas diferenciais das bactérias inoculadas era esperada devido ao contraste dos tratamentos no experimento, e pelo fato de o tratamento térmico dos propágulos de cana-de-açúcar não eliminar totalmente sua

microbiota original. Das duas DEPs de Gd, uma (proteína de função desconhecida, A9H587) foi detectada no tratamento controle, onde a abundância de células de Gd foi 4,5 vezes menor que no tratamento inoculado, no qual Gd expressou significativamente mais a enzima succinato-semialdeído desidrogenase (A9H549). Esta enzima integra o metabolismo do ácido  $\gamma$ -aminobutírico, e a ausência de sua atividade pode aumentar a suscetibilidade a ROS, reduzir o crescimento e também a patogenicidade de fitopatógenos, a exemplo do fungo *Stagonospora nodorum* em trigo (Mead *et al.*, 2013). É provável que Gd também dependa da via do ácido  $\gamma$ -aminobutírico para sua manutenção em cana-de-açúcar.

Já Lxx acumulou DEPs apenas no tratamento inoculado com ambas as bactérias, e onde foi detectada carga de Lxx 2,5 vezes menor do que no tratamento controle. Uma das DEPs de Lxx não tem função conhecida (Q6AF54), já a outra foi similar à proteína ribossômica S1 30S, envolvida na tradução.

#### *DEPs não identificados*

As seis DEPs/spots sem similaridade nos bancos de dados acessados estão em identificação via MS, uma vez que constituem conjunto de proteínas significativamente variáveis em resposta à inoculação e colonização de cana-de-açúcar com Lxx.

#### *Ontologia gênica (GO)*

A categorização associada a processo biológico permitiu observar que após inoculação com Lxx+Gd a planta reduziu fotossíntese de 53,8% do total de ontologias para 36,4%, assim como reduziu em 60% a frequência das atividades do metabolismo de proteínas (Figura 9). A inoculação com Lxx+Gd também parece ter levado ao aumento significativo de ontologias ligadas ao metabolismo de nitrogênio

(7 para 18%), respostas a estresse (0 para 9%) e metabolismo redox (0 para 9%). Com a maior presença de Gd simultânea à menor presença de Lxx, praticamente não houve alteração na frequência das ontologias ligadas à glicólise, sugerindo que na competição entre Gd e Lxx, a produção catabólica de energia pelo hospedeiro não está induzida.

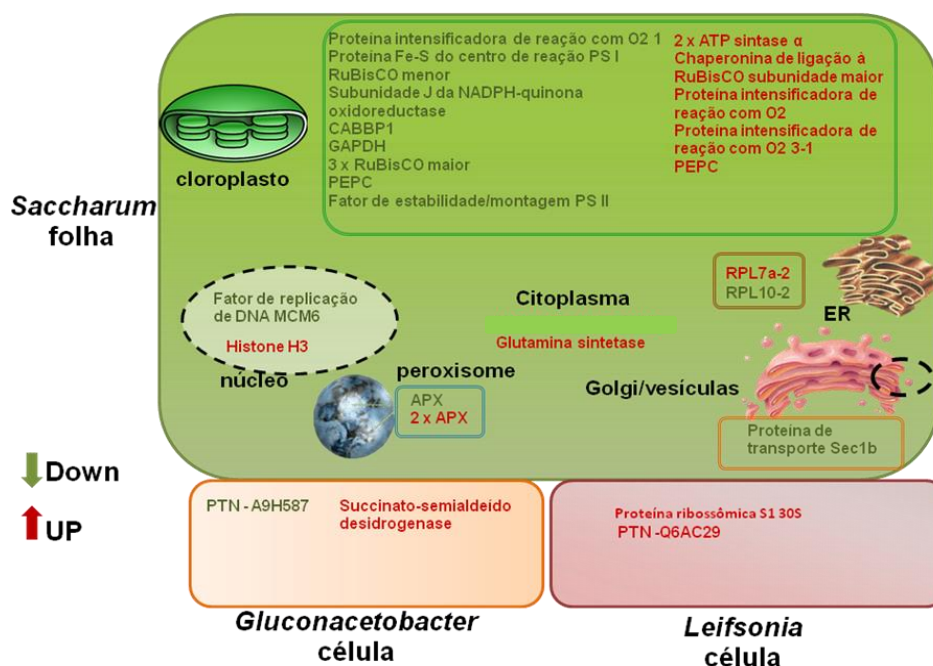
Com a análise quantitativa (não estatística) apresentada na Figura 10 foi possível verificar objetivamente, conforme nomenclatura padronizada de GO para plantas e em relação ao controle, que nas plantas inoculadas com Lxx+Gd houve redução das ontologias associadas à fotossíntese, divisão celular, resposta a fatores abióticos, metabolismo de carboidratos e sinalização. Por outro lado, nas plantas inoculadas com Lxx foi verificado aumento na quantidade de ontologias associadas à resposta a estresse biótico (como esperado), resposta a mono/dissacarídeos e à PCD. Este quadro indica alteração no proteoma e, por consequência, da fisiologia da planta hospedeira em resposta à presença simultânea de Lxx e Gd.

Com base nos resultados obtidos com o teste de super-representação/enriquecimento de termos de ontologia gênica para processo biológico, via ortologia com *A. thaliana* (Tabela 8), foi detectada na comparação entre o proteoma diferencial mais abundante nas plantas inoculadas com Lxx+Gd e o proteoma de referência apenas uma categoria de processo biológico significativamente diferente, na base de dados GO completa: resposta à alta intensidade luminosa. Estes resultados indicam que, significativamente, o proteoma foliar de cana-de-açúcar responde diferencialmente à inoculação conjunta do endofítico Gd (promotor de crescimento) e do fitopatógeno Lxx (inibidor do

crescimento) em relação a proteínas de ajuste fotossintético e resposta ao estresse por luminosidade.

