



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

JÉSSICA BARBOZA DA SILVA

**SELEÇÃO *IN SILICO* E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE DEFESA EM
UVA (*Vitis vinifera* L.) SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE BIÓTICO**

Recife
2018

JÉSSICA BARBOZA DA SILVA

**SELEÇÃO *IN SILICO* E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE DEFESA EM
UVA (*Vitis vinifera* L.) SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE BIÓTICO**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon

Coorientador: Dr^a Roberta Lane de Oliveira Silva

Dr. Nataniel Franklin de Melo

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Jéssica Barboza da

Seleção *in silico* e expressão diferencial de genes de defesa em uva (*Vitis vinífera* L.) sob condições de estresse biótico / Jéssica Barboza da Silva - 2018.

160 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ana Maria Benko-Iseppon

Coorientadores: Roberta Lane de Oliveira Silva

Natoniel Franklin de Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Defesa vegetal 2. *Xanthomonas citri* 3. Transcriptoma

I. Benko-Iseppon, Ana Maria (orient.) II. Silva, Roberta Lane de Oliveira (coorient.) III. Melo, Natoniel Franklin de (coorient.) IV. Título

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-298

JÉSSICA BARBOZA DA SILVA

**SELEÇÃO *IN SILICO* E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE DEFESA EM
UVA (*Vitis vinifera* L.) SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE BIÓTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

(Aprovada em: 20/07/2018)

BANCA EXAMINADORA

Avaliador 1: Dr^a Ana Maria Benko Iseppon / Universidade Federal de Pernambuco

Avaliador 2: Dr. Nataniel Franklin de Melo / Embrapa Semiárido, Petrolina

Avaliador 3: Dr. João Pacífico Bezerra Neto / Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por sempre ter iluminado meu caminho e ter permitido que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Benko-Iseppon, por quem tenho grande admiração e respeito, agradeço por todas as oportunidades concedidas, disposição constante e paciência.

À minha coorientadora Dra Roberta Lane, por toda dedicação, paciência, confiança, ensinamentos, por estar ao meu lado em todos os momentos e pela grande amizade, minha eterna gratidão.

Ao Dr. Nataniel Melo, por quem tenho grande admiração e respeito, agradeço pela colaboração e apoio durante os experimentos de coleta das amostras de videira.

Ao Dr. João Pacífico, que tanto me ajudou, com toda paciência do mundo, para o desenvolvimento dessa pesquisa, minha gratidão e admiração.

À minha família pelo amor, confiança, carinho e apoio constantes, em especial ao meu pai, José Barboza, e minha mãe, Anabel Cristina, por me fortalecerem para lutar por cada objetivo almejado, por toda paciência e por compreenderem os momentos em que estive ausente, obrigada por existirem. Às minhas irmãs, Ana Karolina e Ana Rafaela, e cunhados, Diego e Márcio, pelo incentivo e apoio incondicional.

À minha sobrinha tão amada, Áyla Barboza Neves, por trazer tanta luz, alegria, leveza e amor à nossa família.

Às minha avôs (Margarida e Abigail), avô (José Barboza), tias, tios e primos, por todo apoio, torcida, orações, amos vocês.

Aos membros do LGBV, e em especial à Ana Rafaela, Flávia Araújo, Mireli Santana, Jéssica Figueredo, Flávia Aburjaile, Carlos André, Lívia Vilela, Rômulo Fonseca, Marx Lima e Vanessa Souza que me ajudaram no momento em que eu mais precisei, com toda paciência, amizade e momentos de descontração, meu eterno reconhecimento.

Aos amigos de longa data, Romero Medeiros e Alber Lages, por todo carinho, atenção, momentos únicos compartilhados, por torcerem por mim, por continuarem comigo, apesar da ausência física, eu amo vocês.

Ao grupo da UFRPE, Marcelo Tigre, Ludymila Cantanhede, Priscila Correa e Pábola Nascimento, por todos os momentos compartilhados, ensinamentos, amizade e respeito.

Agradeço o suporte financeiro oferecido pelas agências de fomento à pesquisa, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

A todos que de forma direta ou indireta auxiliaram neste trabalho.

Você esta vivo. Esse é o seu espetáculo. Só quem se mostra se encontra. Por mais que se perca no caminho
(CAZUZA)

RESUMO

O gênero *Vitis* destaca-se entre as espécies frutíferas mais cultivadas mundialmente, apresentando grande importância econômica. Apesar dos altos rendimentos alcançados em sua produtividade, as espécies de *Vitis* tem apresentado susceptibilidade a vários agentes patogênicos, em especial a bactéria *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* (*Xcpa*) considerada um dos mais sérios fatores limitantes para a produção de uvas de mesa e vinho em Pernambuco. O presente trabalho objetivou identificar, caracterizar e validar genes de resistência (*R*) promissores e relacionados aos processos de defesa vegetal em acessos contrastantes quanto à resistência a *Xcpa* para aplicação em programas de melhoramento genético da cultura. Dessa forma, foi conduzido um experimento em casa de vegetação visando à geração de bibliotecas de RNA-Seq de videira usando clones da cultivar ‘Red Globe’, considerada susceptível ao cancro bacteriano e do híbrido IAC-572 considerado moderadamente resistente ao cancro bacteriano. As plantas foram inoculadas com *Xcpa* e o RNA total foi extraído e enviado para construção das bibliotecas de RNA-Seq. Os genes de interesse foram minerados e caracterizados com o auxílio de ferramentas de bioinformática. Genes normalizadores e alvos de interesse foram validados via RT-qPCR. A partir das análises *in silico*, foi possível identificar 894 genes de resistência, contemplando todas as classes, sendo os RLP, STK e NBS mais representativos no transcriptoma de *Vitis*. A análise fenética utilizando candidatos da classe NBS-LRR formou sete *clusters*, os candidatos que possuíam os domínios NBS, NBS-LRR, CC-NBS e CC-NBS-LRR agruparam em seis *clusters*. A seleção dos genes de referência com base na análise de estabilidade em *softwares* específicos indicou um conjunto funcional de normalizadores para as duas cultivares de *Vitis*, sendo os três melhores (TRU5, TCBP e 60SRP) utilizados para a validação via RT-qPCR dos genes de interesse (NBS-LRR12, RLK, STK e STK4), selecionados nas bibliotecas de RNA-Seq. Desses, RLK e STK não tiveram sua expressão alterada nos tempos avaliados em nenhuma das cultivares. NBS-LRR12 e STK4 não apresentaram expressão diferencial nos dois primeiros tempos (90 minutos e 24 horas após a inoculação), porém, foram superexpressos com 48 horas de estresse na cultivar resistente e não significativos na cultivar susceptível, indicando uma resposta genótipo tardia e específica. Os resultados contribuíram para um melhor entendimento das características moleculares dos genes de resistência e sua participação no processo de defesa em videira.

Palavras-chave: Defesa vegetal. *Xanthomonas citri*. Transcriptoma. RT-qPCR.

ABSTRACT

The genus *Vitis* stands out among the fruit species most cultivated worldwide, presenting great economic importance worldwide. Despite the high product yields, *Vitis* spp. have been susceptible to several pathogens, especially the bacterium *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, considered one of the most serious limiting factors to produce table grapes and wine in Pernambuco. The present work aimed to identify, characterize and validate promising resistance genes related to the processes of plant defense in contrasting accessions to resistance to *X. citri* for application in crop breeding programs. Thus, a greenhouse experiment was conducted aiming at the generation of grapevine RNA-Seq libraries using clones of the 'Red Globe' cultivar, considered susceptible to bacterial cancer and of the hybrid IAC-572, considered moderately resistant to bacterial cancer. The plants were inoculated with Xcv and total RNA was extracted and sent for construction of the RNA-Seq libraries. Genes of interest were mined and characterized through different bioinformatics tools. Reference genes and targets were validated via RT-qPCR. From the in silico analyzes, it was possible to identify 894 resistance genes, contemplating all classes, being the RLP, STK and NBS more representative in the *Vitis* transcriptome. NBS-LRR, CC-NBS and CC-NBS-LRR domains were grouped into six clusters. The selection of the reference genes based on stability analysis in specific software indicated a functional set of normalizers for the two *Vitis* cultivars, the three best ones (TRU5, TCBP and 60SRP) being used for RT-qPCR validation of the target genes (NBS-LRR12, RLK, STK and STK4), selected from the RNA-Seq libraries. Of these, RLK and STK did not have their expression altered at times evaluated in any of the cultivars. NBS-LRR12 and STK4 did not show differential expression in the first two times (90 minutes and 24 hours after inoculation), however, they were overexpressed with 48 hours of stress in the resistant cultivar and not significant in the susceptible cultivar, indicating a specific genotype response, although late, but that suggests participation in the defense response of the plant to the pathogen. The results obtained in this study contributed to a better understanding of the molecular characteristics of resistance genes and their participation in the defense process in grapevine, presenting the potential for the development of molecular markers and application in breeding programs.

Keywords: Plant defense. *Xanthomonas citri*. Transcriptome. RT-qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 –	Área cultivada de videira no mundo	24
Figura 2 –	Região do Submédio do Vale de São Francisco	26
Figura 3 –	Sintomas do cancro bacteriano da videira. a) Pontos necróticos nas folhas; b) Formação de cancos nas ráquis e nos ramos; c) Bagas desuniformes e com pontos necróticos	30
Figura 4 –	Modelo especulativo para o papel dos PRRs/GLRs na regulação das respostas de defesa das plantas	34
Figura 5 –	Representação da localização e estrutura das cinco classes de genes de resistência a doenças de plantas. Classe I: NB-ARC-LRR; Classe II: TM-LRR; Classe III: RLK; Classe IV: STK e Classe V: <i>Coiled-coil</i>	35

Artigo

Figura 1 –	Fluxograma das análises de bioinformática para a identificação e caracterização da família gênica dos genes <i>R</i> no genoma expresso de <i>Vitis spp.</i>	49
Figura 2 –	Extração de RNA de tecidos foliares de duas cultivares de <i>Vitis</i> contrastantes quanto à resistência a <i>Xanthomonas citri</i> . CA = Controle; TICA = Tratamento inoculado com cepa agressiva; 90' = Tempo de 90 minutos após a inoculação	54
Figura 3 –	Eletroferogramas de amostras de RNA total de duas cultivares de <i>Vitis</i> apresentando o RIN (<i>RNA Integrity Number</i>) para cada amostra analisada no tempo de 90 minutos após a inoculação. Destacado em verde: CA = Controle, azul: TICA = Tratamento inoculado com cepa agressiva, para cultivar IAC-572 e destacado em laranja: CA = Controle, vermelho: TICA = Tratamento inoculado com cepa agressiva, para cultivar Red Globe	55
Gráfico 1 –	Variação do domínio LRR nas subclasses dos genes de resistência RLP e RLK.....	60
Quadro 1 –	Análise de domínio realizada no CD-Search, a) RLP - Vv_DN56869_c1_g1_i2 (RLP_2) e b) RLK - Vv_DN55439_c0_g1_i1 (RLK_2). Resultado da análise de domínio via Pfam, c) RLP - Vv_DN56869_c1_g1_i2 (RLP_2)	

	e d) RLK - Vv_DN55439_c0_g1_i1 (RLK_2).....	61
Gráfico 2 –	Subclasses dos genes STK identificadas em <i>Vitis</i> spp.	62
Figura 4 –	Motivo presente no domínio <i>coiled-coil</i> . Sequência consenso gerada a partir do programa MEME. Destaque para setas pretas com os aminoácidos mais conservados e as setas vermelhas com os aminoácidos mais variáveis do motivo	63
Figura 5 –	Motivos presentes no domínio NBS	64
Figura 6 –	Motivo conservado no domínio LRR de <i>Vitis</i> spp.	64
Figura 7 –	Motivo presente no domínio <i>Pkinase</i>	65
Figura 8 –	Motivos presentes no domínio STK, gerada a partir do programa MEME. Destacado em setas pretas os aminoácidos mais conservados	65
Figura 9 –	Alinhamento múltiplo das sequências preditas para RPW8 em <i>Vitis</i> spp. As setas pretas indicam os resíduos de aminoácidos e a seta vermelha destaca o motivo <KKNR>	66
Gráfico 3 –	Ponto isoelétrico verificado em <i>Vitis</i> spp. para os genes <i>R</i>	67
Gráfico 4 –	Localização subcelular para as classes I, II, III e IV	68
Gráfico 5 –	Principais locus identificados para o gene NBS-LRR em <i>Vitis</i> spp.	69
Gráfico 6 –	Principais locus identificados para o gene RLP em <i>Vitis</i> spp.	69
Gráfico 7 –	Principais locus identificados para o gene RLK em <i>Vitis</i> spp.	70
Gráfico 8 –	Principais locus identificados para o gene STK em <i>Vitis</i> spp.	70
Figura 10 –	Fenograma construído por meio do método de Neighbor-Joining, utilizando os genes-candidatos a NBS-LRR de <i>V. vinifera</i> (Vv), bem como sequências de <i>Solanum lycopersicum</i> (Sl), <i>Solanum acaule</i> (Sa), <i>Solanum tuberosum</i> (St), <i>Solanum pennellii</i> (Sp), <i>Nicotiana glutinosa</i> (Ng), <i>Arabidopsis thaliana</i> (At), <i>Linum usitatissimum</i> (Lu), <i>Manihot esculenta</i> (Me), <i>Medicago truncatula</i> (Mt), <i>Juglans regia</i> (Jr), <i>Rosa chinensis</i> (Rc), <i>Citrus sinensis</i> (Cs), <i>Malus domestica</i> (Md) e <i>Capsicum chacoense</i> (Cc), destacados com uma estrela. Foram identificados sete grandes clusters, numerados I, II, III, IV, V, VII e VII. As cores dos ramos representam os genes NBS: NBS (amarelo); CC-NBS (vermelho); CC-NBS-LRR (azul escuro);	

	NBS-LRR (rosa); TIR-NBS-LRR (azul claro)	72
Figura 11 –	<i>Heatmap</i> dos genes <i>R</i> em dois genótipos de <i>Vitis</i> contrastantes quanto à infecção por <i>X. citri</i> . A) Classe I (NBS-LRR); B) Classe II (RLP); C) Classe III (RLK); D) Classe IV (STK); E) Classe V (RPW8)	74
Figura 12 –	Curva de <i>melting</i> de dez genes de referência candidatos em amostras de cDNA de tecidos foliares de <i>Vitis spp.</i>	77
Figura 13 –	Eficiência dos dez genes referência candidatos em amostras de cDNA de tecidos foliares da cultivar IAC 572	78
Figura 14 –	Eficiência dos dez genes referência candidatos em amostras de cDNA de tecidos foliares da cultivar Red Globe	79
Figura 15 –	Valores médios de estabilidade de expressão gerado pelo programa GeNorm para os dez genes de referência testados em amostras de cDNA de tecidos foliares da cultivar IAC 572	80
Figura 16 –	Determinação do número de genes de referência ideal para normalização dos dados de expressão da cultivar IAC 572	81
Figura 17 –	Valores médios de estabilidade de expressão gerado pelo programa GeNorm para os dez genes de referência testados em amostras de cDNA de tecidos foliares da cultivar IAC 572	81
Figura 18 –	Determinação do número de genes de referência ideal para normalização dos dados de expressão da cultivar Red Globe	82
Figura 19 –	Expressão relativa dos genes NBS12 e RLK em cDNAs de tecidos foliares da cultivar IAC 572 após a infecção com <i>X. citri</i> , normalizada com os genes de referência TRU5, TCBP e 60 SRP. (A) 90 minutos após inoculação com <i>X. citri</i> ; (B) 24 horas após inoculação com <i>X. citri</i> ; (C) 48 horas de após inoculação com <i>X. citri</i>	86
Figura 20 –	Expressão relativa dos genes NBS12 e RLK em cDNAs de tecidos foliares da cultivar Red Globe após a infecção com <i>X. citri</i> , normalizada com os genes de referência TRU5, TCBP e 60 SRP. . (A) 90 minutos após inoculação com <i>X. citri</i> ; (B) 24 horas após inoculação com <i>X. citri</i> ; (C) 48 horas de após inoculação com <i>X. citri</i>	87
Figura 21 –	Expressão relativa dos genes STK e STK4 em cDNAs de tecidos foliares da cultivar IAC 572 após a infecção com <i>X. citri</i> , normalizada com os genes de referência TRU5, TCBP e 60 SRP(A) 90 minutos após inoculação com <i>X. citri</i> ; (B) 24	

horas após inoculação com *X. citri*; (C) 48 horas de após inoculação com *X. citri* 88

Figura 22 – Expressão relativa dos genes STK e STK4 em cDNAs de tecidos foliares da cultivar Red Globe após a infecção com *X. citri*, normalizada com os genes de referência TRU5, TCBP e 60 SRP. (A) 90 minutos após inoculação com *X. citri*; (B) 24 horas após inoculação com *X. citri*; (C) 48 horas de após inoculação com *X. citri*..... 89

LISTA DE TABELAS

Revisão De Literatura

Tabela 1 –	Principais ferramentas de caracterização bioinformática.....	39
------------	--	----