*Modelo esquemático do mecanismo em resposta à inoculação com Lxx/Gd*

Com base nos resultados encontrados foi possível traçar modelo esquemático de resposta na interação planta patógeno/simbionte (Figura 10). Conforme visto, as proteínas envolvidas com metabolismo de carboidratos, fotossíntese e energia foram mais abundantes nas plantas não inoculadas indicando que essas parecem ativar sinalização molecular e celular para a manutenção do crescimento. Uma Chaperonina de ligação à Rubisco subunidade maior (Q43831) foi mais abundante nas plantas inoculadas resultando resposta a inoculação das duas bactérias sugerindo estresse biótico. A enzima Glutamina sintetase (Q5MD11) foi mais abundante nas plantas inoculadas, essa enzima está associada na assimilação de amônio obtido a partir de redução de nitrato. Também nas plantas inoculadas foram mais abundantes ascorbato peroxidase (S4WDN5) outra ascorbato peroxidase (A0A075TDY4) e uma proteína de choque térmico classe I 17.6 kDa – HSP17.6A (Q9XIE3) indicando que a planta estava sofrendo estresse biótico. Maior atividade antioxidante e uma proteína pertencente à classe das chaperonas que desempenham papel importante na manutenção de funções de proteínas e estruturas de proteínas. É um ponto interessante, só em plantas controle e quando a cana-de-açúcar foi inoculada com dois micro-organismos um patógeno e ou simbiote, foi identificada a proteína de transporte Sec 1b sugerindo um processo de defesa da planta. As alterações no hospedeiro parecem funcionar de duas maneiras opostas, quer apoiando a estratégia de defesa em curso para finalmente moldar uma resposta eficiente a resistência ou sendo explorada pelo patógeno para promover e facilitar a infecção.



**Figura 10.** Modelo Esquemático dos processos de regulação protéica foliar em plantas de cana-de-açúcar associados à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Gd). Proteínas em verde mais abundante nas plantas controle e proteínas em vermelho mais abundante nas plantas inoculadas Lxx/Gd.

## 6.5 CONCLUSÃO

Na cana-de-açúcar, quando inoculada com ambas as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, foi detectada resposta ao estresse biótico e de defesa;

O perfil proteico observado após inoculação mista, foi diferente da resposta quando a cana-de-açúcar foi só inoculada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e ou *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

## 6.6 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado por subsídios e bolsas de estudo da CAPES / REUNI e Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq). Os autores agradecem ao Prof. Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo (ESALQ/USP) pelo fornecimento da cepa CTC

B07 de *Leifsonia xyli* subsp *xyli* ao Prof. Dr. Antônio Vargas de Oliveira Figueira (CENA/USP) pelo fornecimento da cepa BR 11281 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Ao senhor Emanuel Sérgio Coqueiro do Santos pelo auxílio financeiro ao projeto (BIOGENE) e ao Prof. Dr. Fábio César Gozzo pela disponibilização dos bancos de dados.

## 6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo JL, Araujo WL and Marcheroni Jr W (2000) Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: Melo IS and Azevedo JL (eds) Controle biológico. Embrapa- Meio Ambiente, pp 57-93.
- Baldani JI, Oliveira ALM, Guimarães SL, Baldani VLD, Reis Jr FB, Silva LG, Reis VM, Teixeira KRS and Döbereiner J (2000) Biological Nitrogen Fixation (BNF) in non-leguminous plants: the Role of Endophytic Diazotrophs. *Curr Plant Sci Biotechnol Agric* 38:397-400.
- Boaretto LF (2012) Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose. Doutorado (Ciências) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 177p.
- Bolton MD (2009) Primary metabolism and plant defense--fuel for the fire. *Mol Plant Microbe Interact* 22:487-97.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:48–254.
- Canuto EL, Salles JF, Oliveira ALM, Perin L, Reis VM and Baldani JI (2003) Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. *Agronomia* 37:67-72.
- Canuto EL (2008) Metodologias de inoculação e prospecção de compostos secretados por bactérias diazotróficas endofíticas na promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.
- Carvalho G (2012) Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba.
- Cavalcante VA and Döbereiner J (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23-31.

- Colson ES and Deverall BJ (1996) Helping Plants Fight Their Own Disease Battles. *Australian CottonGrowers* 17:76-80.
- De Wit PJ (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci* 64:2726-2732.
- Diz AP, Truebano M, Skibinski DO (2009) The consequences of sample pooling in proteomics: an empirical study. *Electrophoresis*. 30(17):2967-75.
- Dos Santos MF, Muniz de Pádua VL, de Matos Nogueira E, Hemerly AS and Domont GB (2010) Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *J Proteomics* 73:917-931.
- Doyle JJ and Doyle JL (1991) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1:13-15.
- Evtushenko LI, Dorofeeva LV, Subbotin SA, Cole JR and Tiedje JM (2000) *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. *Int J Sys Evol Microbiol* 50:371-380.
- Fang X, Chen J, Dai L, Ma H, Zhang H, Yang J, Wang F and Yan C (2015) Proteomic dissection of plant responses to various pathogens. *Proteomics* 15(9):1525-43.
- Fekkes P and Driessen AJ (1999) Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:161-73.
- Fegan M, Croft BJ, Teakle DS, Hayward AC and Smith GR (1998) 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 Pathol* 47:495-504.
- Franke-Whittle IH, O'Shea MG, Leonard GJ and Sly LI (2005) Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. *Microb Ecol* 50:128-139.
- Hurkman WJ and Tanaka CK (1986) Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis *Plant Physiol* 81:802-806.
- Lery LM, Hemerly AS, Nogueira EM, Von Krüger WM and Bisch PM (2011) Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *Mol Plant Microbe Interact* 24:562-576.
- Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay M and van der Lelie D (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21:583-606.
- Lohse M, Nagel A, Herter T, May P, Schroda M, Zrenner R, Tohge T, Fernie AR, Stitt M and Usadel B (2014). Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. *Plant Cell Environ* 37(5):1250-8.