Artigo

Tabela 1 –	Genes de referência e genes alvos e seus números de acesso, anotações e sequências dos <i>primers</i>	52
Tabela 2 –	Quantificação das amostras de <i>vitis</i> utilizando Qubit e NanoDrop.....	56
Tabela 3 –	Mineração e tradução dos candidatos a genes de Resistência no genoma expresso de <i>V. vinifera</i>	59
Tabela 4 –	Genes candidatos da classe RPW8	62
Tabela 5 –	Resíduos de aminoácidos conservados na classe IV (STK) de <i>vitis spp.</i>	66
Tabela 6 –	Características físico-químicas e localização subcelular para RPW8	67
Tabela 7 –	Parâmetros obtidos nas análises de RT-qPCR	76
Tabela 8 –	Valores de estabilidade de expressão calculados pelos softwares NormFinder e Bestkeeper	83
Tabela 9 –	Expressão relativa dos genes alvos (NBS12, RLK, STK e STK4) baseada na RT-qPCR (90 minutos, 24 horas e 48 horas) de tecidos foliares de duas cultivares de videira infectadas com <i>X. citri</i> e sua regulação na biblioteca de RNA-Seq (90 minutos)	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Avr	Avirulência, <i>Avirulence</i>
BLAST	Ferramenta Básica de Busca por Alinhamento Local, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CC	Cauda Espiralada, <i>Coiled coil</i>
cDNA	DNA Complementar, <i>Complementary DNA</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DDBJ	Banco de Dados de DNA do Japão, <i>DNA DataBase of Japan</i>
EST	Marcador de sequência genética, <i>Expressed Sequence Tag</i>
EMBL	Laboratório Europeu de <i>Biologia Molecular</i> <i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ET	Etileno, <i>Ethylene</i>
ETI	Imunidade desencadeada pelo efetor, <i>effector-triggered immunity</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FT	Fator de transcrição, <i>Transcription Factor</i>
GLR	Receptor tipo glutamato, <i>Glutamate receptor-like</i>
HAMP	Padrões moleculares associados a herbívoros, <i>Herbivore-associated molecular patterns</i>
HR	Reação de Hipersensibilidade, <i>Hypersensitive Response</i>
LRR	Repetições Ricas em Leucina, <i>Leucine Rich Repeats</i>
MEGA	Análises Genéticas da Evolução Molecular, <i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>
mRNA	RNA mensageiro, <i>Messenger RNA</i>
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos, <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>

MAMP	Padrões moleculares associados a microrganismos, <i>Microbe-associated molecular pattern</i>
N	Nitrogênio, <i>Nitrogen</i>
NBS	Sítio Ligador de Nucleotídeo, <i>Nucleotide Binding Site</i>
NO	Óxido Nítrico, <i>Nitric Oxide</i>
NCBI	Centro Nacional para Informação Biotecnológica, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
pb	Pares de bases, <i>Base pairs</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RT-qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real, <i>Quantitative Real Time PCR</i>
PTI	Imunidade desencadeada por PAMPs , <i>PAM-triggered immunity</i>
PRGdb	Banco de dados de genes de resistência, <i>Plant Resistance Gene database</i>
RLP	Proteína Tipo Receptora, <i>Receptor-Like Protein</i>
PR	<i>Proteína Relacionada À Patogênese</i> , <i>Pathogen Related</i>
PRR	<i>Receptores de reconhecimento padrão</i> , <i>PAMP-recognition receptor</i>
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos, <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
RNA	Ácido Ribonucleico, <i>Ribonucleic Acid</i>
RNAseq	Sequenciamento do RNA; <i>RNA Sequencing</i>
ROS	<i>Espécies reativas de oxigênio</i> , <i>Reactive oxygen species</i>
R	Resistência, <i>Resistance</i>
RLK	Receptor Tipo Quinase, <i>Receptor-Like Kinase</i>
STK	Serina/treonina quinase do tipo receptor, <i>Receptor-like serine/threonine kinase</i>
SA	Ácido salicílico, <i>Ácido salicílico</i>
SuperSAGE	Super Análises em Série da Expressão Gênica, <i>Super Serial Analysis of Gene Expression</i>

TIR	Receptor Toll-Interleucina, <i>Toll Interleukine Receptor</i>
Xcpa	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardii</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	FAMÍLIA <i>VITACEAE</i>	21
2.2	GÊNERO <i>VITIS</i> L.	22
2.3	<i>VITIS VINIFERA</i> L.	22
2.4	VITICULTURA NO MUNDO	23
2.5	VITICULTURA NO BRASIL	25
2.6	VITICULTURA NO NORDESTE: VALE DO SÃO FRANCISCO ...	26
2.7	PRINCIPAIS DOENÇAS E PRAGAS QUE AFETAM A VITICULTURA NO VALE DO SÃO FRANCISCO	27
2.8	CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA (<i>XANTHOMONAS CITRI</i> <i>PV. ANACARDII</i>).....	28
2.9	DISSEMINAÇÃO E MEDIDAS DE CONTROLE DA BACTÉRIA <i>XANTHOMONAS CITRI PV. ANACARDII</i>	31
2.10	CULTIVARES IAC-572 E RED GLOBE	31
2.11	MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL	32
2.12	GENES DE RESISTÊNCIA	34
2.13	ABORDAGENS BIOTECNOLÓGICAS E OS GENES DE RESISTÊNCIA	37
2.14	BIOINFORMÁTICA NA ANÁLISE DE DADOS MOLECULARES.....	38
2.15	EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL	40
3	OBJETIVOS	42
3.1	OBJETIVO GERAL	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4	RESULTADOS	43
4.1	ARTIGO – CARACTERIZAÇÃO <i>IN SILICO</i> E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE RESISTÊNCIA EM VIDEIRA	

SOB ESTRESSE BIÓTICO	43
CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	97
ANEXOS	110
ANEXO A SEQUÊNCIAS SONDA (<i>Seed sequences</i>) UTILIZADAS PARA MINERAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA EM <i>Vitis</i> <i>spp.</i>	110
ANEXO B TRANSCRITOS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO- QUÍMICAS, LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E ANCORAGEM DOS GENES DA CLASSE NBS- LRR	112
ANEXO C TRANSCRITOS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO- QUÍMICAS, LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E ANCORAGEM DOS GENES DA CLASSE RLP	120
ANEXO D TRANSCRITOS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO- QUÍMICAS, LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E ANCORAGEM DOS GENES DA CLASSE RLK ...	139
ANEXO E TRANSCRITOS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO- QUÍMICAS, LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E ANCORAGEM DOS GENES DA CLASSE STK	142
ANEXO F EFICIÊNCIAS E CURVAS DE <i>MELTING</i> DOS GENES NBS12, RLK, STK E STK4 EM AMOSTRAS DE CDNA DE TECIDOS FOLIARES DA CULTIVAR IAC 572	159
ANEXO G EFICIÊNCIAS E CURVAS DE <i>MELTING</i> DOS GENES NBS12, RLK, STK E STK4 EM AMOSTRAS DE CDNA DE TECIDOS FOLIARES DA CULTIVAR RED GLOBE	160

1 INTRODUÇÃO

A família Vitaceae, pertencente à ordem Vitales, é composta por 14 gêneros e cerca de 900 espécies amplamente distribuídas (SOEJIMA e WEN, 2006). O gênero *Vitis* é formado por cerca de 50 espécies, com aproximadamente 1000 cultivares, incluindo as videiras comercialmente importantes, como as americanas (*V. labrusca*, *V. bourquina* e *V. rotundifolia*) e as europeias (*V. vinifera*), que se destacam tanto pela sua importância econômica, quanto pela sua elevada diversidade morfológica e genética (LEÃO *et al.*, 2009; <http://www.theplantlist.org>).

De acordo com dados disponibilizados pela *International Organisation of Vine and Wine* (OIV), a produção mundial de uvas em 2016 foi de 75,8 milhões de toneladas, em uma área de cultivo que superou sete milhões de hectares. Cerca de 90 % dessa produção foi colhida nos continentes Europeu, Asiático e Americano, tendo como principais países produtores a Itália, França, China e Estados Unidos (OIV, 2018). No Brasil, a videira é cultivada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, tendo sua produção destinada principalmente à fabricação de vinhos e comercialização de uvas de mesa. A região Nordeste, especialmente o Submédio do Vale do São Francisco, em Pernambuco, apesar de considerada climaticamente inapta, tem se destacado das demais regiões produtoras por permitir ao viticultor a colheita de mais de duas safras por ano através do manejo de irrigação. Além disso, essa região destaca-se também pela alta qualidade da uva e vinhos produzidos, o que tem favorecido a rápida expansão da área cultivada e gerado empregos diretos e indiretos (PEDRO JÚNIOR e SENTELHAS, 2003). No entanto, apesar dos altos rendimentos alcançados em sua produtividade, a cultura tem apresentado susceptibilidade a diversos patógenos.

Entre os agentes patogênicos que mais afetam a produção de uvas no Brasil, destaca-se a bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (*Xcpa*) causadora do cancro bacteriano da videira (MALAVOLTA JÚNIOR *et al.*, 1999). Essa bactéria, considerada uma praga quaternária A2 (BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008), foi identificada no Submédio do Vale do São Francisco em plantios da cultivar *Red Globe*. Acredita-se que sua introdução ocorreu através de estacas contaminadas provenientes da Índia, sendo rapidamente disseminada na região, tornando-se um grave problema fitossanitário e um dos mais sérios fatores limitantes da produção da cultura na região (MALAVOLTA JÚNIOR *et al.*, 1999; LOPES e NASCIMENTO, 2004).

Os principais sintomas exibidos por cultivares acometidas pelo cancro bacteriano são a formação de lesões necróticas nas folhas e a prevalência de cancos provenientes da obstrução do tecido vascular nos ramos, gavinhas e talos já formados, o que impede o fluxo de nutrientes e compromete o crescimento vegetativo e reprodutivo da videira (ARAÚJO e ROBBS, 2000).

Por estarem constantemente expostas a situações de estresse, as plantas desenvolveram ao longo de sua evolução diversos mecanismos de defesa que incluem, principalmente, a formação de barreiras histológicas, a produção de metabólitos secundários, enzimas hidrolíticas e compostos sinalizadores (BONAS e LAHAYE, 2002; CHISHOLM *et al.*, 2006; MOFFET, 2009). Por outro lado, vários patógenos coevoluíram e desenvolveram a capacidade de produzir proteínas efetoras específicas que interagem com proteínas e outros compostos do hospedeiro e conseguem quebrar as barreiras de proteção dos vegetais, favorecendo a sua sobrevivência e o estabelecimento da doença (GRANT *et al.*, 2006, CHISHOLM *et al.*, 2006). Entre as principais famílias gênicas que participam do processo de defesa vegetal destacam-se os genes de resistência (R, *Resistance*), as proteínas relacionadas à patogênese (PR, *Pathogen Related*) e fatores de transcrição, que em conjunto participam desse processo, atuando no reconhecimento, na sinalização e na regulação gênica. No entanto, apesar do avanço ocorrido nas últimas décadas acerca dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na interação planta-patógeno ainda se conhece pouco sobre a função desses genes, proteínas e possíveis aplicações em programas de melhoramento genético vegetal.

Análises globais da expressão gênica têm contribuído para a compreensão de redes regulatórias associadas à adaptação e à tolerância aos diversos tipos de estresses. A redução dos custos de sequenciamento em larga escala tem favorecido a geração de dados de ômicas transcriptômica.

Para *V. vinifera*, os transcriptomas disponíveis são relacionados com estresses bióticos, envolvendo fungos fitopatogênicos como *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Eutypa lata*, *Botrytis cinerea* e *Erysiphe necator* (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; POLESANI *et al.*, 2010; CAMPS *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2015; AGUDELO-ROMERO *et al.*, 2015; AMRINE *et al.*, 2015). Até o nosso conhecimento, não existem abordagens desse tipo envolvendo a videira e infecções bacterianas.

O presente estudo visa identificar e avaliar a expressão de genes da superfamília R em *Vitis*, sob inoculação com *X. citri* pv. *viticola*, comparativamente a controles não inoculados, inferindo sobre seu papel na defesa vegetal contra esse patógeno.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA VITACEAE

A família Vitaceae, pertencente à ordem Vitales, é composta por 14 gêneros [*Acareosperma* Gagnep., *Ampelocissus* Planch., *Ampelopsis* Michx., *Cayratia* Juss., *Cissus* L., *Clematicissus* Planch., *Cyphostemma* (Planch.) Alston, *Nothocissus* (Miq.) Latiff, *Parthenocissus* Planch., *Pterocissus* Urb. & Ekman, *Rhoicissus* Planch. In A. de Candolle & C. de Candolle, *Tetrastigma* (Miq.) Planch, *Vitis* L. e *Yua* C.L. Li], e cerca de 900 espécies amplamente distribuídas em todos os continentes (SOEJIMA e WEN, 2006; COL, 2018). As espécies de Vitaceae compreendem lianas geralmente monoicas, possuem inflorescência em cimeira, flores bissexuadas, actinomorfas e fruto tipo baga. São caracterizadas (com exceção de algumas espécies de *Cyphostemma*) por apresentar gavinhas opostas às folhas, que permitem ascender ao topo do dossel, otimizando a captação de energia luminosa (LOMBARDI, 2002; LU *et al.*, 2017).

Vitaceae tem como provável centro de origem a Groelândia, onde foram verificados registros de suas espécies ancestrais. Acredita-se que a partir da Groelândia esses ancestrais foram se dispersando e diferenciando-se em novas espécies, possibilitando uma enorme variabilidade e adaptação às mais diversas situações ambientais. Hoje, considera-se a existência de três centros de origem da videira: Eurásia, Ásia e América (GIOVANNINI, 2014). A família possui dois subgêneros Leeoideae Burmeister e Viticoideae Eaton, sendo que este último possui o maior número de gêneros de grande importância, tais como: *Cissus* (*Cissus sicyoides* L. conhecida como insulina vegetal), *Ampelopsis* e *Parthenocissus* (trepadeiras ornamentais) e *Vitis* (uva). O gênero *Vitis* é o principal representante dessa família, destacando-se devido à produção de uvas, as quais são extensivamente cultivadas em todo o mundo, tanto para consumo *in natura* quanto como matéria prima para fabricação de diversos subprodutos, tais como sucos, vinhos, uvas-passas e geleias, entre outros (LEÃO *et al.*, 2008).

Filogeneticamente, a família forma um grupo monofilético, que se encontra dividido em três clados principais denominados: (1) grupo formado por *Ampelopsis*-*Rhoicissus*-*Parthenocissus*-*Vitis*-*Nothocissus*-*Pterisanthes*-*Ampelocissus*; (2) clado formado por espécies do gênero *Cissus*, exceto a espécie *C. striata*, da América do Sul; e (3) clado composto por

Cayratia-Tetrastigma-Cyphostemma. O gênero *Vitis* é considerado monofilético e próximo a *Ampelocissus*, *Pterisanthes* e *Nothocissus* (SOEJIMA e WEN, 2006; LU *et al.*, 2017).

2.2 GÊNERO *Vitis* L.

O gênero *Vitis* é formado por cerca de 50 espécies (<http://www.theplantlist.org>), distribuídas principalmente em zonas temperadas do Hemisfério Norte, sendo encontradas entre a América e a Ásia (LEÃO *et al.*, 2008). Entre as espécies de maior interesse econômico, estão as videiras americanas (*V. labrusca*, *V. bourquina* Munson e *V. rotundifolia*) e a europeia (*V. vinifera*) (LEÃO *et al.* 2009).

Devido à sua fácil propagação assexual, diversidade morfológica e genética, o gênero apresenta cerca de 14.000 cultivares, com diferentes finalidades: uvas de mesa, passas, sucos e vinhos. E esse número tende a aumentar, uma vez que diversos programas de melhoramento genético trabalham demasiadamente para a obtenção de cultivares mais resistentes e/ou adaptadas as condições adversas (PELLIZZARI, 1997; LEÃO *et al.*, 2008; GIOVANNINI, 2012).

2.3 *Vitis vinifera* L.

Vitis vinifera, também conhecida como parreira ou videira-europeia, é um arbusto perene, lenhoso, caducifólio, sarmentoso e trepador, que necessita de um sistema de suporte para conduzir o crescimento dos ramos, e que permita uma boa penetração de luz no dossel, otimizando sua capacidade fotossintética, através do equilíbrio entre a área foliar e o fruto. Suas flores podem ser hermafroditas ou de sexos separados e possui fruto do tipo baga (POMMER *et al.*, 2003). Essa espécie surgiu há aproximadamente 300 mil anos no Cáucaso e seu centro de dispersão está localizado na Eurásia, onde se difundiu pela Ásia Menor, Oriente Médio e costas do Mediterrâneo (GIOVANNINI, 2014). Seu fruto apresenta uma excelente fonte de nutrientes, com elevado teor de carboidratos (15 a 18 g a cada 100 g), alto teor calórico e baixo índice glicêmico (IG de 43 a 59). Além disso, apresenta uma excelente fonte de manganês, vitaminas (B6, B1, C), potássio e compostos fenólicos (FAO, 2016).