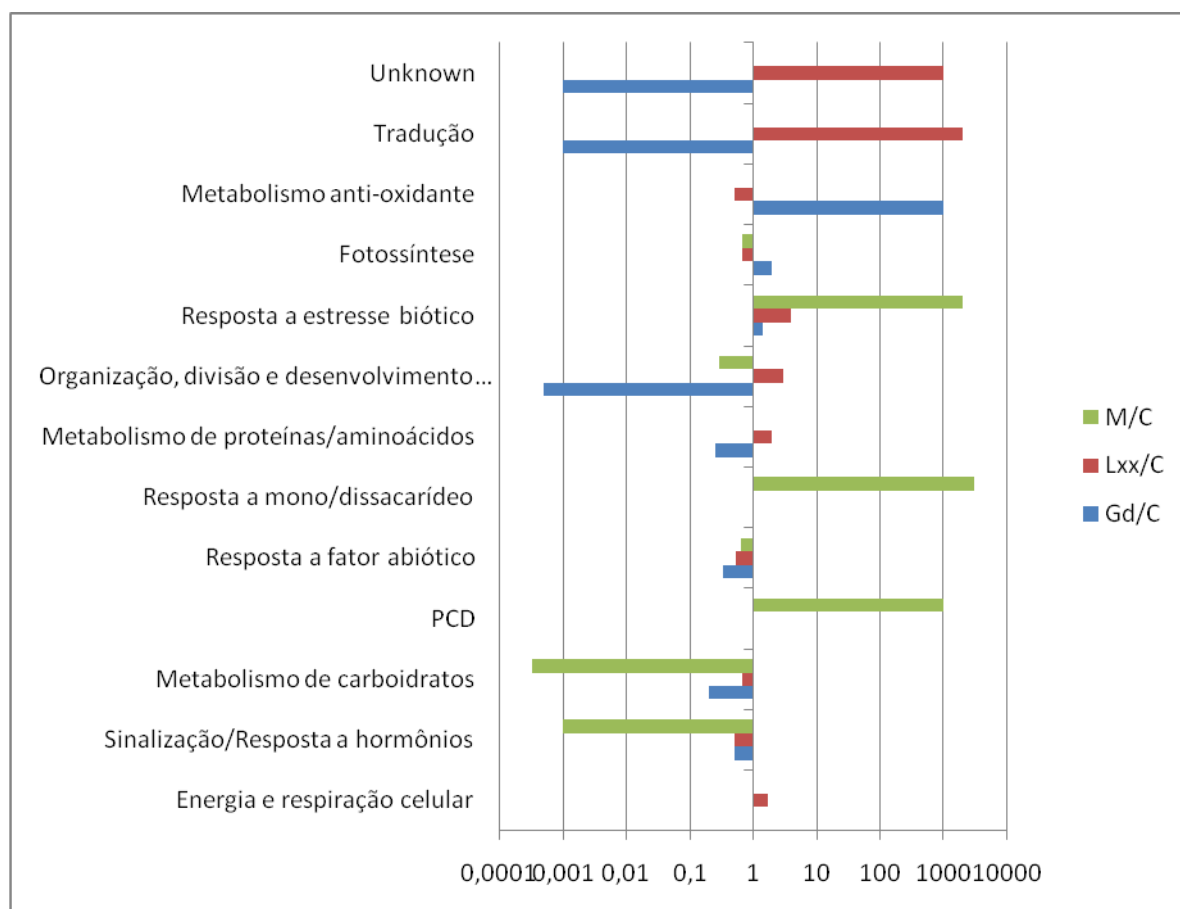
- Luvizotto DM (2008) Caracterização fisiológica e molecular de Burkholderia sp. associadas às raízes de cana-de-açúcar. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba.
- Marafon AC (2012) Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimentoprático. Embrapa Tabuleiros Costeiros 29 p.
- Mead O, Thynne E, Winterberg B and Solomon PS (2013) Characterising the role of GABA and its metabolism in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. PLoS One 8(11):e78368.
- Menossi M, Silva-Filho MC, Vincentz M, Van-Sluys MA and Souza GM (2008) Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. Int J Plant Genomics 2008:458732.
- Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT and Thomas PD (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. Nature Protocols 8:1551-1566.
- Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Van Sluys MA, Kitajima JP, Truffi D, do Amaral AM, Harakava R, de Oliveira JC, Wood D, de Oliveira MC *et al.* (2004) The Genome Sequence of the Gram-Positive Sugarcane Pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Mol Plant Microbe Interact 17:827-836.
- Monteiro-Vitorello CB, Zerillo MM, Van Sluys MA and Camargo LEA (2009) Genome sequence – based insights into the biology of the sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* In: Robert W (ed) Plant Pathogenic Bacteria: genomics and molecular biology. Horizon Press, pp 135-146.
- Moreira FMS, Silva K, Nóbrega RSA and Carvalho F (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. Comunicata Scientiae 1:74-99.
- NovaCana.com, <http://www.novacana.com/cana/producao-cana-de-acucar-brasil-e-mundo>, acesso 12 de julho de 2015.
- Pacheco CM, Pestana-Calsa MC, Gozzo FC, Nogueira RJMC, Menossi M and Calsa T Jr (2013) Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. J Proteome Res 12:5681-95.
- Ponte EC, Silveira SF, Carneiro Jr JB and Lima RMP (2010) 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 phytopathol 36:4.
- Postel S and Kemmerling B (2009) Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. Semin Cell Dev Biol 20:1025-31.
- Rodrigues LD (2010) A cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de biocombustíveis: impactos ambientais e o zoneamento agroecológico como ferramenta para mitigação. 59 f. TCC (Especialização em Análise Ambiental) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- Rosa DD (2006) Uma abordagem genômica para o entendimento fastidioso de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. 79 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

- Rossetto R and Santiago AD (2007) Cana-de-açúcar: doenças. [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_55\\_711200516718.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_55_711200516718.html) (Jun 13, 2011).
- Seifi HS, Bockhaven JV, Angenon G and Höfte M (2013) Glutamate Metabolism in Plant Disease and Defense: Friend or Foe? *Mol Plant Microbe Interact* 5:475-485.
- Soto MJ, Domínguez-Ferreras A, Pérez-Mendoza D, Sanjuán J and Olivares J (2009) Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell Microbiol* 11:381-8.
- Souza ML (2001) Utilização de microrganismos na agricultura. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 21:28-31.
- Menossi M, Silva-Filho MC, Vincentz M, Van-Sluys MA and Souza GM (2008) Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. *Int J Plant Genomics* 2008:458732.
- Swaroop Rani T and Podile AR (2014) Extracellular matrix-associated proteome changes during non-host resistance in citrus-Xanthomonas interactions. *Physiol Plant* 150(4):565-79.
- Tokeshi H (1997) Doenças da cana-de-açúcar. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A and Camargo LEA (eds) *Manual de Fitopatologia Doenças das plantas cultivadas*. Agronômica Ceres, São Paulo, pp. 207-225.
- Urashima AS and Grachet NG (2012) 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* 37:1.
- Vallad GE and Goodman RM (2004) Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Sci* 44:1920-34.
- Van Dillewijn C and Waltham M (1952) *Botany of sugarcane*. New York: Chronica Botanica 371p.
- Waclawovsky AJ, Sato PM, Lembke CG, Moore PH and Souza GM (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. *Plant Biotechnol J* 8(3):263-76.
- Yang L, Li B, Zheng XY, Li J, Yang M, Dong X, He G, An C and Deng XW (2015) Salicylic acid biosynthesis is enhanced and contributes to increased biotrophic pathogen resistance in *Arabidopsis* hybrids. *Nat Commun* 6:7309.