Apesar de toda a sua importância econômica e nutricional, o cultivo desta espécie é por vezes limitado, devido à suscetibilidade a diversos agentes patogênicos, exigindo uso intenso de agrotóxicos, e conseqüentemente, elevando os custos de produção. Dentre os

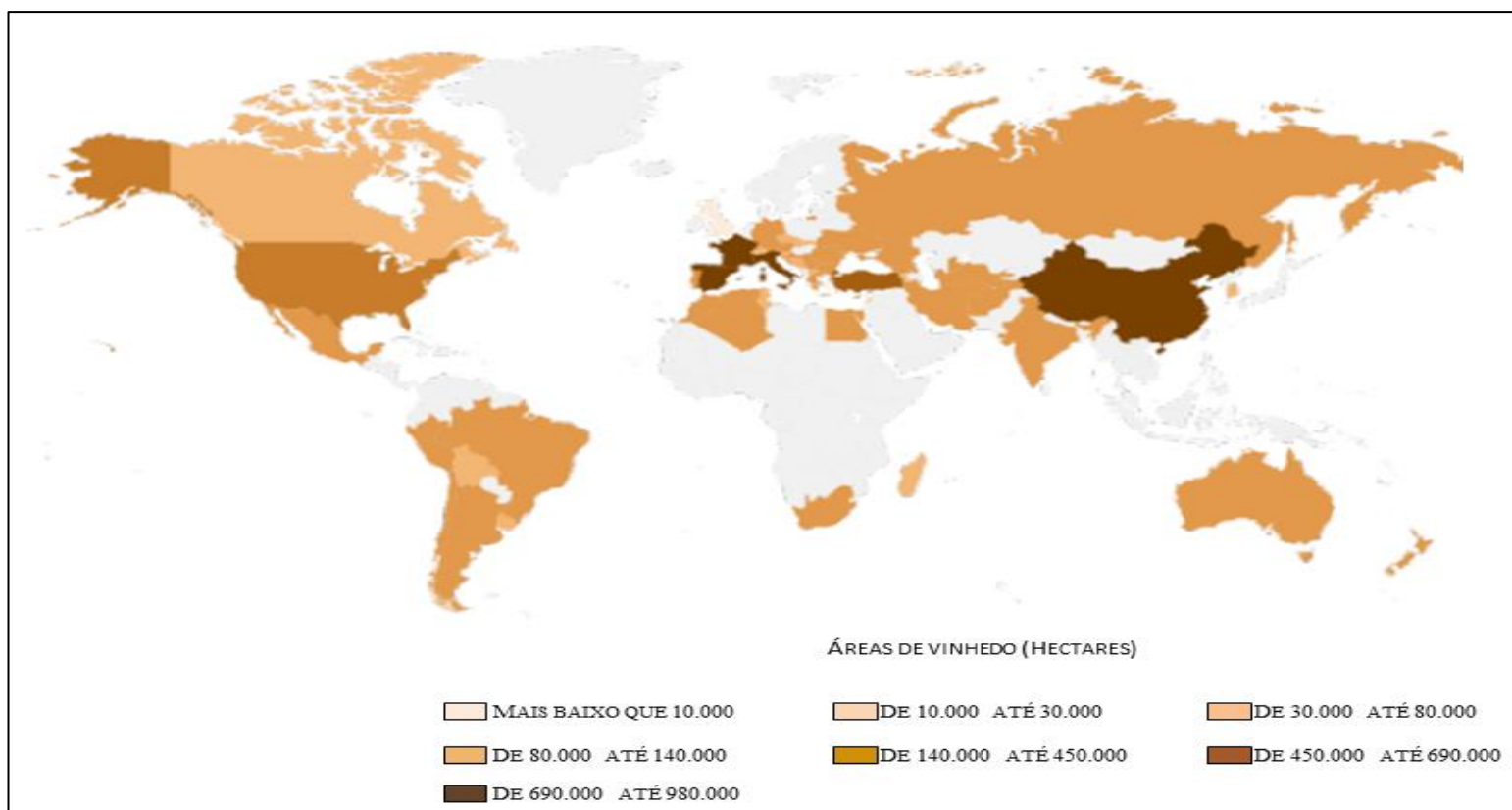
patógenos que mais acometem a cultura destacam-se os fungos *Plasmopora viticola* e *Botrytis cinerea* e a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (DERCKEL, 1999; LACHHAB et al., 2014; ANJOS, 2013; YACOUN, et al., 2016).

2.4 VITICULTURA NO MUNDO

O cultivo da videira envolve uma prática antiga, estando presente em quase todas as regiões do mundo. Entretanto, ainda existem dúvidas sobre os locais e períodos do início da sua domesticação ou se ocorreram em diferentes eventos independentes. Durante o processo de domesticação, as videiras passaram por mudanças drásticas para alcançar diferentes características fenotípicas, tal como o aumento no teor de açúcar, tamanho e forma das bagas e cachos e o hermafroditismo, as quais foram cruciais para a evolução das espécies hoje cultivadas (THIS et al., 2006).

Atualmente, são produzidas cerca de 75,8 milhões de toneladas de uva, em sete milhões e quinhentos mil hectares, sendo a Europa, a Ásia e as Américas responsáveis por uma área significativa, com aproximadamente 91 % (39 % pela Europa, 34 % pela Ásia e 18 % pela América) de sua produção. Por sua vez, e a África e a Oceania contribuem com apenas 9 % do total produzido (Figura 1). A China, Itália, Estados Unidos e a França se destacaram entre os principais países produtores de uva, contribuindo com cerca de 48 % da produção mundial em 2016 (OIV, 2017).

Figura 1. Área cultivada de videira no mundo.



Fonte: OIV (2017).

No que se refere à produção de vinho, a Itália, França e Espanha se destacam como os maiores exportadores, com aproximadamente 134 milhões de hectolitros de vinho, os Estados Unidos e a Austrália também apresentaram bons níveis de produção. O Brasil ocupa o 20º lugar no *ranking* de produção mundial de vinho. Entre os maiores exportadores estão a Espanha, Itália e França, com cerca de 60 hectolitros de vinho, arrecadando aproximadamente 16,4 bilhões de euros. Já a Alemanha, Reino Unido e os Estados Unidos são os maiores importadores, consumindo aproximadamente 39 hectolitros, em 2016 (OIV, 2017).

2.5 VITICULTURA NO BRASIL

A videira, especificamente a cultivar *Vitis vinifera*, foi introduzida no Brasil em 1532, por colonizadores portugueses, através de Martin Afonso de Souza, na Capitania de São Vicente, atual Estado de São Paulo. A partir disso, novas cultivares vindas de Portugal e da Espanha foram introduzidas no país, sendo possível expandir a viticultura para diversas regiões do Brasil (PROTAS *et al.*, 2003).

A viticultura no Brasil tem uma maior relevância nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Pernambuco e Minas Gerais (DE MELLO, 2012). Na Região Sul (Serra gaúcha) cerca de 95 % da produção de uvas é destinada à fabricação de vinhos e sucos, sendo essencialmente produzida por pequenos agricultores. No Sudeste, a produção é destinada ao consumo “*in natura*”, além da elaboração de vinhos. Na Região Nordeste, os estados de Pernambuco e Bahia (Submédio do Vale do São Francisco) destacam-se com a produção de uvas de mesa, gerando emprego e renda de forma direta e indireta para milhares de famílias (PROTAS *et al.*, 2003; DE MELLO, 2015).

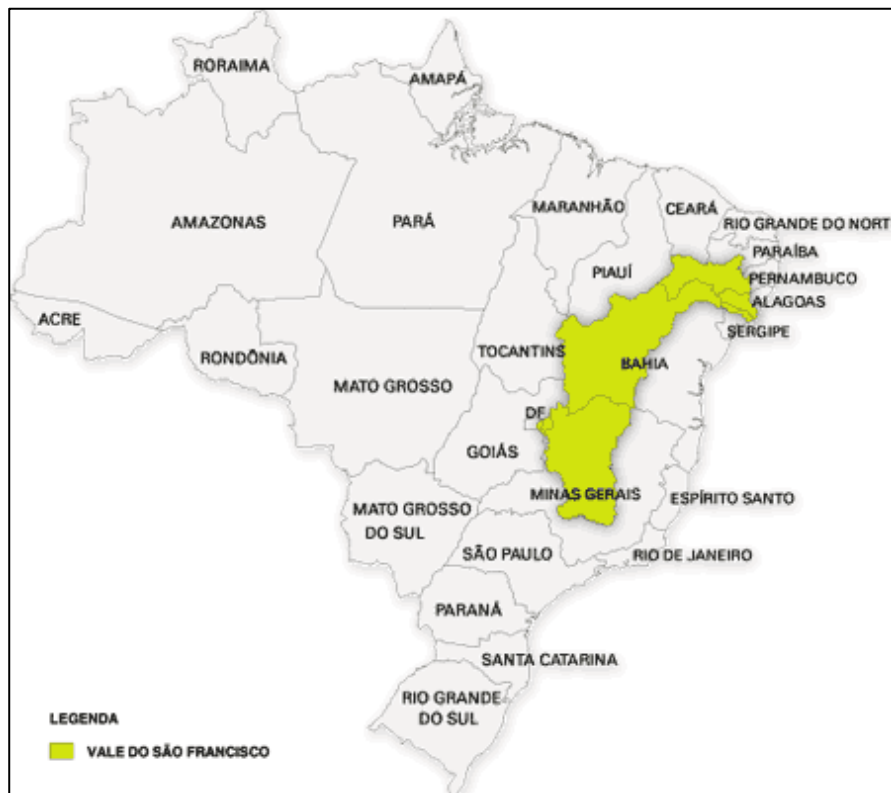
Em 2017, foram produzidas aproximadamente 1.680.020 toneladas de uvas no Brasil, tanto para processamento quanto para consumo *in natura*, apresentando um aumento de 41,24 % em comparação com o produzido em 2016, sendo a maior produção da história vitícola no país (MELLO, 2018). Os estados do Rio Grande do Sul e Pernambuco se destacaram com uma produção recorde de mais de 1.390.000 toneladas de uvas. Os estados de Santa Catarina, Minas Gerais e Espírito Santo também apresentaram aumento em sua produção em 94,39 %, 16,45 % e 46,16 %, respectivamente, em comparação ao observado em 2016. Por sua vez o estado da Bahia apresentou uma queda de 18,57 % comparativamente a 2016 (MELLO, 2018). No que se refere à produção de vinhos, sucos e derivados, a produção no Rio Grande do Sul foi 145 % superior à de 2016, com 605,96 milhões de litros, destacando-se a produção

de vinhos finos (elaborados com uvas *Vitis vinifera* L.) e vinhos de mesa (elaborados com uvas americanas e híbridas) que apresentaram aumento de 19,89 % e 21,26 %, frente ao observado em 2015, respectivamente (MELLO, 2018).

2.6 VITICULTURA NO NORDESTE: VALE DO SÃO FRANCISCO

O Vale do São Francisco situa-se na latitude de 9 °S, e longitude 40 °W, na região de fronteira entre os estados de Pernambuco e Bahia (Figura 2). A região apresenta uma altitude de cerca de 350 m, com médias climáticas de precipitação pluvial na ordem de 500 mm, temperatura de 26 °C e 50 % de umidade relativa do ar (PROTAS, 2002).

Figura 2. Região do Submédio do Vale São Francisco.



Fonte: Secretaria da Educação do estado do Paraná, 2018.

Esta região destaca-se no cenário do agronegócio nacional como uma das regiões agrícolas mais dinâmicas do Nordeste, devido ao alto rendimento alcançado na produção de uvas. Toda essa visibilidade no agronegócio se deu a partir da década de 80, com o emprego da irrigação e de diferentes técnicas de manejo agrícola, viabilizando a produção de frutas com alto padrão de qualidade, como também pela produção de mais de duas safras de uvas

por ano, destacando-a das demais regiões do Brasil. Tal fato tem levado investidores para essa região nas duas últimas décadas, fomentando a produção de uvas para o consumo *in natura* e para a produção de vinho, principalmente no polo Petrolina-Juazeiro, visando principalmente à exportação de seus produtos para os mercados consumidores europeus e para a América do Norte (LEÃO, 2009; FARIAS, 2011; TOSTES, 2012; COIMBRA DE SÁ, 2015).

Em 2016, o Vale do São Francisco foi o principal responsável pelas exportações de uvas no Brasil, com aproximadamente 34,3 mil toneladas. Os estados de Pernambuco e Bahia são os principais exportadores, com 26,6 e 7,6 mil toneladas, respectivamente. Nesta região, são cultivadas mais de oito variedades de uva (Itália, Benitaka, Red Globe, Crimson, Thompson e Festival, entre outras), incluindo uvas com e sem semente, tendo em vista o mercado externo (CODEVASF, 2016).

2.7 PRINCIPAIS DOENÇAS E PRAGAS QUE AFETAM A VITICULTURA NO VALE DO SÃO FRANCISCO

Algumas doenças têm reduzido drasticamente a produção de uvas no Nordeste brasileiro e, em casos específicos, tem inviabilizado sua produção. Dentre elas, estão as infecções provocadas pelo fungo *Plasmopara viticola*, que representam um dos principais patógenos limitantes para o cultivo da videira, que apresenta maior incidência na primavera, período de maior umidade relativa e de chuva na região. No entanto, outros fungos merecem destaque, como o *Uncinula necator*, *Phakopsora euvisis*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Elsinoe ampelina*, agentes causais do oídio, da ferrugem, podridão seca e antracnose, respectivamente (BARBOSA, 2010).

No que diz respeito aos vírus, a situação é preocupante, sendo relatadas perdas de até 70 % da produção (BARBOSA, 2010). Diversas pragas também causam danos diretos à cultura da uva na região Nordeste, em especial os ácaros (*Polyphagotarsonemus latus*, *Tetranychus urticae*) que infestam cerca de 30 % das folhas da videira, em diferentes fases do desenvolvimento (OLIVEIRA, 2010).

Em relação a doenças bacterianas, até o ano de 1998, apenas bactérias do gênero *Agrobacterium* haviam sido relatadas infectando a cultura da videira. No entanto, ainda sem causar grandes prejuízos nos parreirais das regiões Nordeste e Sudeste. Mais recentemente, a bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola* tem sido apontada como um dos principais patógenos

que acometem a cultura da videira na região Nordeste, causando perdas severas em sua produtividade (SILVA *et al.*, 2012).

2.8 CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA (*Xanthomonas citri* pv. *viticola*)

A bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (*Xcpa*) (GAMA *et al.*, 2018), inicialmente denominada *Pseudomonas viticola* spp. nov. (Nayudu 1972), sendo em seguida reclassificada como *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Young *et al.* 1978) é o agente causal do cancro bacteriano da videira.

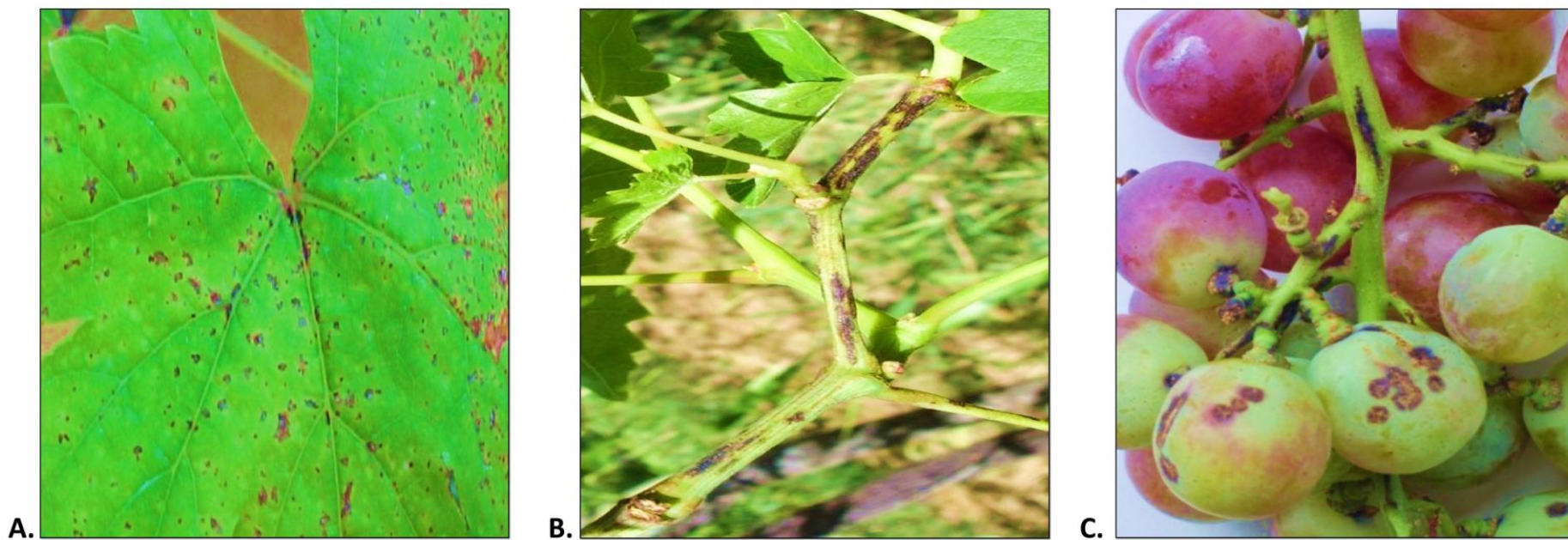
A *Xanthomonas citri* é uma bactéria fitopatogênica aeróbia, gram-negativa, que pertence à subdivisão das proteobactérias (QIAN, 2005). Trata-se de um grupo de bactérias bastante heterogêneas, conhecidas por causar a podridão e o escurecimento de tecidos vasculares. Suas colônias apresentam formas arredondadas, convexas, brilhantes e de bordos lisos, medindo cerca de 0,6 x 1,2 - 2,5 µ. Esta bactéria diferencia-se da maioria das espécies do gênero por não sintetizar o composto xanthomonadina, que confere coloração amarela brilhante, apresentando colônias apigmentadas (NAYUDU, 1972).

O cancro bacteriano da videira foi descrito pela primeira vez na Índia em 1969, onde foram observadas graves infecções em culturas de videira (NAYUDU, 1972). A bactéria foi identificada no Brasil em 1998, no Submédio do Vale São Francisco/ Petrolina-PE, sendo responsável por causar a morte de plantas e consequente eliminação de parreirais (LIMA, 2003). As cultivares sem sementes (introduzidas de forma clandestina e provenientes de várias partes do mundo, incluindo a Índia) e a cultivar Red Globe (proveniente dos Estados Unidos) foram as mais afetadas pela doença, e provavelmente, promoveram a disseminação da bactéria entre as demais cultivares (LIMA, 2003; BARBOSA, 2016).