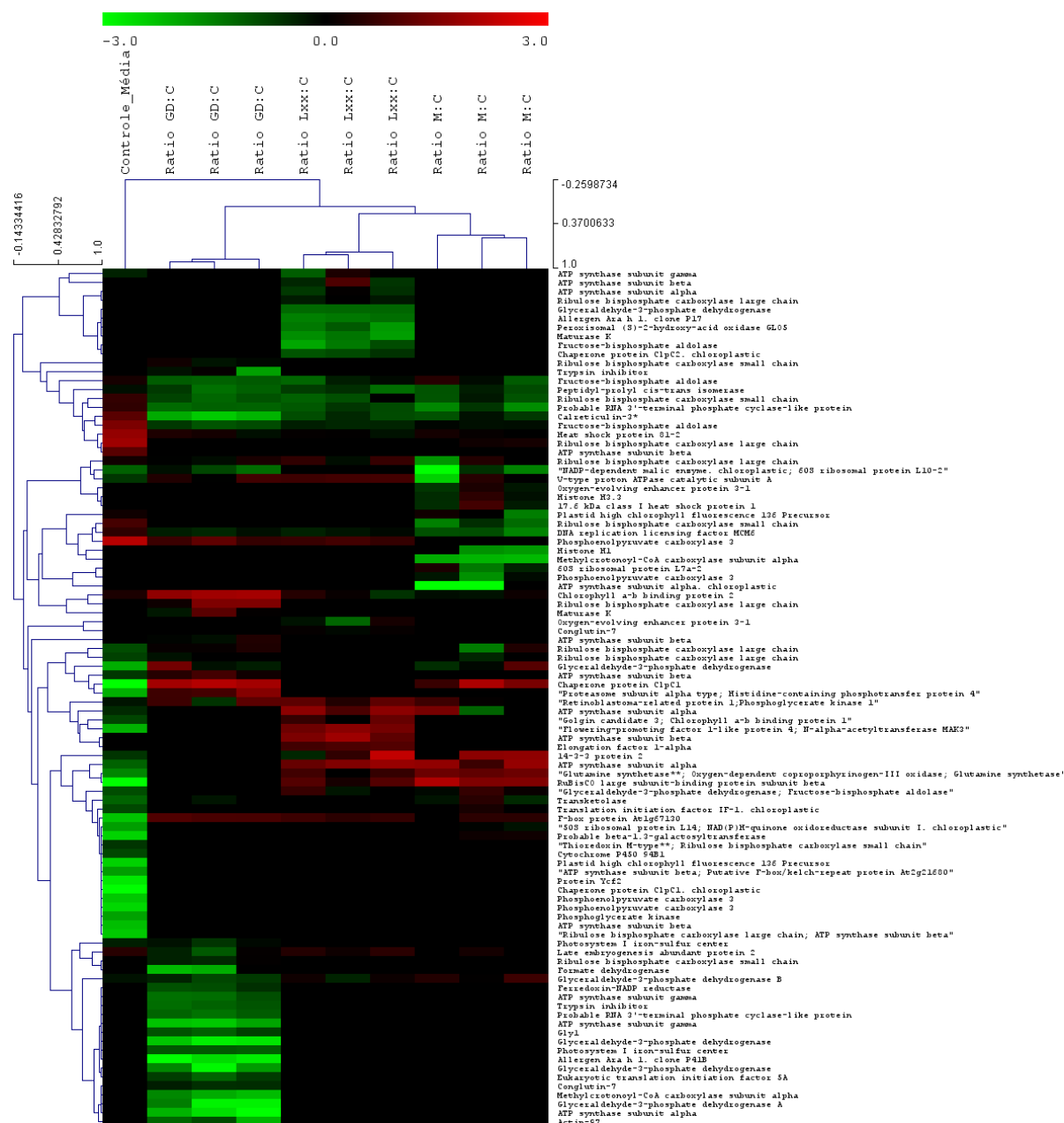
## 7. Discussão Geral

Foi possível identificar categorias funcionais de proteínas mais envolvidas com a interação isolada da cana-de-açúcar com a bactéria diazotrófica *G. diazotrophicus* (Gd), ou o patógeno *L. xyli* (Lxx), e com Gd e Lxx conjuntamente (Figura 1). A escala logarítmica indica a grande variação encontrada nas respostas da planta aos microrganismos inoculados. Gd e Lxx induzem diferentes respostas (antagônicas) em cana-de-açúcar, sendo observadas categorias de ontologia gênica relacionadas a tradução protéica, metabolismo antioxidante, fotossíntese, divisão celular, metabolismo de proteínas e aminoácidos. De forma geral, a presença de *G. diazotrophicus* induz o metabolismo anabólico em cana-de-açúcar, evidenciado pela maior expressão de proteínas relacionadas a fixação de carbono, divisão celular e tradução protéica. Tal efeito positivo é bem documentado em relação ao crescimento de cana-de-açúcar, considerando o caráter simbiote da bactéria, porém, o presente estudo é um dos pioneiros em registrar esse comportamento em relação ao proteoma foliar de cana-de-açúcar. Por outro lado, proteínas identificadas no tratamento misto indicam que a presença de *G. diazotrophicus* parece mitigar os efeitos deletérios de *L. xyli*, conferindo papel bioprotetor a Gd, quando associada a *S. officinarum*. No entanto, mais estudos são necessários para melhor elucidação desse evento biológico.

A análise de agrupamento mostrou que o tratamento misto teve o proteoma mais distinto em relação aos outros tratamentos (Figura 2). Este quadro indica alteração no proteoma e, por consequência, da fisiologia da planta hospedeira em resposta à presença simultânea de Lxx e Gd, indicando resposta a diferentes nos cenários patogênicos.



**Figura 1.** Distribuição dos DEPs de acordo com a razão entre a frequência das categorias de ontologia gênica de cana-de-açúcar expressos sob inoculação com as bactérias *Leifsonia xyli* subsp *xyli*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e Mista (Gd+Lxx) e a respectiva frequência no tratamento controle (não inoculado, C). Escala logarítmica indicando inibição (<1) ou indução (>1) relativas.



**Figura 2.** Heat Map do padrão de expressão das DEPs identificadas nos tratamentos em relação à abundância média no controle (não inoculado).

## 8. Conclusões Gerais

A identificação de várias proteínas de categorias funcionais e metabólicas distintas sugere relevância diferente entre as atividades moleculares e fisiológicas em folhas de cana-de-açúcar. As alterações proteicas observadas na maior concentração Gd sugerem maior acúmulo de componentes de fotossistemas;

As mudanças observadas no proteoma da planta indicam respostas metabólicas a presença de Lxx, conforme identificação de proteínas responsivas a estresses bióticos, defesa e metabolismo de carboidrato;

Na cana-de-açúcar, quando inoculada com ambas as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, há indução de respostas ao estresse biótico e de defesa. O perfil proteico observado foi diferente em resposta quando a cana-de-açúcar foi só inoculada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e ou *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*;

Variações detectadas no proteoma foliar de cana-de-açúcar em resposta a diferentes micro-organismos foram específicas, e sugerem alvos com elevado potencial de utilidade em estratégias de seleção, melhoramento genético e estudos moleculares nesta cultura para otimização da Fixação Biológica Nitrogênio e da resistência ao Raquitismo da Soqueira.

## 9. Referências Bibliográficas

- Amalraj VA and Balasundaram N. On the taxonomy of the members of 'Saccharum complex' (2006) *Genet Resour Crop Evol* 53:35- 41.
- Arencibia AD, Vinagre F, Estevez Y, Bernal A, Perez J, Cavalcanti J, Santana I and Hemerly AS (2006) *Gluconacetobacter diazotrophicus* elicits a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. *Plant Signal Behav* 5:265-73.
- Azevedo JL (1998) Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo IS and Azevedo JL (eds) *Ecologia Microbiana*. Embrapa- Meio Ambiente, pp 445-461.
- Azevedo JL, Araujo WL and Marcheroni Jr W (2000) Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: Melo IS and Azevedo JL (eds) *Controle biológico*. Embrapa- Meio Ambiente, pp 57-93.
- Baldani JI, Oliveira ALM, Guimarães SL, Baldani VLD, Reis Jr FB, Silva LG, Reis VM, Teixeira KRS and Döbereiner J (2000) Biological Nitrogen Fixation (BNF) in non-leguminous plants: the Role of Endophytic Diazotrophs. *Curr Plant Sci Biotechnol Agric* 38:397-400.
- Baginsky S (2009) Plant proteomics: Concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass Spectro Rev* 28:93-120.
- Bertalan M, Albano R, de Pádua V, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, Teixeira K, Schwab S, Araujo J, Oliveira A *et al.* (2009) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics* 10:450.
- Blanco Y, Blanch M, Piñón D, Legaz ME and Vicente C (2005) Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (Pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *J Biosci Bioeng* 99:366-71.
- Blanco Y, Legaz ME and Vicente C (2010) *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endophyte, inhibits xanthan production by sugarcane-invading *Xanthomonas albilineans*. *J Plant Interac* 5:4.
- Bolton MD (2009) Primary metabolism and plant defense--fuel for the fire. *Mol Plant Microbe Interact* 22:487-97.
- Bredemeier C and Mundstock CM (2000) Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural* 30:365-372.
- Brencic A and Winans SC (2005) Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:155-94.
- Brumbley SM, Petrasovits LA, Hermann SP, Young AJ and Croft BJ (2006) Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. *Austr Plant Pathol* 35:681-689.