Os sintomas do cancro bacteriano ocorrem de forma mais intensa no primeiro semestre do ano no Submédio do Vale São Francisco devido às condições climáticas, favorecendo o desenvolvimento da bactéria, uma vez que neste período ocorre uma maior incidência de chuvas, alta umidade relativa e temperatura elevada, propiciando a exsudação de pus bacteriano a partir dos cancrs presentes em ramos, favorecendo a disseminação do patógeno (LOPES e NASCIMENTO, 2004; TOSTES, 2012). Tais sintomas se iniciam com o surgimento de cancrs nas folhas, pequenas lesões necróticas de 1-2 mm de diâmetro e angulares (Figura 3A), com presença ou ausência de halos amarelados distribuídos no limbo foliar (NAYUDU, 1972; TOSTES, 2012; BARBOSA, 2016). Nas folhas, ainda é possível se observar a formação de manchas maiores que podem coalescer, causando a morte de extensas

áreas do limbo foliar, e consequente redução da área fotossintética da planta (NAYUDU, 1972; LIMA, 2000). Posteriormente, é comum o aparecimento de manchas escuras deprimidas e alongadas nas nervuras, pecíolos, ramos e ráquis dos frutos (Figura 3B), as quais evoluem para fissuras longitudinais de coloração negra, conhecidas como cancrios. Nas bagas, ocorre a formação de lesões necróticas arredondadas, desuniformes no tamanho e na cor, além de murcha quando ocorrem grandes cancrios na ráquis (Figura 3C) (NAYUDU, 1972; BARBOSA, 2016). Vale salientar que a intensidade dos sintomas causados pela *Xcpa* pode variar de acordo com a variedade de videira infectada (MALAVOLTA JR, 2003; NASCIMENTO e MARIANO, 2004). No Brasil, a *Xcpa* é classificada como uma praga quarentenária A2, sendo relatada apenas na Bahia, Ceará, Pernambuco e Roraima (LOPES e NASCIMENTO, 2004; BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008).

Figura 3. Sintomas do cancro bacteriano da videira. a) Pontos necróticos nas folhas; b) Formação de cancrios nas ráquis e nos ramos; c) Bagas desuniformes e com pontos necróticos.



Fonte: Defesa vegetal, 2018.

2.9 DISSEMINAÇÃO E MEDIDAS DE CONTROLE DA BACTÉRIA *Xanthomonas citri* pv. *viticola*

A disseminação da *Xcpa* a longas distâncias ocorre, principalmente, pelo transporte de mudas e de material propagativo infectado (NASCIMENTO *et al.*, 2000), bem como pela utilização de ferramentas infectadas em mudas sadias (LOPES e NASCIMENTO, 2004). Além disso, pode ocorrer através de respingos de chuva ou de água de irrigação e por restos culturais, como poda, torção dos ramos, desbrota, raleio, desponete e desfolha. Outra forma de disseminação se dá pela chuva e pela água utilizada para a hidratação dos bacelos sadios e infectados na produção de mudas que estejam no mesmo tanque de hidratação (BARBOSA, 2016).

Dessa forma, durante a estação chuvosa, a disseminação da *Xcpa* ocorre de forma mais acelerada e a infecção pode ser mais acentuada. Vale ressaltar que o vento seco não dissemina a bactéria, sendo necessária a presença de água para que a disseminação ocorra. Todos os agentes que podem lesionar a cultura da videira, como os tratamentos culturais e ventos fortes são importantes, uma vez que facilitam a penetração da bactéria, que por sua vez multiplica-se rapidamente colonizando os espaços intercelulares e atingindo os vasos, ocasionando uma infecção sistêmica (MICHEREFF, 2001).

2.10 CULTIVARES IAC-572 E RED GLOBE

Até o momento, não se tem conhecimento sobre qualquer fonte de resistência contra a *X. citri* pv. *viticola* em videira. Além disso, as cultivares de interesse comercial disponíveis no mercado atualmente, como por exemplo, Red Globe, Itália, Benitaka, Festival e IAC 572 'Jales', têm apresentado elevada sensibilidade ao cancro bacteriano, diferindo apenas quanto ao nível de severidade da doença (LOPES e NASCIMENTO, 2004; NAUE *et al.*, 2014).

A Red Globe, obtida do cruzamento de dois híbridos (*Hunisa* x *Emperor*) x (*Hunisa* x *Emperor* x *Nocera*), é uma das variedades mais cultivadas na região do Vale do São Francisco por possuir boa capacidade de conservação pós-colheita e resistência ao rachamento das bagas em períodos chuvosos e de colheita, o que lhe confere uma alta produtividade. Além disso, tem boa aceitação no mercado devido às suas características morfológicas favoráveis que incluem cachos e bagas grandes, polpa carnuda, sabor neutro e película resistente (EMBRAPA UVA E VINHO, 2018).

A IAC 572 ‘Jales’ é um híbrido resultante do cruzamento do porta-enxerto 101-14 MGT (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*) com a espécie *Vitis caribaea*. Essa cultivar é atualmente um dos porta-enxertos mais utilizados em regiões produtoras de uvas de mesa devido à sua capacidade de adaptação a solos argilosos, arenosos e ácidos, alto enraizamento, estacas com bom índice de pegamento e resistência a diversas pragas e doenças como a antracnose, míldio, fusariose, filoxera e nematoides (EMBRAPA UVA E VINHO, 2018), o que a torna bastante atrativa para uso em programas de melhoramento genético que visem o desenvolvimento de estratégias alternativas envolvendo a ativação do sistema de defesa inato da planta com o intuito de minimizar custos na produção e impactos negativos ao meio ambiente.

2.11 MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL

Há séculos a agricultura vem sofrendo severos danos em sua produção, ocasionados principalmente por fatores bióticos (incluindo principalmente a ação de insetos, fungos, bactérias, vírus e nematoides) e ou abióticos (como seca, salinidade, temperatura, irradiação, entre outros), os quais além de acarretar grandes alterações nos processos fisiológicos dos vegetais causam perdas significativas em sua produtividade e consequentemente, prejuízos financeiros para os grandes e pequenos agricultores (BEGCY et al., 2012). O uso de agrotóxicos é a alternativa mais utilizada no controle de agentes patogênicos, embora o uso desses compostos químicos em muitos casos se torne ineficiente e demasiadamente caro, uma vez que o patógeno pode adquirir resistência, necessitando de doses mais altas do defensivo a cada aplicação, o que representa uma fonte de contaminação tanto para o meio ambiente quanto para o agricultor e o consumidor final (TUZUN e KUC, 1991).

As plantas, devido ao seu hábito de vida sésil, estão constantemente expostas a diversos estresses bióticos e abióticos. Diferentemente dos animais, não apresentam um sistema imune adaptativo e nem células de defesa móveis, como os macrófagos (CHISHOLM et al., 2006). No entanto, ao longo de sua evolução as plantas desenvolveram uma intrincada rede de respostas moleculares menos complexas, porém mais diversificadas, do que o observado em animais (BENKO-ISEPPON et al., 2010, DALIO et al., 2013). Tais mecanismos de defesa vegetal podem atuar antes (barreiras pré-formadas) e/ou depois (barreiras pós-formadas) da interação planta-patógeno (FREEMAN e BEATTIE, 2008, STANGARLIN et al., 2011).

A ativação dos mecanismos de defesa das plantas ocorre mediante uma cascata de transdução de sinais, que se inicia através do reconhecimento de sinais exógenos do patógeno pela planta hospedeira, induzindo uma resposta metabólica. Entre as barreiras físicas pré-formadas encontra-se a formação de tricomas, cutículas, estômatos e vasos condutores (STANGARLIN *et al.*, 2011). As barreiras físicas pós-formadas são representadas pelas biossíntese de lignina e pela formação de papilas, halos, camadas de cortiça, camadas de abscisão e tiloses, que se desenvolvem entre a célula vegetal e o patógeno, retardando ou até mesmo impedindo a penetração do mesmo (CHISHOLM *et al.*, 2006, STANGARLIN *et al.*, 2011).

Nos mecanismos bioquímicos pré-formados, substâncias como fenóis, alcaloides, inibidores proteicos, quitinases e β -1,3 glucanases, estão presentes em plantas sadias em altas concentrações, o que tornam certos tecidos vegetais altamente tóxicos. Por outro lado, nos mecanismos pós-formados, as substâncias encontram-se ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo ativadas mediante a presença do patógeno ou produzidas a partir de um precursor remoto (GARCION *et al.*, 2007).

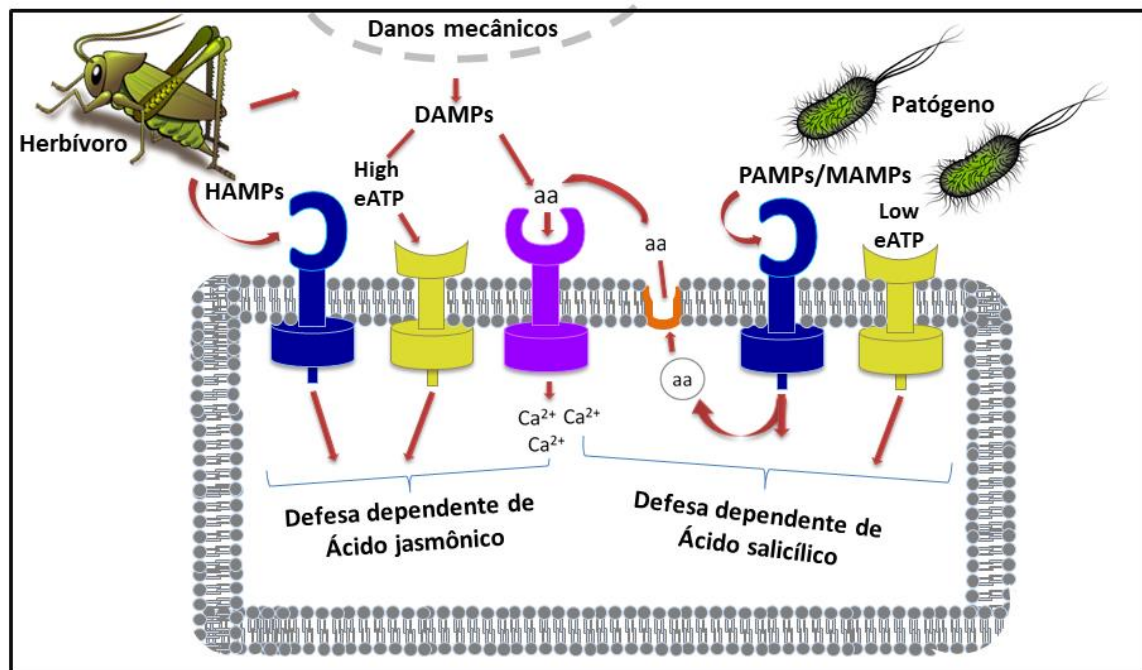
O processo de reconhecimento pelo sistema imune das plantas está dividido em:

a) Quando as proteínas PRRs (*PAMP-recognition receptor*) da classe das RLPs (*receptor-like protein*) e RLKs (*receptor-like kinase*) presentes na membrana plasmática e nas vesículas (endossomos) da célula vegetal reconhecem padrões moleculares inespecíficos associados à PAMPs/MAMPs/HAMPS (*pathogen, or microbe, or herbivorous associated molecular patterns*) e GLR (*glutamate receptor-like*) responsáveis por perceber a presença de DAMPs (*damage associated molecular patterns*) (Figura 4), desencadeando a resposta imune ativada por padrões (PTI, *PAM-triggered immunity*) (MIYA *et al.*, 2007; SCHWESSINGER e ZIPFEL, 2008; FORDE e ROBERTS, 2014). A PTI ocorre através de mudanças estruturais nos receptores, ativando diferentes rotas metabólicas que induzem mudanças fisiológicas relacionadas à interação planta-patógeno. Minutos após o reconhecimento do epítipo, ocorre um aumento intracelular de Ca^{2+} , que provoca a abertura de outros canais de membrana (entrada de H^+ , e saída de K^+ , Cl^- e nitrato), o que leva a uma alcalinização extracelular e uma despolarização da membrana plasmática. Além disso, ocorre estresse oxidativo intracelular (ROS), produção de óxido nítrico (NO) induzindo a fosfatase ácida (PA), ativação de MAP quinases (MAPK), fitoalexinas e outros compostos de defesa, como ácido salicílico (SA) ácido jasmônico (JA), etileno (ET), síntese de compostos antimicrobianos e fatores reguladores da transcrição (GRANT e LAMB, 2006, MIYA *et al.*, 2007; BIGEARD *et al.*, 2015). Esse mecanismo é também conhecido defesa vegetal basal (MIYA *et al.*, 2007).

b) Quando associados à imunidade desencadeada por efetores (ETI, *effector-triggered immunity*), ocorre uma interação altamente específica entre um gene de resistência (Genes *R*) da planta e o produto de um gene de avirulência (*Avr*; *avirulence*) dominante correspondente do patógeno, ativando a reação de hipersensibilidade – HR, a qual confere resistência a uma vasta gama de patógenos (TANG *et al.*, 1999, MOFFET, 2009).

Após a interação planta-patógeno uma complexa rede de vias de transdução envolvendo um grande número de moléculas sinalizadoras é sintetizada, ocorrendo a indução de fluxos iônicos através da membrana plasmática, a produção de compostos reativos de oxigênio (ROS e óxido nítrico (NO)), bem como uma reprogramação da expressão gênica por meio da ação de fatores de transcrição (FTs) e das proteínas quinase. Em seguida, ocorre a síntese de SA, JA, ET, e a síntese de compostos antimicrobianos como as fitoalexinas, culminando na morte celular, rápida e localizada, impedindo a colonização da planta pelo patógeno (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010; SANABRIA *et al.*, 2010).

Figura 4. Modelo especulativo para o papel dos PRRs/GLRs na regulação das respostas de defesa das plantas.



Fonte: Adaptado de Forde e Roberts, 2014.

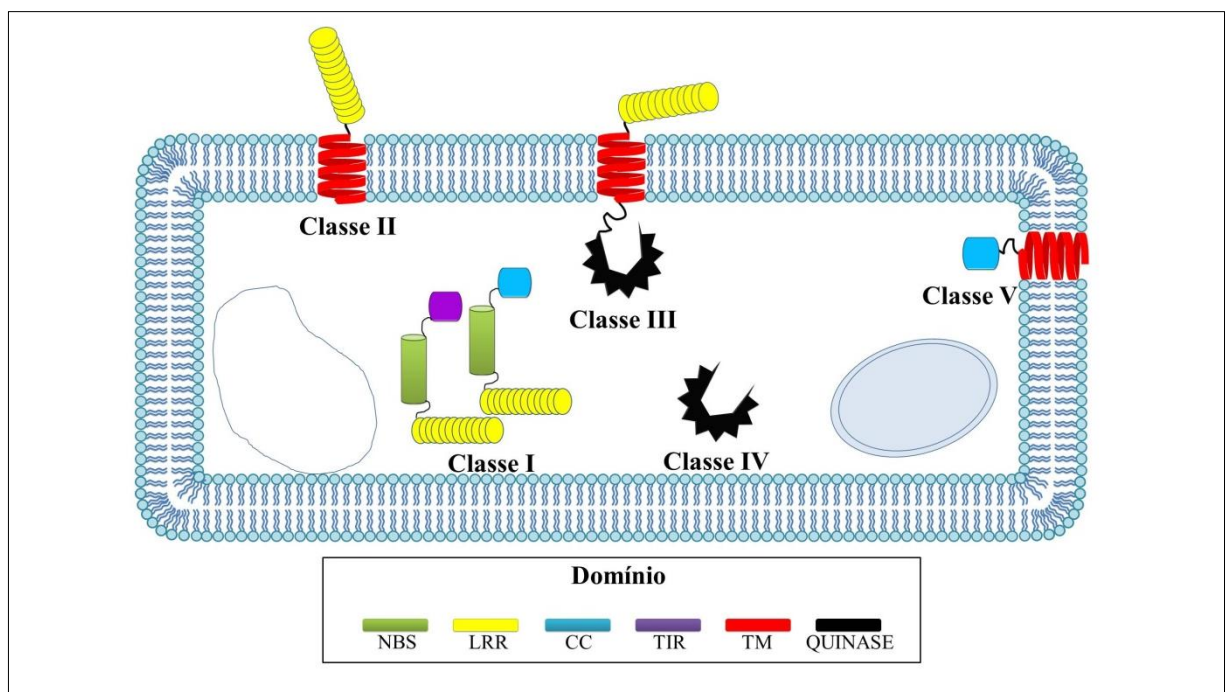
2.12 GENES DE RESISTÊNCIA

Os genes *R* são responsáveis por reconhecer moléculas efetoras intracelulares de patógenos e desencadear respostas de defesa contra a invasão de organismos virais,

bacterianos ou fúngicos, a fim de torná-los inofensivos (DANGL e JONES, 2001). Esses genes participam da imunidade que é comum a plantas e animais. No entanto, a rápida evolução dos sistemas de imunidade de plantas levou a uma enorme diversificação genética, demonstrado que proteínas codificadas por genes *R* exibem estruturas de domínios específicos para desempenhar sua função de reconhecimento dos patógenos, devido a sua interação adequada com as proteínas *Avr* e pela formação de complexos sinalizadores que ativam uma resposta imune inata que impede a proliferação do patógeno invasor (PRYOR e ELLIS, 1993).

Os genes *R* são extremamente conservados e podem ser agrupados em cinco classes (Figura 5), de acordo com o arranjo de seus domínios funcionais (MILLER, 2008).

Figura 5. Representação da localização e estrutura das cinco classes de genes de resistência a doenças de plantas. Classe I: NB-ARC-LRR; Classe II: TM-LRR; Classe III: RLK; Classe IV: STK e Classe V: Coiled-coil.



Fonte: A autora.

Classe I: Caracteriza-se pela codificação de um domínio N-terminal variável, a presença de um domínio central de ligação de nucleotídeos NBS (Sítio de Ligação do Nucleotídeo, *Nucleotide Binding Site*), altamente conservado e que participa da transdução de sinal após a interação planta-patógeno e um domínio LRR, de repetições ricas em leucina (*Leucine Rich Repeats*) que apresenta um número variável de repetições na cauda carboxi-

terminal, sendo responsável pelo reconhecimento específico do patógeno (MEYERS *et al.*, 1999).

A NBS-LRR é considerada a maior classe de genes *R*, a qual representa mais da metade dos genes *R* de plantas. São proteínas grandes (860 – 1900 aminoácidos), consideradas citoplasmáticas, uma vez que não possuem peptídeo sinal, podendo ser subdivididas em duas classes com base em suas características estruturais N-terminais específicas: 1) Classe TNL (TIR-NB-LRR, *Toll Interleucine Receptor*) - que possui na região amino-terminal domínios de sinalização intracelular dos receptores *Toll* semelhantes ao *Toll* de *Drosophila* e aos receptores de Interleucina-1 (IL, *interleukin (IL)-1 receptors*) de mamífero; 2) Classe CNL (CC-NB-LRR, *Coiled-coil-NB-LRR*) – que contêm ao menos um domínio de cauda espiralada na região amino-terminal (MEYERS *et al.*, 1999; MCHALE *et al.*, 2006). Ambas as classes estão associadas à membrana plasmática, sendo a CNL encontrada em linhagens de plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas, enquanto a TNL está restrita apenas as dicotiledôneas (JACOB *et al.*, 2013).

Classe II: Codifica genes que possuem uma proteína ancorada à membrana (TM – *Transmembrane Domain*; Domínio Transmembrana), associada a um domínio LRR extracelular e um motivo C-terminal citoplasmático curto, sem o domínio quinase (KRUIJT *et al.*, 2005). Essa classe é representada pelos genes do tomate *Cf* (*Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* e *Cf-9*), que conferem resistência ao fungo *Cladosporium fulvum*. Acredita-se que esta classe, por não possuir o domínio quinase sinalizador, interage com as RLKs para permitir que ocorra a transdução de sinais no citoplasma (TAIZ *et al.*, 2017).

Classe III: Caracterizada pelo domínio LRR extracelular, uma região TM e por um receptor de serina/treonina quinase (SONG *et al.*, 1995, XU *et al.*, 2006). Esta família é a maior família de genes *R* em *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, com mais de 600 e 1.100 membros da família, respectivamente (SHIU e BLEECKER, 2001). Os genes RLK respondem a uma variedade de sinais extracelulares, incluindo o ataque por agentes fitopatogênicos, destacando-se por apresentar alta resistência a todas as raças da bactéria *Xanthomonas* (SHIU e BLEECKER, 2003).

Classe IV: Conhecida também como classe Quinase ou STK, é representada pelo gene *Pto* de *Lycopersicon esculentum*, que confere resistência à bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, causadora da mancha foliar do tomate (MELOTTO *et al.*, 2004; ANDERSON *et al.*, 2006). Este foi o primeiro gene de resistência clonado, sendo um dos genes *R* melhor caracterizados e estudados (MARTIN *et al.*, 1993; PEDLEY e MARTIN, 2003) em diferentes espécies, como *A. thaliana*, *Phaseolus vulgaris* e *Musa acuminata* (MELOTTO *et al.*, 2004;

JAMES, 2008). A STK caracteriza-se pela presença de uma quinase ativa, citoplasmática, que fosforila resíduos de serina (*ser*) e treonina (*tre*), capaz de interagir com o produto do gene *avrPto* (TANG *et al.*, 1999). Contém 11 subdomínios e 15 resíduos de aminoácidos invariantes característicos de proteínas quinases, além de apresentar regiões de fosforilação conservadas (HANKS e HUNTER, 1995).

Classe V: Representada por proteínas enzimáticas que codificam genes com um domínio de cauda espiralada ancorada à membrana, sendo considerada a classe mais divergente entre os genes *R* (KOBÉ e KAJAVA, 2001). O gene *Hm1* é um dos principais representantes dessa classe, sendo responsável pela resposta de resistência ao fungo *Cochiobolus carbonum*. É o único representante entre os genes *R* que não atua por meio da interação gene-a-gene, uma vez que codifica uma redutase HC-toxina que inativa a toxina HC produzida pelo patógeno (ANDRADE, 2005). Por sua vez, os genes *Mlo* (recessivo) e *RPW8* (que codificam proteínas pequenas (ca. 18-20 kDa), básicas e com um domínio transmembranar N-terminal, bem como uma ou duas bobinas enroladas – CC), conferindo resistência ao oídio (XIÃO *et al.*, 2001, ZHENG *et al.*, 2016).

No entanto, a classificação dos genes *R* pode apresentar variações na literatura, por exemplo, os autores Salvaudon *et al.* (2005) elencam seis famílias gênicas, considerando TIR-NB-LRR e CC-NB-LRR como duas classes distintas. Já Moraes *et al.* (2003), Van Leeuwen *et al.* (2005) e Wanderley-Nogueira *et al.*, (2017) utilizam a mesma classificação descrita nesta revisão, mas alteram a ordem que as famílias gênicas são apresentadas.

2.13 ABORDAGENS BIOTECNOLÓGICAS E OS GENES DE RESISTÊNCIA

Os genes de resistência vêm sendo amplamente utilizados em abordagens biotecnológicas, representando a classe de genes mais utilizada para fins de melhoramento genético visando à resistência aos agentes fitopatogênicos (PANDOLFI *et al.*, 2017). Nos últimos anos, avanços consideráveis de clonagem e transformação genética em plantas vêm sendo realizados em diversas espécies de interesse agrônomo tais como tomate (*Solanum lycopersicum*) e arroz (*Oryza sativa*), entre outras (AFROZ *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2014). No entanto, na maioria dos casos a atividade do gene *R* apresenta funcionalidade taxonômica restrita, ou seja, a maior taxa de sucesso na inserção de genes ocorre quando o gene é oriundo de espécies que pertencem à mesma família (PANDOLFI *et al.*, 2017).

Estudos recentes apontam que os genes *R* também podem apresentar resistência multigênica, como por exemplo, os genes RPW8.1 e RPW8.2 de *Arabidopsis*, que desencadearam resistência à doença fúngica do oídio em plantas transgênicas do tabaco (XIÃO et al., 2003). Porém, a frequente coevolução dos genes *R* de plantas e *Avr* de patógenos torna-se um fator limitante na utilização dos genes de resistência no melhoramento genético dos vegetais, uma vez que os genes *Avr* evoluem mais rapidamente que os genes *R*, dificultando o reconhecimento de novas proteínas efetoras, devido à sua grande variação. Dessa forma, a comunidade científica vem utilizando novas estratégias para o desenvolvimento de fontes de resistência duradoura. Nesse contexto, abordagens integradas de inferências metodológicas (mutagênese direcionada, genotipagem, sequenciamento de genomas, edição de genomas, transgenia, cruzamentos convencionais), bem como o amplo conhecimento da função dos genes *R*, fornecem uma estratégia promissora para o desenvolvimento de variedades com resistência duradoura contra patógenos (PANDOLFI et al., 2017).

2.14 BIOINFORMÁTICA NA ANÁLISE DE DADOS MOLECULARES

Até meados do século passado, geneticistas e químicos tentavam desvendar a natureza química do material genético. Diversas pesquisas foram realizadas envolvendo o descobrimento do DNA e sua estrutura química, a descrição do dogma central da biologia, bem como as estruturas poliméricas de sequências de DNA, RNA e proteínas. A bioinformática ou biologia computacional surgiu na década de 1980, a fim de superar as fronteiras da biologia e das ciências da computação através do desenvolvimento de novas abordagens capazes de promover a análise e a interpretação de dados biológicos robustos, bem como garantir a investigação de novos métodos para a resolução de perguntas complexas (BAXEVANIS, 2001).

A grande diversidade de ferramentas computacionais disponíveis atualmente vem facilitando a interpretação, análise e integralização de dados de genes (genômica), transcritos (transcriptômica), proteínas (proteômica), metabólitos celulares (metabolômica) e quinases (quinômica), entre outras “ômicas” (BENKO-ISEPPON et al., 2017). Com isso, foram desenvolvidos diversos bancos de dados, altamente eficazes para armazenamento e interpretação dos resultados obtidos (EDWARDS e BATLEY, 2004) advindos das diversas ômicas. Dentre estes, o GenBank (Banco de genes) criado pelo Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI; *National Center for Biotechnology Information* -

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), disponibiliza sequências de DNA e proteínas de diversos organismos e classes de genes, bem como ferramentas de análises desses dados. De forma similar, o banco europeu EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) e o japonês DDBJ (*DNA DataBase of Japan*), fornecem informações de dados de nucleotídeos e proteínas, os quais são atualizados com novos dados periodicamente, assim como acontece no GenBank.

Alguns bancos de dados específicos vêm disponibilizando informações de determinadas espécies, grupos de organismos ou classes de genes, a exemplo do Banco de Dados de Genes de Resistência em Plantas (PRGdb; *Plant Resistance Genes Database* - <http://www.prgdb.org>). O PRGdb 3.0 compreende mais de 177.000 sequências de genes de resistência curados, pertencentes a 268 espécies distintas de plantas (OSUNA-CRUZ *et al.*, 2017). Destaca-se também o banco de dados LRRfinder (*Database and searching tool for leucine rich repeats* - <http://www.lrrfinder.com/index.php>), desenvolvido para facilitar a detecção rápida e precisa de repetições ricas em leucina (LRR) em sequências de proteínas de diversos organismos. O LRRfinder é derivado de um grande banco de dados de LRRs únicos e naturais (tLRRdb) que permite a identificação não apenas de sequências de LRR altamente conservadas, mas também aquelas que são mais distintas do consenso comumente descrito LxxLxLxxN/CxL (OFFORD *et al.*, 2010).

Além dos bancos de dados, diversas ferramentas computacionais e programas foram desenvolvidos para identificação e caracterização de genes em diversas espécies de plantas (Tabela 1), tais como em *O. sativa* L. (SHANG *et al.*, 2009), *A. thaliana* (NAWKAR *et al.*, 2016), *V. vinifera* (VENTURINI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2018), *Eleusine coracana* (NEGI *et al.*, 2017) e *Glicine max* (MARCOLINO-GOMES *et al.*, 2017), entre outras.

Tabela 1. Principais ferramentas de caracterização bioinformática.

Ferramenta	Função	Referência
BLAST	Alinhamento local	Altschul <i>et al.</i> , 1990
CD-Search/ Pfam	Análise de domínio conservado	Marchler-Bauer <i>et al.</i> , 2004, Finn <i>et al.</i> , 2016.
MEME	Análise de motivos	Bailey <i>et al.</i> , 2015
ClustalW	Alinhamentos múltiplos	Sievers <i>et al.</i> , 2015
JvirGel	Predição de ponto isoelétrico e peso molecular	Hiller <i>et al.</i> , 2006
MEGA v.7	Análise genética e evolutiva	Kumar <i>et al.</i> , 2016
JPred4	Predição de estrutura secundária	Drozdetskiy <i>et al.</i> , 2015
SWISS-MODEL	Modelagem comparativa	Arnold <i>et al.</i> , 2006

CLUSTER	Análise de expressão <i>in silico</i>	Eisen <i>et al.</i> , 1998
TreeView	Visualização de imagens	Page, 1996

2.15 EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

As respostas das plantas aos diferentes estresses envolvem a ação de muitos genes e mecanismos moleculares e/ou bioquímicos complexos, de forma que múltiplas vias de transdução de sinais podem ser ativadas para regular a expressão gênica sob tais estresses (CHINNUSAMY, SCHUMAKER e ZHU, 2004). Dessa forma, o estudo da expressão gênica diferencial representa um importante passo para a biologia molecular, contribuindo para a caracterização de perfis transcricionais contrastantes (diferentes genótipos e/ou condições experimentais) e para identificação de genes-chave, responsáveis por processos biológicos de interesse (GUIMARÃES *et al.*, 2005).

Na última década, foram registrados os maiores avanços nas tecnologias de expressão gênica, baseados no sequenciamento e contagem de transcritos, tais como EST – *Expressed Sequence Tag* (ADAMS *et al.*, 1991), que compreende uma abordagem de processamento com cobertura relativamente baixa e geralmente não quantitativa, o SuperSAGE – *Super Serial Analysis of Gene Expression* (VELCULESCU *et al.*, 1995), a qual envolve análises seriadas de expressão gênica, e a tecnologia de RNA-Seq – *RNA Sequencing* (Morin *et al.*, 2008), a qual vem sendo extensivamente utilizada atualmente.

A tecnologia de RNA-Seq (sequenciamento direto de RNA de alta performance), embora seja relativamente recente, emergiu como uma técnica revolucionária na criação de dados de expressão gênica com embasamento estatístico robusto, fornecendo alta cobertura e reprodutibilidade, ampla visão da extensão e da complexidade de transcriptomas eucariotos. Além disso, essa técnica apresenta diversas vantagens importantes sobre as tecnologias existentes, como por exemplo, a detecção de genes com baixos níveis de expressão, maior acurácia na quantificação da expressão, identificação de novos promotores e isoformas, entre outras (WANG *et al.*, 2009). Essa tecnologia vem sendo bastante empregada em estudos de expressão gênica em diversas plantas, como, por exemplo, *A. thaliana* (LORAINE *et al.*, 2013), *P. vulgaris* (PATEL *et al.*, 2014), *P. sativum* (ALVES-CARVALHO *et al.*, 2015), *V. vinifera* (IIC *et al.*, 2018) e *Tagetes erecta* (FENG *et al.*, 2018), entre outros.

A fim de validar os resultados gerados por meio das diferentes tecnologias de sequenciamento, a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) apresenta-se como uma

técnica “padrão-ouro” para estudos de expressão gênica diferencial, uma vez possui a capacidade de detectar e mensurar com elevada sensibilidade, precisão e especificidade, a amplificação de uma determinada amostra (DORAK, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2010).

Na RT-qPCR a amplificação de uma determinada amostra é monitorada ciclo a ciclo, através de sinais fluorescentes que são emitidos, detectados e transformados em valores numéricos. A fluorescência emitida apresenta correlação direta com o número de cópias amplificadas do gene-alvo (DNA amplificado). Essa técnica é dividida em três fases principais: (I) a linha de base na qual as amostras não emitiram fluorescência suficiente para detecção; (II) a fase log em que a quantidade de produtos de PCR aumenta em progressão geométrica a cada ciclo e (III) a fase platô onde não há mais aumento no número de produtos na reação. O momento em que é captado o primeiro sinal de fluorescência (ou seja, início da amplificação gênica) denomina-se limiar de detecção (*threshold*), e corresponde ao número mínimo de ciclos para amplificação da sequência gênica-alvo presente em cada amostra. O Cq (*Quantification cycle*) é o número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência gênica-alvo, acima do ruído de fundo (*background*). O Cq é proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de expressão do gene-alvo em uma determinada amostra. Dessa forma, quanto menor for o número inicial do Cq obtido para um determinado gene-alvo, comparativamente com outro gene, maior será a amplificação e expressão desse gene-alvo (DORAK, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2010).

A seleção de genes de referência para a normalização dos dados de expressão é considerada uma etapa crucial da técnica, pois, demanda uma escolha criteriosa acerca da estabilidade de expressão desses genes em diferentes condições de análise, uma vez que sua escolha inadequada pode alterar os resultados da expressão relativa de um determinado gene de interesse (GUTIERREZ *et al.*, 2008). Nesse sentido, diversos softwares estatísticos, como o GeNorm, NormFinder e Bestkeeper, foram desenvolvidos com o intuito de indicar entre um conjunto de genes de referência candidatos, aqueles que serão mais adequados para a condição avaliada. Em videira, vários trabalhos estão sendo desenvolvidos envolvendo a avaliação de genes de referência em diferentes estágios de desenvolvimento (REID *et al.*, 2006; KATAYAMA-IKEGAMI *et al.*, 2016), tipos de tecidos (FACCIOLI *et al.*, 2010; GONZÁLEZ-AGÜERO *et al.*, 2013; TASHIRO *et al.*, 2016) e em condições de estresses abióticos e bióticos (GAMM *et al.*, 2011; COITO *et al.*, 2012; SELIM *et al.*, 2012; MONTEIRO *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2014). No entanto, até o nosso conhecimento, não existem estudos abordando a seleção e validação de genes de referência em videira infectada com a bactéria *X. citri*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Selecionar e validar genes de resistência (*Resistance*; *R*) diferencialmente expressos e associados às vias de defesa contra o ataque de patógenos, avaliando padrões de expressão, características estruturais e funcionais em *Vitis vinifera* L., visando a aplicações em melhoramento e biotecnologia com vistas à resistência ao cancro bacteriano da videira.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de expressão *in silico* de genes relacionados aos processos de defesa vegetal a partir das bibliotecas de RNA-Seq geradas de tecidos foliares de genótipos resistentes e susceptíveis ao patógeno;
- Desenhar *primers* para amplificação, clonagem e sequenciamento dos produtos obtidos, permitindo inferências sobre sua estrutura genômica, análise de ORF, predição funcional e modelagem molecular;
- Validar genes candidatos através da técnica de RT-qPCR;
- Gerar um banco de dados com genes promissores para uso em projetos de melhoramento (seleção assistida) e inferências biotecnológicas (transgenia).