- Büttner D (2012) Protein Export According to Schedule: Architecture, Assembly, and Regulation of Type III Secretion Systems from Plant- and Animal-Pathogenic Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(2): 262–310.
- Cardoso COM (1986) Isolamento da bactéria do raquitismo (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) no Brasil. *Boletim Técnico COPERSUCAR* 34:48-52.
- Carneiro Jr JB, Silveira SF and Ponte EC (2006) Sanidade e vigor de mudas de cana-de-açúcar infectadas por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e tratadas por termoterapia. *Fitopatol Bras* 31:183.
- Carneiro Jr JB, Silveira SF, Souza Filho GA, Olivares FL and Giglioti EA (2004) Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Fitopatol bras* 29:614-619.
- Carvalho G (2012) Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba.
- Cavalcante VA and Döbereiner J (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23-31.
- Chaves A, Cavalcante JFD, Ferreira GE, Pedrosa EMR and Araújo CFS (2002) Comportamento de variedades comerciais de cana-de-açúcar em relação ao raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) na região Nordeste do Brasil: avaliações em cana planta. In: Congresso Nacional da STAB, 8., 2002, Recife, PE. Anais... Recife: STAB, 2002. v. 1, p. 27.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B and Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. 124:803-14.
- Colson ES and Deverall BJ (2006) Helping plants fight their own battles. Department of crop sciences. The University of Sydney NSW.
- CONAB (2015) Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar: safra 2013/2014: quarto levantamento [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_04\\_10\\_09\\_19\\_04\\_boletim\\_de\\_cana.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_10_09_19_04_boletim_de_cana.pdf) (Feb 13, 2015).
- Cunha RB, Castro M and Fontes W (2006) Espectrometria de massa de proteínas. *Biotecnologia Ciência e desenvolvimento* 36:40-46.
- Daniels J and Roach BT (1987) Taxonomy and evolution. In: Heinz DJ (ed.) *Sugarcane improvement through breeding*. Amsterdam: Elsevier, pp 7-84.
- Davis MJ, Gillaspie Jr AG, Vidaver AK and Harris RW (1984) *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. *Int J Sys Bacteriol* 34:107-117.
- De Wit PJ (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell Mol Life Sci* 64:2726-2732.

- D'Haene B, Vandesompele J and Hellemans J (2010) Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods* 50:262-70.
- Dhingra V, Gupta M, Andacht T and Fu ZF (2005) New frontiers in proteomics research: a perspective. *Int J Pharm* 299:1-18.
- Dias VD (2012) Otimização da detecção de raquitismo da soqueira e escaldadura das folhas em cana-de-açúcar utilizando PCR. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Goiás. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos.
- Dong Z, Canny MJ, McCully ME, Roboredo MR, Cabadilla CF, Ortega E and Rodes R (1994) A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (a new role for the apoplast). *Plant Physiol* 105:1139-1147.
- Dos Santos MF, Muniz de Pádua VL, de Matos Nogueira E, Hemerly AS and Domont GB (2010) Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *J Proteomics* 73:917-931.
- Evtushenko LI, Dorofeeva LV, Subbotin SA, Cole JR and Tiedje JM (2000) *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. *Int J Sys Evol Microbiol* 50:371-380.
- Luvizotto DM (2008) Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* sp. associadas às raízes de cana-de-açúcar. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. Piracicaba.
- FAO (2013) Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/> (Dec 14, 2013).
- FAOSTAT (2012) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Nov 15, 2012).
- FAPESP (2000) Caderno Ciências Achados preciosos ed 52. <http://revistapesquisa.fapesp.br/2000/04/01/achados-preciosos/> (Sep 24, 2012).
- Fuentes-Ramírez LE, Bustillos-Cristales R, Tapia-Hernández A, Jiménez-Salgado T, Nogueira ET, Martínez-Romero E and Caballero-Mellado J (2001) Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1305-14.
- Gao SJ, Pan YB, Chen RK, Chen PH, Zhang H and Xu LP (2008). Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. *Sugar Tech* 10:334-340.
- Gonzaga GBM (2012) Avaliação do crescimento inicial da cana-de-açúcar, variedade RB867515, sob o efeito de bactérias endofíticas. 53 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo.

- Görg A (2004) 2-D Electrophoresis: Principles and methods. Handbooks from GE HealthCare. 350 p.
- Grisham MP, Pan YB and Richard Jr EP (2007) Early Detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in Sugarcane Leaves by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Plant Dis* 91:430-34.
- Haapalainen M, Mattinen J and Metzler MC (2000) The growth of a plant-parasitic bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, is enhanced by xylem fluid components. *Physiol Mol Plant Pathol* 56:147-55.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF and Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbial* 43:895-914.
- Hayes CS, Aoki SK and Low DA (2010) Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet.* 44:71-90.
- Heath MC (1991) The role gene-for-gene interactions in the determination of host species specificity. *Phytopathology* 81:127-130.
- Hurek T and Reinhold-Hurek B (2003) *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J Biotechnol* 106:169-78.
- James EK, Reis VM, Olivares FL, Baldani JI, Döbereiner J (1994) Infection of sugar cane by nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J Exp Bot* 45:757-766.
- James EK, Olivares FL, de Oliveira AL, dos Reis FB Jr, da Silva LG and Reis VM (2001) Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J Exp Bot* 52:747-60.
- Kim J and Rees DC (1994) Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* 33:389-397.
- Lery LM, Hemerly AS, Nogueira EM, Von Krüger WM and Bisch PM (2011) Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. *Mol Plant Microbe Interact* 24:562-576.
- Liu JJ, Ekramoddoullah AKM and Yu X (2003) Differential expression of multiple PR10 proteins in western white pine following wounding, fungal infection and cold-hardening. *Physiol Plant* 119:544-553.
- Macedo IC (2007) A Energia da cana-de-açúcar: doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade. São Paulo: Berlinds and Vertecchia: UNICA, p. 232.
- Mahajan S and Tuteja N (2005) Cold salinity and drought stresses: an overview *Arch Biochem Biophys* 444:139-158.
- Marin FR (2007) Características: cana-de-açúcar. Agência de Informação da Embrapa, Brasília, [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_11\\_711200516716.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_11_711200516716.html) (May 23, 2011).
- Metzler MC, Laine MJ and De Boer SH (1997) The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. *FEMS Microbiol Lett* 150:1-8.