4 RESULTADOS

Artigo a ser submetido à Revista *Genetics and Molecular Biology*

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE RESISTÊNCIA EM VIDEIRA SOB ESTRESSE BIÓTICO

Jéssica Barboza da Silva¹, Roberta Lane de Oliveira Silva¹, João Pacífico Bezerra-Neto¹, Flávia Figueira Aburjaile¹, Flávia Czekalski de Araújo¹, Nataniel Franklin de Melo², Ana Maria Benko-Iseppon¹

¹ Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Depto. Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, Brazil

Autor para correspondência:

Ana Maria Benko Iseppon, Universidade Federal de Pernambuco, ¹Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Av. Prof. Moraes Rego 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil. Telefone: 55-81-2126-7816; Fax: 55-82-2126-8522; E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

Resumo

O gênero *Vitis* destaca-se entre as espécies frutíferas mais cultivadas mundialmente, apresentando grande importância econômica mundial. Apesar dos altos rendimentos alcançados em sua produtividade, as espécies de *Vitis* tem apresentado susceptibilidade a vários agentes patogênicos, em especial a bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, considerada um dos mais sérios fatores limitantes para a produção de uvas de mesa e vinho em Pernambuco. O presente trabalho objetivou identificar, caracterizar e validar genes de resistência (*R*) promissores e relacionados aos processos de defesa vegetal em acessos contrastantes quanto à resistência a *X. citri* para aplicação em programas de melhoramento genético da cultura. Dessa forma, foi conduzido um experimento em casa de vegetação visando à geração de bibliotecas de RNA-Seq de videira usando clones da cultivar 'Red Globe' (considerada susceptível ao cancro bacteriano) e do híbrido IAC-572 (considerado moderadamente resistente ao cancro bacteriano). As plantas foram inoculadas com uma suspensão bacteriana em três pontos de infiltração por folha. As coletas foram realizadas em quatro tempos distintos (90 minutos, 6 horas, 24 horas e 48 horas após a inoculação). O RNA total foi extraído, purificado e enviado para construção das bibliotecas de RNA-Seq e sequenciamento utilizando a plataforma HiSeq2500 (Illumina), e paralelamente foram convertidos em cDNA. Após a seleção de sequências sondas obtidas no banco de dados Uniprot e na literatura, os genes de interesse foram minerados por meio de alinhamentos via tBLASTn contra o transcriptoma de videira. As sequências candidatas foram anotadas, traduzidas e caracterizadas por meio de diferentes ferramentas de bioinformática. A partir das análises *in silico*, foi possível identificar 894 genes de resistência, contemplando todas as classes, sendo os RLP, STK e NBS mais representativos no transcriptoma de *Vitis*. De forma geral, os genes de resistência apresentaram características ácidas, peso molecular altamente variável e localização subcelular predominante no citoplasma (NBS e RPW8), parede celular (RLP), membrana plasmática (RLK) e núcleo (STK). A seleção dos genes de referência com base na análise de estabilidade em *softwares* específicos indicou um conjunto funcional de normalizadores para as duas cultivares de *Vitis*, sendo os três melhores (TRU5, TCBP e 60SRP) utilizados para a validação via RT-qPCR dos genes de interesse (NBS-LRR12, RLK, STK e STK4), selecionados nas bibliotecas de RNA-Seq. Com os alvos NBS-LRR12 e STK4 apresentando altos níveis de expressão com 48 horas de estresse na cultivar resistente e não significativos na cultivar susceptível, indicando uma resposta genótipo específica, embora tardia, mas que sugere a participação na resposta de defesa da planta frente ao patógeno. Os resultados obtidos neste estudo contribuíram para um melhor entendimento das características moleculares dos genes de resistência e sua participação no processo de defesa em videira, apresentando potencial para desenvolvimento de marcadores moleculares e aplicação em programas de melhoramento genético da cultura.

Palavras-chave: *Vitis vinifera*; Defesa vegetal; *Xanthomonas citri*; Transcriptoma; RT-qPCR.

Introdução

O gênero *Vitis* é formado por aproximadamente 50 espécies, com destaque para as videiras americanas (*V. labrusca* L, *V. bourquina* Munson e *V. rotundifolia*) e a europeia (*V. vinifera*) que são utilizadas tanto para consumo *in natura* quanto como matéria prima para fabricação de diversos subprodutos, incluindo sucos, vinhos, uvas-passas e geleias, agregando valor à cultura (LEÃO *et al.* 2009). Devido à sua fácil propagação assexual, diversidade morfológica e genética, o gênero apresenta cerca de 14.000 cultivares. No entanto, o número de cultivares vem crescendo, devido a programas de melhoramento genético em andamento em diversos países (LEÃO *et al.*, 2008; GIOVANNINI, 2014).

No Brasil, a videira é cultivada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, tendo sua produção destinada principalmente à fabricação de vinhos e à comercialização de uvas de mesa. A região Nordeste, especialmente o submédio do Vale do São Francisco, Pernambuco tem se destacado das demais regiões produtoras por permitir ao viticultor a colheita de mais de duas safras por ano através de diversas técnicas de manejo e irrigação. Além disso, essa região destaca-se também pela alta qualidade das uvas e vinhos produzidos, o que tem favorecido a rápida expansão da área cultivada e gerado empregos diretos e indiretos (PEDRO JÚNIOR e SENTELHAS, 2003). No entanto, apesar dos altos rendimentos alcançados em sua produtividade, a cultura tem apresentado susceptibilidade a diversos patógenos virais, bacterianos e fúngicos (BARBOSA, 2010; OLIVEIRA, 2010).

Entre os agentes patogênicos mais frequentes que afetam a produção de uvas no Brasil, destaca-se a bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (GAMA *et al.*, 2018), causadora do cancro bacteriano da videira (MALAVOLTA JÚNIOR *et al.*, 1999). Essa bactéria é considerada uma praga quaternária A2 (Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008) tendo sido identificada no Submédio do Vale do São Francisco em plantios da cultivar *Red Globe*. Acredita-se que sua introdução ocorreu através de estacas contaminadas provenientes da Índia, sendo que sua disseminação na região rapidamente se tornou um grave problema fitossanitário e um dos mais sérios fatores limitantes para a produção da cultura na região (MALAVOLTA JÚNIOR *et al.*, 1999; LOPES e NASCIMENTO, 2004). Os principais sintomas envolvem a formação de lesões necróticas nas folhas e a prevalência de cancos provenientes da obstrução do tecido vascular nos ramos, gavinhas e talos já formados. Tais lesões impedem o fluxo de nutrientes e comprometem o crescimento vegetativo e reprodutivo da videira (ARAUJO e ROBBS, 2000).

Por estarem constantemente expostas a situações de estresse, as plantas desenvolveram ao longo de sua evolução diversos mecanismos de defesa que incluem a formação de barreiras histológicas, a produção de metabólitos secundários, a síntese de enzimas hidrolíticas e de compostos sinalizadores (BONAS e LAHAYE, 2002; CHISHOLM *et al.*, 2006; MOFFET, 2009). Por outro lado, vários patógenos coevoluíram e desenvolveram a capacidade de produzir proteínas efetoras específicas que interagem com proteínas e outros compostos do hospedeiro e conseguem quebrar as barreiras de proteção dos vegetais, favorecendo a sua colonização, sobrevivência e o estabelecimento da doença (GRANT *et al.*, 2006, CHISHOLM *et al.*, 2006).

Entre as principais famílias gênicas que participam do processo de defesa vegetal destacam-se os genes de resistência (R, *Resistance*), as proteínas relacionadas à patogênese (PR, *Pathogen Related*) e os fatores de transcrição, que em conjunto participam de todo este processo, atuando desde o reconhecimento, até a sinalização e a regulação gênica. No entanto, apesar do avanço obtido nas últimas décadas acerca dos mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na interação planta-patógeno, ainda há lacunas significativas no conhecimento da função e especificidade desses genes, de suas proteínas e das implicações para programas de melhoramento genético vegetal.

Análises globais da expressão gênica têm contribuído e aumentado a compreensão de redes regulatórias associadas à adaptação e à tolerância aos diversos tipos de estresses. A redução dos custos de sequenciamento de nova geração tem favorecido a geração de dados de transcriptômica com alta cobertura e excelente qualidade. Tal cenário permitiu a geração de dados aprimorados sobre o genoma e a expressão gênica diferencial de várias espécies agronomicamente importantes. Para *V. vinifera*, os transcriptomas disponíveis são relacionados com estresses bióticos, envolvendo fungos fitopatogênicos como *Uncinula necator*, *Plasmopara viticola*, *Eutypa lata*, *Botrytis cinerea* e *Erysiphe necator*, que limitam a produção em regiões frias e temperadas (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; POLESANI *et al.*, 2010; CAMPS *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2015; AGUDELO-ROMERO *et al.*, 2015; AMRINE *et al.*, 2015). Até o nosso conhecimento, não existem abordagens transcriptômicas envolvendo infecções bacterianas, as quais possuem particularidades tanto no que tange ao seu reconhecimento, quanto à indução de resposta localizada e sistêmica.

O presente estudo visa identificar e avaliar a expressão de genes da superfamília R em genótipos contrastantes de *Vitis* spp. sob inoculação com a bactéria *X. citri* pv. *viticola*, comparativamente a controles não inoculados, inferindo sobre seu papel na defesa vegetal. Candidatos selecionados foram validados por meio da técnica de RT-qPCR, especialmente

quanto à sua expressão em diferentes tempos pós-inoculação, visando entender o papel de genes *R* em genótipos contrastantes.

Metodologia

Material vegetal e ensaio experimental

O experimento visando à geração de bibliotecas de RNA-Seq de videira foi conduzido nos telados da Embrapa Semiárido (Petrolina - Brasil) usando clones da cultivar ‘Red Globe’ (susceptível a *Xcpa*) e do híbrido IAC572, usado como ‘cavalo’ no processo de enxertia. O híbrido IAC572 resultou de um cruzamento entre o porta-enxerto 101-14 MGT (*Vitis riparia* X *Vitis rupestris*) e *Vitis caribaea*, sendo reconhecido como o único genótipo moderadamente resistente ao cancro bacteriano, destacando-se que não há fontes de resistência em *V. vinifera* (LOPES e NASCIMENTO, 2004; NAUE *et al.*, 2014).

As plantas foram propagadas via estaquia a partir de cada matriz anteriormente citada, sendo cultivadas em potes plásticos de 5 L, com substrato composto por proporções iguais de solo do tipo argiloso e vermiculita, sob condições controladas [$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 5\%$ de umidade relativa; e com 12 h/dia de luz natural (Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD) = $1.5 \times 10^3 \mu\text{moles}$)].

Após 30 dias de cultivo, as plantas sadias de ambos os acessos foram selecionadas e divididas em dois grupos: (1) Controle – plantas inoculadas com água destilada esterilizada; (2) Tratamento - plantas inoculadas com a bactéria *X. citri* (isolado *Xcv117*). A inoculação foi realizada utilizando seringas hipodérmicas sem agulhas, na parte abaxial das primeiras três folhas, injetando aproximadamente 20 μL de suspensão bacteriana em três pontos de infiltração por folha, conforme metodologia descrita por Gama *et al.* (2011). As coletas foram realizadas em quatro tempos distintos após a inoculação: (1) 90 minutos; (2) 6 horas; (3) 24 horas e (4) 48 horas após a inoculação. O tecido foliar foi coletado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C . Foram coletadas três réplicas biológicas para cada cultivar e tratamento.

Extração de RNA, síntese de cDNA, construção das bibliotecas de RNA-Seq e sequenciamento

A extração do RNA total foi realizada a partir da associação do protocolo CTAB-Acetato (ZHAO *et al.*, 2012) e do Kit SV Total RNA Isolation System (Promega) utilizando 200 mg de tecido foliar e tratamento com DNase (visando remover qualquer contaminação genômica). As amostras foram analisadas quanto à sua pureza, concentração e integridade em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific), fluorímetro Qubit® (Life Technologies) e Bioanalyser (Agilent Technologies), respectivamente. Os RNAs purificados foram enviados para a construção das bibliotecas de RNA-Seq e sequenciamento no Centro de Genômica Funcional ESALQ/USP utilizando a plataforma V4 2 X 100 HiSeq2500 (Illumina), paired end. A síntese de cDNA foi realizada empregando-se o GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) seguindo instruções do fabricante. A montagem do transcriptoma foi feita pelo programa Vv (GRABHERR *et al.*, 2011) e a análise estatística dos genes diferencialmente expressos através dos programas Edge-R (ROBINSON *et al.*, 2009) e DESeq 2 (LOVE *et al.*, 2014). Os genes *R* de interesse pertencentes às diferentes classes foram minerados e caracterizados através de ferramentas de bioinformática.

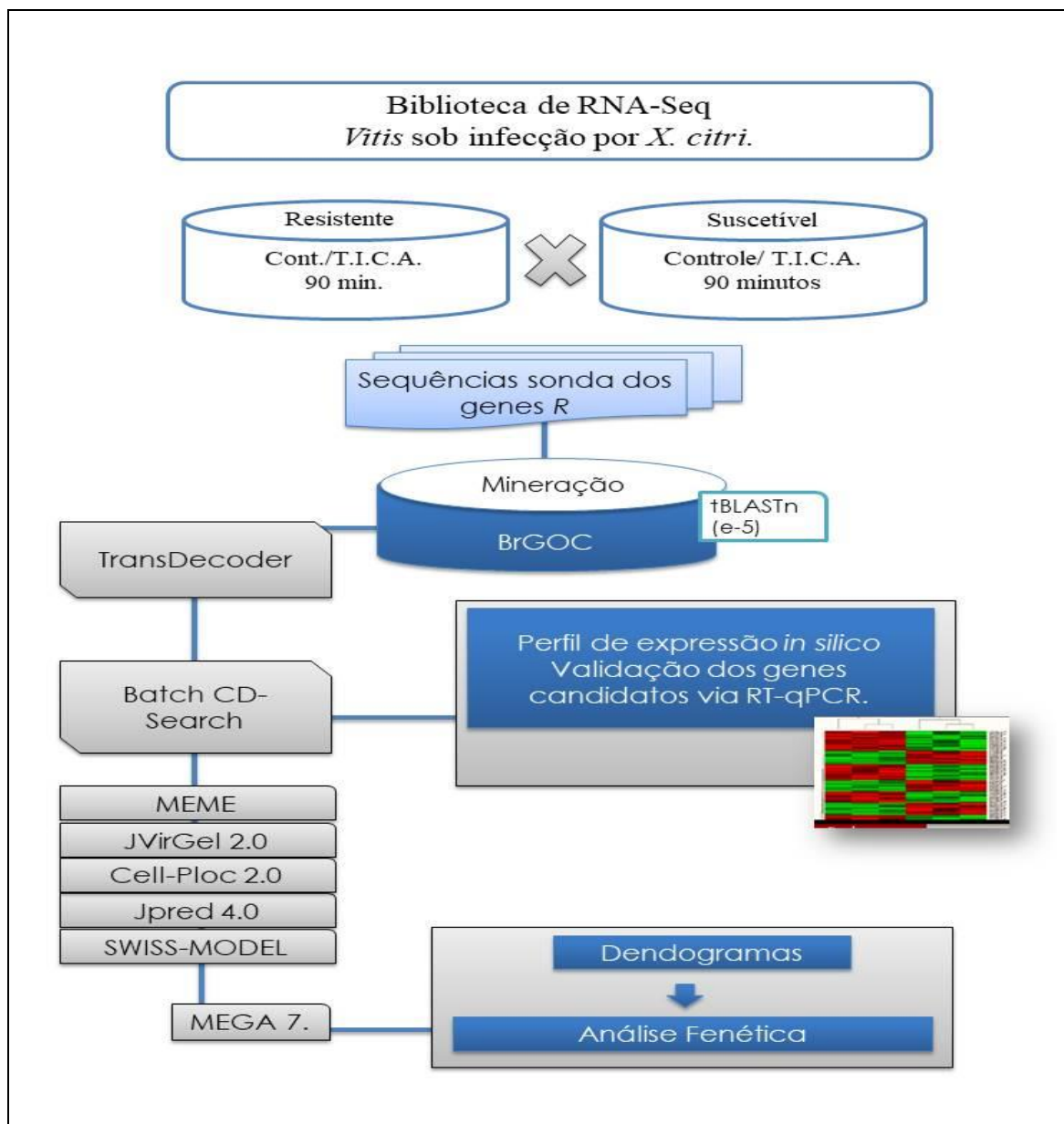
Identificação e caracterização das sequências

A rotina bioinformática está apresentada no fluxograma da Figura 1. As sequências-sonda (*seed sequences*) correspondentes aos genes de interesse foram selecionadas com base na literatura especializada e em bancos de dados públicos. Foi realizado um tBLASTn contra o RNA-Seq de videira, visando buscar candidatos, com cut-off e-value $\geq$ a e-5, culminando na geração de um banco de dados local de sequências nucleotídicas. As sequências obtidas foram anotadas contra o banco não redundante (nr) do NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) por meio da ferramenta BLASTx. Posteriormente, foi identificado o quadro de leitura aberta através do ORF-Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Dessa forma, foi gerado um banco local de proteínas. A busca por domínios e motivos conservados foi feita com o auxílio do Batch CD-search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) e do MEME (<http://memesuite.org/tools/meme>), respectivamente.

O peso molecular e o ponto isoelétrico das sequências proteicas dos candidatos foi predito a partir do JVirGel 2.0 (HILLER *et al.*, 2006) e a localização subcelular por meio do Cell-PLoc 2.0 (CHOU e SHEN, 2010). Dendrogramas foram gerados com base em análises

fenéticas, com o auxílio do programa MEGA v.7 (KUMAR *et al.*, 2016). Em seguida, foram construídos *heatmaps* com base nos valores de modulação (*Fold Change*, FC) das bibliotecas de RNA-Seq, os quais foram visualizados pelo programa TreeView (PAGE, 1996). As proteínas caracterizadas foram submetidas a uma análise de predição de estrutura secundária utilizando a ferramenta JPred4 (DROZDETSKIY *et al.*, 2015). Por fim, foi realizada a ancoragem no genoma de videira disponível no *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

Figura 1. Fluxograma das análises de bioinformática para a identificação e caracterização da família gênica dos genes *R* no genoma expresso de *Vitis* spp.