- Meyers BC, Kaushik S and Nandety RS (2005) Evolving disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* 8:129-34.
- Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H and Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:19613-8.
- Monteiro-Vitorello CB, Camargo LE, Van Sluys MA, Kitajima JP, Truffi D, do Amaral AM, Harakava R, de Oliveira JC, Wood D, de Oliveira MC *et al.* (2004) The Genome Sequence of the Gram-Positive Sugarcane Pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *Mol Plant Microbe Interact* 17:827-836.
- Monteiro-Vitorello CB, Zerillo MM, Van Sluys MA and Camargo LEA (2009) Genome sequence – based insights into the biology of the sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* In: Robert W (ed) *Plant Pathogenic Bacteria: genomics and molecular biology*. Horizon Press, pp 135-146.
- Moreira FMS, Silva K, Nóbrega RSA and Carvalho F (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae* 1:74-99.
- Newton RP, Brenton AG, Smith CJ and Dudley E (2004) Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry* 65:1449-1485.
- Nogueira FT, De Rosa VE Jr, Menossi M, Ulian EC and Arruda P (2003) RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiol* 132:1811-24.
- Ortega E, Rodes R, de la Fuente E and Fernández L (2001) Does the routine treatment of sugarcane stem pieces for xylem pathogen control affect the nitrogenase activity and N<sub>2</sub>-fixing endophyte in the cane. *Aust J Plant Physiol* 28:907-912.
- Pacheco CM, Pestana-Calsa MC, Gozzo FC, Nogueira RJMC, Menossi M, Calsa T Jr (2013) Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. *J Proteome Res* 12:5681-95.
- Pandey A and Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837-846.
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S and Van Wees SC (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5:308-16.
- Piñón D, Casas M, Blanch M, Fontaniella B, Blanco Y, Vicente C, Solas MT and Legaz ME (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Res Microbiol* 153:345-51.
- Polidoro JC, Resende AS, Quesada DM, Xavier RP, Coelho, CHM, Alves BJR, Boddey RM and Urquiaga S (2001) Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil. EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica, EMBRAPA Documentos, 144, p 8.
- Postel S and Kemmerling B (2009) Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Semin Cell Dev Biol* 20:1025-31.

- Reinhold-Hurek B and Hurek T (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol* 6:139-144.
- Ribeiro ILAC (2010) Proteômica de cana-de-açúcar em condição de estresse hídrico. 139 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
- Rocha TL, Costa PHA, Magalhães JCC, Evaristo RGS, Vasconcelos EAR, Coutinho MV, Paes NS, Silva MCM, Grossi-De-Sá MF (2005) Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. Comunicado Técnico 136, Embrapa.
- Rodrigues LD (2010) A cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de biocombustíveis: impactos ambientais e o zoneamento agroecológico como ferramenta para mitigação. 59 f. TCC (Especialização em Análise Ambiental) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- Rossetto R and Santiago AD (2007) Cana-de-açúcar: doenças. [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_55\\_711200516718.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_55_711200516718.html) (Jun 13, 2011).
- Rouws LF, Meneses CH, Guedes HV, Vidal MS, Baldani JI and Schwab S (2010) Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with gfp and gusA reporter genes. *Lett Appl Microbiol* 51:325-30.
- Sadygov RG, Cociorva D and Yates JR (2004) Large-scale database searching using tandem mass spectra: Looking up the answer in the back of the book. *Nat Methods* 1:195-202.
- Salvaudon L, Héraudet V and Shykoff JA (2005) Parasite-host fitness trade-offs change with parasite identity: genotype-specific interactions in a plant-pathogen system. *Evolution*. 59:2518-24.
- Santos LC (2008) Crescimento inicial de leguminosas forrageiras tropicais inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio. 52 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.
- Saravanan VS, Madhaiyan M, Osborne J, Thangaraju M and Sa TM (2008) Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. *Microb Ecol* 55:130-140.
- Soto MJ, Domínguez-Ferreras A, Pérez-Mendoza D, Sanjuán J and Olivares J (2009) Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell Microbiol* 11:381-8.
- Souza MV, Fonte W, Ricart CAO (1999) Análise de proteomas: O despertar da Era Pós Genômica *Biotecnologia Ciênc Desenvolv* 2:12-14.
- Stephan MP, Oliveira M, Teixeira KRS, Martinez-Drets G and Döbereiner J (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett* 77:67-72.
- Tejera NA, Ortega E, González-López J and Lluch C (2003) Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J Appl Microbiol* 95:528-535.

- Telles MR, Saran LM and Unêda-Trevisolli SH (2011) Produção, propriedades e aplicações de bioplástico obtido a partir da cana-de-açúcar. *Cienc & Tec* 2:52-63.
- Tseng TT, Tyler BM and Setubal JC (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* 19:9.
- Tokeshi H and Rago A (2005) Doenças da cana-de-açúcar. In: Kimati H, Amorim L.; Rezende JAM, Bergamin Filho A and Camargo LEA (eds) *Manual de Fitopatologia Doenças das plantas cultivadas*. 4 ed, Agronômica Ceres, São Paulo, pp. 185-196.
- ÚNICA (2011) União da Indústria de Cana-de-açúcar. <http://www.unica.com.br/default.asp> (October 4, 2013).
- Vallad GE and Goodman RM (2004) Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Sci* 44:1920-34.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B and Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* 270:484-7.
- Vettore AL, Silva FR, Kemper EL and Arruda P (2001) The libraries that made SUCEST. *Genet Mol Biol* 24:1-4.
- Westermeier R (2005) Proteome analysis. *Electrophoresis in practice*. 4th Wiley-VCH.
- Young AJ, Petrasovits LA, Croft BJ, Gillings M and Brumbley SM (2006) Genetic Uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane. *Austr J Plant Pathol* 35:503-511.

## 9. Curriculum vitae (*Lattes*)

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1465665894223227>

### **Renata Rodrigues de Almeida**

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Metodista de Piracicaba (1998) e Mestrado em Ciências (ESALQ/USP - 2006). Atualmente cursando Doutorado em Genética pela (UFPE). Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em Fitopatologia, atuando principalmente nos seguintes temas: Microbiologia, Bioquímica, Biologia Molecular, Fitossanidade, e Genética Vegetal.

### **Artigos completos publicados em periódicos**

PESTANA-CALSA, MARIA CLARA ; PACHECO, CINTHYA MIRELLA ; CASTRO, RENATA CRUZ DE ; **Almeida, Renata Rodrigues de** ; LIRA, NAYARA PATRÍCIA VIEIRA DE ; CALSA JUNIOR, TERCILIO . Cell wall, lignin and fatty acid-related transcriptome in soybean: achieving gene expression patterns for bioenergy legume. *Genetics and Molecular Biology* (Impresso) <sup>JCR</sup>, v. 35, p. 322-330, 2012.