Seleção de Genes de Referência

Foi realizada uma busca na literatura por artigos que tratassem especificamente da seleção de genes de referência (GRs) em videira e que envolvessem condições de estresse biótico (preferencialmente) ou abiótico com o objetivo de selecionar candidatos previamente validados e que apresentassem boa estabilidade em diferentes cultivares, tecidos, fases de desenvolvimento e situações de estresse. Adicionalmente, também foram selecionados candidatos com expressão constitutiva nas bibliotecas de RNA-Seq geradas no presente estudo.

Após a triagem inicial, os genes de referência candidatos foram classificados de acordo com os softwares GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) e BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), que também indicaram o número de GRs necessários para uma normalização ótima. Os dados brutos de Cq foram utilizados como dados de entrada para a avaliação no Bestkeeper e NormFinder. Para o GeNorm, os dados foram transformados conforme recomendações indicadas por Vandesompele *et al.* (2002). A avaliação no GeNorm e NormFinder é baseada no valor de estabilidade (M), de forma que o menor valor de M representa uma expressão mais estável. O BestKeeper identifica os genes mais estáveis a partir do Coeficiente de correlação de Pearson, calculando o desvio padrão (SD) e Coeficiente de Variação (CV) entre todo o conjunto de dados.

Desenho de *primers* e análise da expressão diferencial por RT-qPCR

Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram desenvolvidos por meio dos programas Primer3 Plus (ROZEN e SKALETSKY, 2000) e Primer-BLAST do NCBI, utilizando as seguintes modificações nos parâmetros padrões: conteúdo de GC 50 %, tamanho do fragmento entre 70-150 pares de bases (bp), temperatura de Melting entre 40 °C e 60 °C e junção exon-exon (Tabela 1). As validações por RT-qPCR seguiram as orientações do MIQE (*The Minimum Information for Publication of Quantitative RealTime PCR Experiments*) (BUSTIN *et al.*, 2009). As reações foram realizadas em equipamento CFX96 Touch Real-Time (Bio-Rad), utilizando triplicatas biológicas e técnicas (amostrais) e detecção por SYBR Green. Os valores de eficiência de amplificação ($E = 10^{-1/\text{slope}}$), coeficiente de correlação (R), interception (y) e slope foram calculados pelo método da curva padrão utilizando diluições seriadas de um pool equimolar contendo uma alíquota de todas as amostras a serem

analisadas. Genes normalizadores e alvos de interesse (diferencialmente expressos nas condições estudadas) foram validados via RT-qPCR e analisados pelo método do $\Delta\Delta C_t$. A seleção dos genes candidatos foi realizada com base na sua regulação e valores de modulação (FC) verificados nas bibliotecas de RNA-Seq. Para as análises de expressão relativa, foram utilizados três genes de referência para a normalização dos resultados.

Tabela 1. Genes de referência e genes alvos e seus números de acesso, anotações e sequências dos *primers*.

Gene (Nº de acesso)	Fonte*	Função predita	Descrição	Sequência dos <i>primers</i> (forward)	Sequência dos <i>primers</i> (reverse)
Genes de referência					
ACT (AY847627)	Borges <i>et al.</i> , 2014	Proteína estrutural do citoesqueleto	Actina	GACTACCTACAACCTCCATCAT	TCATTCTGTCAGCAATACCA
CNX (Vv_DN47984_c0_g1_i3)	BrGoc	Dobramento de proteínas	Calnexina	ATTTTGGCTTCCATGTGGTC	CCAGCTTACAAGGGGAAATG
CCR4 (Vv_DN45671_c0_g1_i4)	BrGoc	-	Fator 1 associado a CCR4 homólogo 9	TTCATCAGGTGCTTCACGTC	CGGGACTTGTGTGTAACGAG
CYP (ES880796)	Borges <i>et al.</i> , 2014	Defesa, apoptose celular	Ciclofilina	ACAGCCAAGACCTCGTG	GCCTTCACTGACCACAAC
HSP (Vv_DN55886_c0_g2_i2)	BrGoc	Dobramento e estabilização de proteínas	Proteína de choque térmico 90 kDa	CGTACTTCGCCATTGATGAG	TCCATACCAGAACCCTCCAG
LOC1 (Vv_DN37842_c0_g1_i2)	BrGoc	Desconhecida	LOC100263809 não caracterizado	GGCCGTTACTCAAGCTCAAC	CGCTCTGACAACTCATTTGG
TCBP (XM_002285876)	González-Agüero <i>et al.</i> , 2013	-	Proteína 1 subunidade β do complexo T	AGACAGTGATTGACAGCCGAGTT	ATCCCTGCGTGGCTTTCTCC
TIF3 (Vv_DN45729_c0_g1_i2)	BrGoc	-	Fator de iniciação 3 subunidade D da tradução em eucariotos	GGGTGATAAGGGTCTTGCTG	TGAACAAGTGCAACCTCCTG
TRU5 (XM_002283586)	Tashiro <i>et al.</i> , 2016	<i>Splicing</i> , transcrição	Tiorredoxina U5 snRNP	CAATGTACGAGCTTTATGACCCATC	CAGTTGATCTTGTGTGTTTCCAG
60SRP (XM_002270599.1)	Moteiro <i>et al.</i> , 2016	Componente estrutural do ribossomo	Proteína L18 do RNA ribossomal 60 S	ATCTACCTCAAGCTCCTAGTC	CAATCTTGCTCCTTTCTCT
Genes alvos					
NBS12 (Vv_DN56550_c2_g1_i3)	BrGoc	Defesa	nucleotide binding site–leucine-rich repeat	TAGGCCAACAGTGAACGGAG	TCCGGGACTTCTGAAAATTCG
RLK (Vv_DN54351_c0_g2_i4)	BrGoc	Defesa, sinalização	Receptor-Like Kinase	GAAAGAGCACCCAACTCTGG	CTGCAAGATGCTTCAACGAC
STK (Vv_DN54025_c0_g1_i17)	BrGoc	Defesa, sinalização	serine/threonine kinase	TCCACCCTACCAATCATAAG	CTACTTCGGTGCCTTCTTCC
STK4 (VV_DN44568_c0_g1_i6)	BrGoc	Defesa, sinalização	serine/threonine kinase	TCTGTGATCGCTTCCTATGG	GGCCTTGATGCTTGAATAGC

*Database BrGOC (Brazilian Grape Omics Consortium)

Resultados

Extração de RNA e Síntese de cDNA

Foram avaliados diferentes métodos de extração de RNA visando estabelecer um protocolo eficiente e com qualidade suficiente para a construção das bibliotecas de RNA-Seq e síntese de cDNA: (1) CTAB-LiCl (Gambino *et al.*, 2008); (2) CTAB-Acetato de Amônio (Zhao *et al.*, 2012); (3) SV Total RNA Isolation System Kit (Promega); (4) Trizol (Invitrogen); (5) Trizol Modificado (Invitrogen); (6) RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen); (7) Qiazol (Qiagen); (8) Solução salina (Xu *et al.*, 2010); (9) Qiazol (Qiagen) + Solução salina; (10) CTAB-Acetato de Amônio + Kit Promega. Todos os protocolos testados foram realizados conforme metodologia descrita na literatura ou de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações.

Foi verificado que os métodos 1 e 2 foram eficientes no isolamento do RNA total, sendo possível visualizar as duas bandas de RNA ribossomal (28S e 18S), porém, exibindo quantificações muito baixas após o tratamento de DNase (Dados não mostrados). Nos métodos de 4 a 9 não foram visualizadas bandas, indicando que nenhum RNA foi extraído (Dados não mostrados).

Apesar da difícil visualização de algumas amostras no gel de agarose (Figura 2), o único método eficiente e que apresentou um bom rendimento nas quantificações foi o CTAB-Acetato de Amônio + Kit Promega, sendo suficiente para atender a quantidade necessária para a construção das bibliotecas de RNA-Seq (5 µg de RNA total) e síntese de cDNA (5 µg de RNA total para 100 µl de cDNA). Além disso, a relação de absorbância (A₂₆₀/280) indicou que a maioria das amostras também apresentou o padrão de pureza desejado (entre 1,8 e 2,1) como apresentado na Tabela 2. Posteriormente, as amostras referentes ao tempo escolhido para o sequenciamento (90 minutos) foram validadas em Bioanalyser apresentando RIN superior a sete em 10 das 12 amostras analisadas (Figura 3).

Os cDNAs gerados foram testados em PCR convencional e RT-qPCR visando confirmar a eficiência da conversão. Todas as amostras amplificaram e exibiram produtos específicos, considerando o gel de agarose e a curva de *melting* (Dados não mostrados), confirmando que a conversão ocorreu eficientemente e que as mesmas estavam aptas para uso nas reações de expressão relativa.

Figura 2. Extração de RNA de tecidos foliares de duas cultivares de *Vitis* contrastantes quanto à resistência a *Xanthomonas citri*. CA = Controle; TICA = Tratamento inoculado com cepa agressiva; 90' = Tempo de 90 minutos após a inoculação.

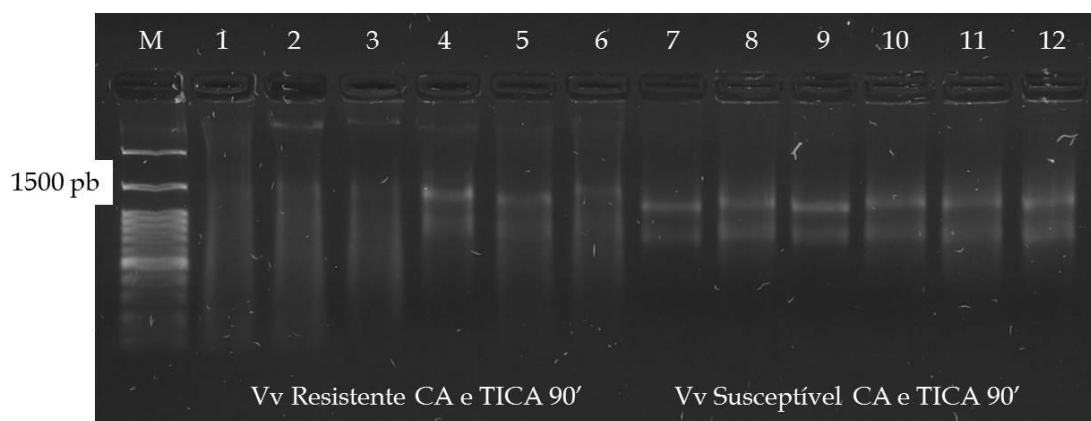


Figura 3. Eletroferogramas de amostras de RNA total de duas cultivares de *Vitis* apresentando o RIN (*RNA Integrity Number*) para cada amostra analisada no tempo de 90 minutos após a inoculação. Destacado em verde: CA = Controle, azul: TICA = Tratamento inoculado com cepa agressiva, para cultivar IAC-572 e destacado em laranja: CA = Controle, vermelho: TICA = Tratamento inoculado com cepa agressiva, para cultivar Red Globe.

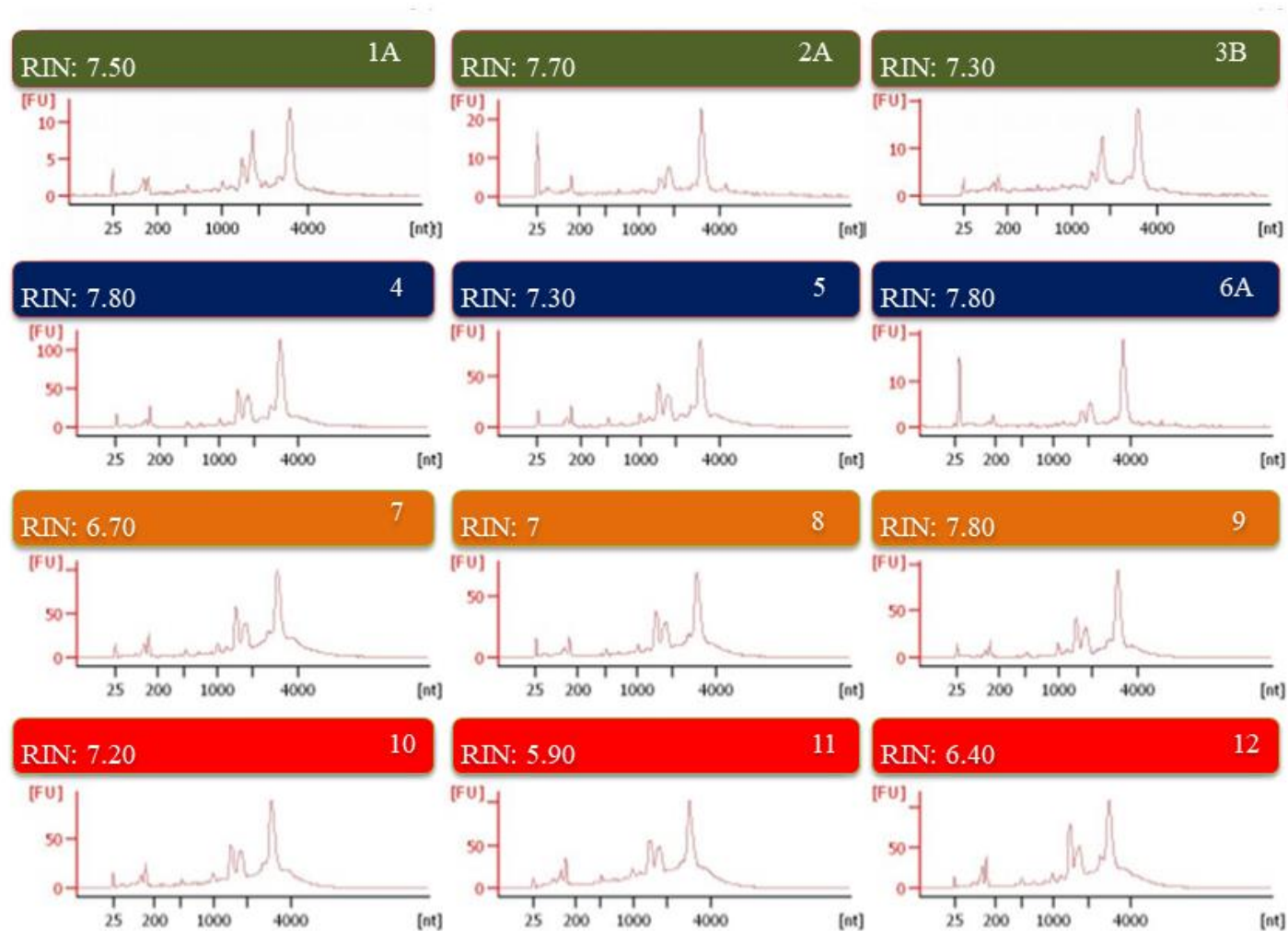


Tabela 2. Quantificação das amostras de *Vitis* utilizando Qubit e NanoDrop

Amostras	Identificação	Qubit (ng/μl)	NanoDrop (ng/μl)	Absorbância (A260/280)	Score no Bioanalyser
1	Controle 90' (1) IAC-572	114	169,9	2.04	7.5
2	Controle 90' (2) IAC-572	65.8	166,7	1.58	7.7
3	Controle 90' (3) IAC-572	91.4	304,8	1.83	7.3
4	TICA. 90' (1) IAC-572	686	714,9	1.90	7.8
5	TICA 90' (2) IAC-572	418	444,6	2.03	7.3
6	TICA 90' (3) IAC-572	54.2	118,7	1.70	7.8
7	Controle 90' (1) Redglobe	592	628,4	2.03	6.7
8	Controle 90' (2) Redglobe	520	591,6	2.01	7
9	Controle 90' (3) Redglobe	200	458,7	1.95	7.8
10	TICA. 90' (1) Redglobe	670	716,6	1.99	7.2
11	TICA 90' (2) Redglobe	920	879,1	2.03	5.9
12	TICA 90' (3) Redglobe	958	820,8	2.09	6.4
13	Controle 6 h (1) IAC-572	334	316,3	2,08	1,36
14	Controle 6 h (2) IAC-572	200	180,2	2,03	1,64
15	Controle 6 h (3) IAC-572	250	296,6	2,01	1,32
16	TICA. 6 h (1) IAC-572	372	141,4	1,62	1,04
17	TICA. 6 h (2) IAC-572	200	471,1	1,67	1,2
18	TICA. 6 h (3) IAC-572	216	225,9	1,86	1,45
19	Controle 6 h (1) Redglobe	232	321,3	1,99	1,66
20	Controle 6 h (2) Redglobe	350	274,7	2,06	1,79
21	Controle 6 h (3) Redglobe	350	267	2,06	1,78

Amostras	Identificação	Qubit (ng/μl)	NanoDrop (ng/μl)	Absorbância (A260/280)	Score no Bioanalyser
22	TICA 6 h (1) Redglobe	230	314	2,02	1,75
23	TICA 6 h (2) Redglobe	264	211,2	2,05	1,66
24	TICA. 6 h (3) Redglobe	542	622,7	2,08	1,46
25	Controle 24 h (1) IAC-572	320	416,1	1,99	1,5
26	Controle 24 h (2) IAC-572	332	520,5	1,96	1,65
27	Controle 24 h (3) IAC-572	408	414,2	1,85	1,33
28	TICA. 24 h (1) IAC-572	418	373	1,91	1,35
29	TICA. 24 h (2) IAC-572	300	365	2,02	1,01
30	TICA. 24 h (3) IAC-572	226	312	2,06	1,06
31	Controle 24 h (1) Redglobe	350	428,1	2,08	1,98
32	Controle 24 h (2) Redglobe	260	336,1	2,07	1,84
33	Controle 24 h (3) Redglobe	308	371,1	2,07	1,84
34	TICA. 24 h (1) Redglobe	284	343,3	2,07	1,62
35	TICA. 24 h (2) Redglobe	394	342,4	2,09	1,94
36	TICA. 24 h (3) Redglobe	332	265,4	2,09	1,93
37	Controle 48 h (1) IAC-572	412	352,2	1,96	1,64
38	Controle 48 h (2) IAC-572	336	306,4	1,96	1,69
39	Controle 48 h (3) IAC-572	298	279,9	2,04	1,11
40	TICA. 48 h (1) IAC-572	266	289,9	2,09	1,82
41	TICA 48 h (2) IAC-572	414	629,2	1,96	1,05
42	TICA 48 h (3) IAC-572	230	323,1	1,88	0,85
43	Controle 48 h (1) Redglobe	274	141,7	2,01	1,75

Amostras	Identificação	Qubit (ng/μl)	NanoDrop (ng/μl)	Absorbância (A260/280)	Score no Bioanalyser
----------	---------------	---------------	------------------	------------------------	----------------------

44	Controle 48 h (2) Redglobe	370	225	2,02	1,27
45	Controle 48 h (3) Redglobe	174	215,2	1,9	1,43
46	TICA. 48 h (1) Redglobe	270	231,5	2,02	1,68
47	TICA 48 h (2) Redglobe	280	241	2	1,55
48	TICA 48 h (3) Redglobe	268	290,7	2,05	1,8

TICA = Tratamento inoculado com cepa agressiva; 90' = Tempo de 90 minutos após a inoculação; (1, 2, 3) = Réplicas Biológicas; IAC-572 = Cultivar resistente; Red Globe = Cultivar susceptível.