### **Trabalhos completos publicados em anais de congressos**

PENA, E. P. N. ; LIRA, N. P. V. ; FOLHA, R. E. O. ; SOUZA, J. M. ; **ALMEIDA, R. R.** ; PESTANA-CALSA, M. C. ; CALSA Jr., T. . Análise In Silico Comparativa da HSP70 e HSP80 Expressas em Diferentes Órgãos de Cana-de-Açúcar.. In: In: I Congresso Nacional de Ciências Biológicas e IV Simpósio Nordeste de Ciências Biológicas, 2011, Recife. Anais do I Congresso Nacional de Ciências Biológicas, 2011., 2011.

### **Resumos expandidos publicados em anais de congressos**

PENA, E. P. N. ; **ALMEIDA, R. R.** . Parâmetros Quantitativos de Proteínas Totais de Folhas de Cana-de-Açúcar sob Estresse Hídrico. In: In: II Simpósio Pernambucano de Biologia Aplicada: biotecnologia aplicada na saúde, produção industrial e conservação ambiental, 2011, Recife. Anais do II Simpósio Pernambucano de Biologia, 2011, Recife. In: II Simpósio Pernambucano de Biologia Aplicada: biotecnologia aplicada na saúde, produção industrial e conservação ambiental, 2011, Recife. Anais do II Simpósio Pernambucano de Biologia, 2011.

### **Resumos publicados em anais de congressos**

BARBOSA NETO, A. G. ; FOLHA, R.E.O. ; PACHECO, C.M. ; **ALMEIDA, R. R.** ; PESTANA-CALSA, M.C. ; MORAIS JR., M. ; CALSA, JR. T . Proteome extraction from yeast *dekkera bruxellensis* for analysis by two-dimensional electrophoresis. In: 58º congresso brasileiro de genética, 2012, foz do iguaçu - pr. 58º congresso brasileiro de genética, 2012.

SOUZA, J. M. ; LIMA, M. F. ; PENA, E. P. N. ; OLIVEIRA, R. ; SOUZA, A. E. R. ; PESTANA-CALSA, MARIA CLARA ; **ALMEIDA, R. R.** ; CALSA, JR. T . Otimização da extração de proteínas totais de folha em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) Para 2D-PAGE. In: In: V SICBIO, 2012, 2012, Recife. In: V SICBIO, 2012, 2012.

FOLHA, R.E.O. ; PESTANA-CALSA, M.C. ; **ALMEIDA, R. R.** ; NOGUEIRA, R.J.M.C. ; CALSA, JR. T . "Leaf proteomics of physicnut (*Jatropha curcas* L.) In response to nutritional deficit". In: iii simpósio brasileiro de genética molecular de plantas, 2011, ilhéus - ba. Iii simpósio brasileiro de genética molecular de plantas, 2011.

PACHECO, C.M. ; PESTANA-CALSA, M.C. ; **ALMEIDA, R. R.** ; LIRA, N.P.V. ; NOGUEIRA, R.J.M.C. ; CALSA, JR. T . Sugarcane root differential proteome under salinity. In: iii simpósio brasileiro de genética molecular de plantas, 2011, ilhéus - ba. Iii simpósio brasileiro de genética molecular de plantas, 2011.

SOUZA, A. E. R. ; PACHECO, C. M. ; FOLHA, R. E. O. ; LIRA, N. P. V. ; MACIEL, L. S. ; **ALMEIDA, R. R.** ; PESTANA-CALSA, M. C. ; CALSA, JR. T . Differential peptides from salt-sensitive sugarcane roots.. In: In: X-Meeting 2011 (AB3C / soibio), 2011, Florianópolis. X-Meeting 2011 (AB3C / soibio), 2011., 2011, Florianópolis. In: X-Meeting 2011 (AB3C / soibio), 2011, Florianópolis. X-Meeting 2011 (AB3C / soibio), 2011., 2011.

GOMES, N. O. C. ; FOLHA, R. E. O. ; MANSO, C. T. ; PACHECO, C. M. ; LIRA, N. P. V. ; SOUZA, A. E. R. ; **ALMEIDA, R. R.** ; PESTANA-CALSA, M. C. ; CALSA, JR. T . In silico transcriptome matching of mass-spectrometry-derived protein sequece associated to salinity tolerance in sugarcane roots.. In: In: X-Meeting 2011 (AB3C / soibio), 2011, Florianópolis. X-Meeting 2011 (AB3C / soibio), 2011., 2011, FLORIANÓPOLIS. In: X-Meeting 2011 (AB3C / soibio), 2011, Florianópolis. X-Meeting 2011 (AB3C / soibio), 2011., 2011.

PACHECO, C.M. ; PESTANA-CALSA, M.C. ; SANTOS, C.A. ; SILVA, M.A. ; SILVA, N.V. ; SANTANA, O.M. ; **ALMEIDA, R. R.** ; MELO, T.T.A.T. ; NOGUEIRA, R.J.M.C. ; Tercílio Calsa Junior . Gas exchanges in sugarcane genotypes under salinity stress. In: 2nd pan american congress on plants and bioenergy, 2010, aguas de são pedro-sp. 2nd pan american congress on plants and bioenergy, 2010.

PACHECO, C.M. ; PESTANA-CALSA, M.C. ; SANTOS, C.A. ; SILVA, M.A. ; SILVA, N.V. ; SANTANA, O.M. ; **ALMEIDA, R. R.** ; MELO, T.T.A.T. ; NOGUEIRA, R.J.M.C. ; Tercílio Calsa Junior . Gas exchanges in sugarcane genotypes under salinity stress.. In: 1st brazilian-german meeting of plant systems biology and bioenergy, 2010, recife/pe. 1st brazilian-german meeting of plant systems biology and bioenergy, 2010.