Mineração dos candidatos e análise de domínios

Para mineração dos genes candidatos foram utilizadas 47 sequências-sonda (*Seed sequences*) selecionadas no estudo de Barbosa-da-Silva (2005) e no banco de dados do Uniprot (UniProt Consortium, 2016), contemplando as espécies *S. lycopersicum*, *A. thaliana*, *L. usitatissimum*, *O. sativa* cv. *Japonica*, *T. aestivum*, *C. clementina* e *S. acaule*, para todas as classes de genes *R* (ANEXO A).

As sondas foram confrontadas via tBLASTn contra o banco de dados de RNA-Seq de videira, retornando 200.090 sequências relacionadas às cinco classes de genes *R*. Após a retirada de redundâncias, foram obtidas 10,444 sequências, as quais foram traduzidas em aminoácidos, retornando um total de 11,852 sequências proteicas, como resultado da tradução nos seis frames de leitura (Tabela 3).

Tabela 3. Mineração e tradução dos candidatos a genes de resistência no genoma expresso de *V. vinifera*.

Classe	Transcritos sem redundância (%)	ORFs*	VCO** (aa)
NBS-LRR	2,610	2,368	100 – 1825
RLP	1,658	1,774	99 – 1240
STK	2,681	3,570	100 – 1425
RLK	3,490	4,136	99 – 1276
RPW8	8	8	164 – 825

*ORFs: Proteína; **VCO: Variação no comprimento da proteína.

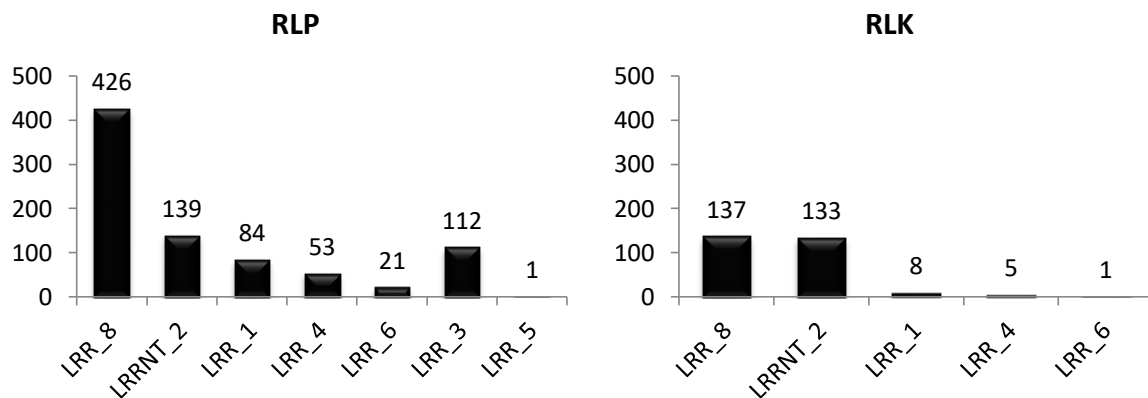
Os transcritos traduzidos tiveram seus domínios analisados, sendo verificado que 629 estavam relacionados à classe NSB-LRR, com 484 sequências apresentando quebra na região N e/ou C-terminal e 145 apresentando domínio NBS íntegro. Após essa análise, foi possível classificar as sequências em quatro grupos: 1 – RX-CC-NBS-LRR (com 67 proteínas); 2 – NBS-LRR (com 23 proteínas); 3 – RX-CC-NBS (com 22 proteínas) e 4 – NBS (com 33 proteínas).

Os transcritos que codificavam para RLP e RLK foram submetidos a uma nova análise de domínio devido à presença do domínio PLN00113, uma vez que esse domínio pode ser constituído tanto por um agrupamento do domínio quinase mais o domínio LRR, como também apenas pelo domínio LRR ou quinase isolada, conforme mostrado no Quadro 1.

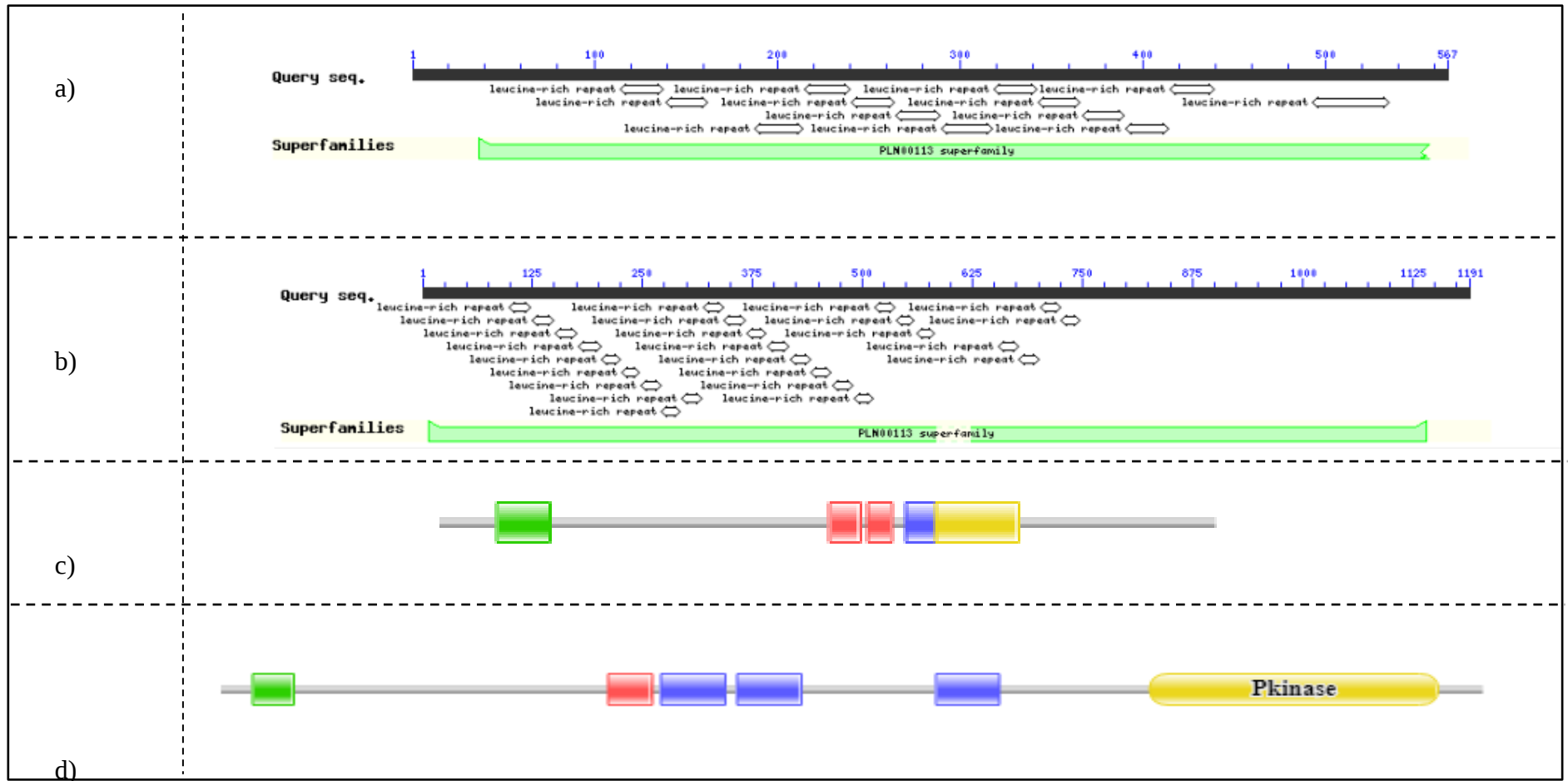
Após a análise, foram obtidos 325 candidatos para RLP e 510 para RLK. Para RLP, observou-se que essas proteínas contemplaram diferentes domínios do tipo LRR, dentre eles

os LRR_8, LRRNT_2 e o LRR_1 foram os mais abundantes e os LRR_4, LRR_6, LRR_3, LRR_5 foram pouco representativos. Já para RLK, 404 sequências apresentaram quebra na região N e/ou C-terminal para os domínios Pkinase e Pkinase_Tyr e 106 apresentaram domínio completo. Dessas, 91 possuíam o domínio Pkinase e 17 possuíam o domínio Pkinase_tyr, com predominância para os domínios LRR_8 e LRRNT_2 e poucos genes codificantes para LRR_1, LRR_5 e LRR_6 (Gráfico 1), semelhantemente ao verificado nos genes RLP.

Gráfico 1. Variação do domínio LRR nas subclasses dos genes de resistência RLP e RLK.

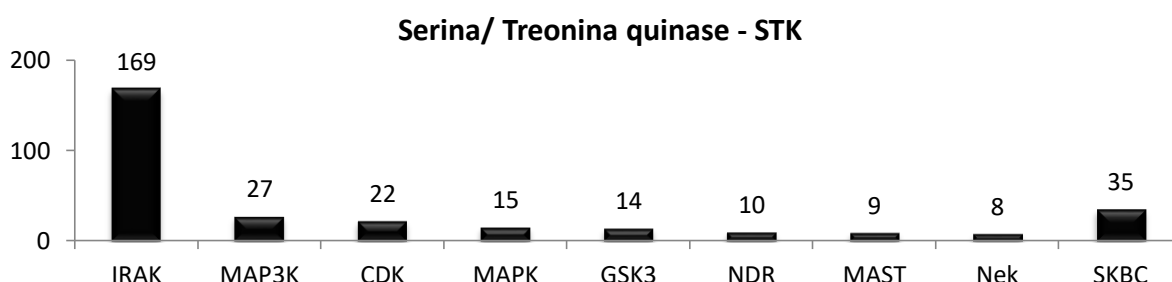


Quadro 1. Análise de domínio realizada no CD-Search, a) RLP - VV_DN56869_c1_g1_i2 (RLP_2) e b) RLK - VV_DN55439_c0_g1_i1 (RLK_2). Resultado da análise de domínio via Pfam, c) RLP - VV_DN56869_c1_g1_i2 (RLP_2) e d) RLK - VV_DN55439_c0_g1_i1 (RLK_2).



Para os transcritos retornados de STK, 312 apresentaram domínio conservado íntegro, com 84 apresentando quebra na região N- terminal, 78 na região C-terminal e 182 na região N/C-terminal. Esses candidatos foram agrupados em 22 subclasses com base em seus domínios catalíticos únicos. A subfamília STK_IRAK foi a mais representativa (54 % das sequências), seguida da MAP3K (8,65 %) e CDK (7,05 %), além de 14 subfamílias que foram reunidas no grupo SKBC (subfamílias quinase com baixo número de cópias) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Subclasses dos genes STK identificadas em *Vitis* spp.



Foram identificados sete candidatos relacionados com a classe RPW8, com um deles apresentando quebra na região N-terminal e os demais, apresentados abaixo, possuindo domínio completo (Tabela 4).

Tabela 4. Genes candidatos da classe RPW8.

Classe V	ID	Nº	Domínio CD-Search					
			RPW8		NBS		LRR	
			Início	Final	Início	Final	Início	Final
RPW8	VV_DN37311_c0_g1_i2	RPW8_1	18	145	*	*	*	*
	VV_DN53148_c0_g2_i1	RPW8_2	04	121	*	*	*	*
	VV_DN49654_c0_g1_i1	RPW8_3	04	133	*	*	*	*
RPW8-NBS	VV_DN53118_c0_g1_i1	RPW8_4	09	132	189	450	*	*
RPW8-NBS-LRR	VV_DN53118_c0_g1_i4	RPW8_5	09	132	189	450	183	821
	VV_DN53118_c0_g1_i3	RPW8_6	09	132	189	450	183	821

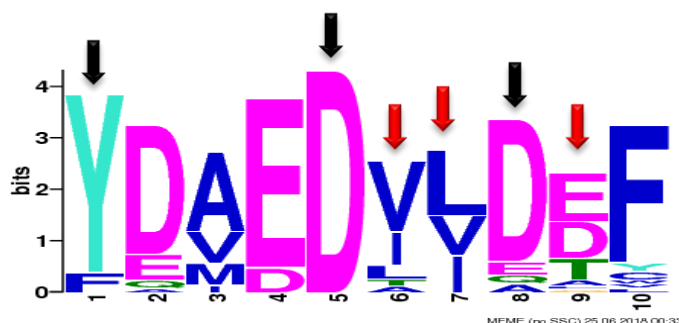
* Domínio ausente

Análise de motivos conservados em *Vitis* spp.

Para identificar os motivos conservados característicos dos genes *R*, os candidatos de cada classe foram submetidos a um alinhamento múltiplo por meio do ClustalW.

Na classe I, para o domínio *Coiled-coil*, íntegro em 39 sequências, foi identificado o motivo YDAEEDVLDEF <TYR-ASP-ALA-GLU-GLU-ASP-VAL-LEU-ASP-GLU-FEN>, na sequência consenso (Figura 4), com o segundo e o terceiro resíduo de aspartato conservados em 100 e 82 % das sequências analisadas, respectivamente, apresentando maior variação nos resíduos de valina (53 %), leucina e glutamato (46 %), ressaltados em setas vermelhas na Figura 4.

Figura 4. Motivo presente no domínio *coiled-coil*. Sequência consenso gerada a partir do programa MEME. Destaque para setas pretas com os aminoácidos mais conservados e as setas vermelhas com os aminoácidos mais variáveis do motivo.



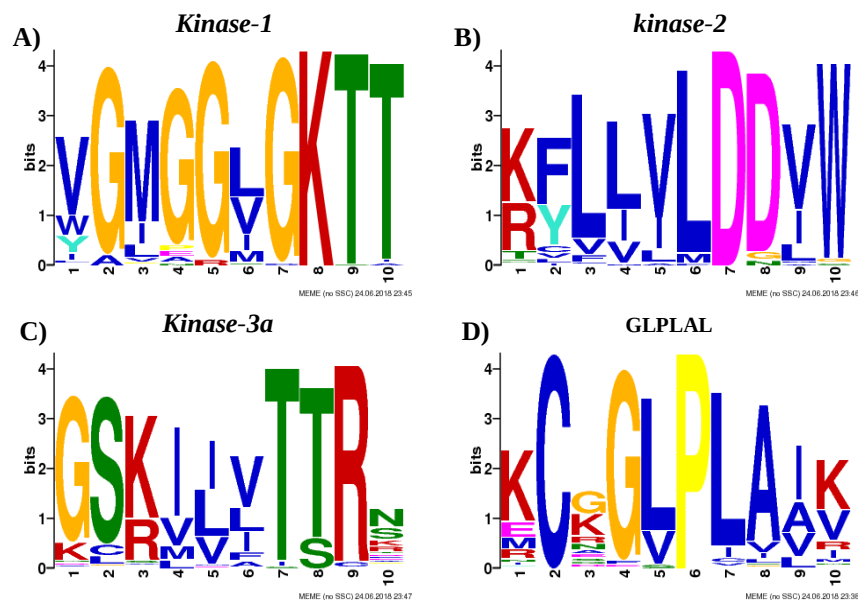
Para o domínio NBS foram identificados quatro motivos conservados: *P-loop* (*kinase-1*), *Kinase-2*, *Kinase-3a* e GLPL (*kinase-3*), sendo o *kinase-1*, *kinase-2* e o GLPL os mais conservados quanto ao tipo e ordem dos aminoácidos presentes. O motivo *P-loop* (*Kinase-1*) foi caracterizado pela sequência consenso de aminoácidos GGLGKTTLA <GLY-GLY-LEU-GLY-LYS-THR-THR-LEU-ALA>, estando os aminoácidos xGxGKTTLx presentes em 82,6 a 90,3 % das sequências, com os demais, representados em x, apresentando variações (Figura 5A).

O motivo *kinase-2* caracterizado pelos aminoácidos KFLVLDDVW <LYS-PHE-LEU-LEU-VAL-LEU-ASP-ASP-VAL-TRP> apresentou o primeiro resíduo de aspartato altamente conservado nas 145 proteínas analisadas, com os aminoácidos xxLxxLDDxW, presente em mais de 84 % das sequências (Figura 5B).

Kinase-3a se caracterizou pela sequência de aminoácidos GSKILVTRN <GLY-SER-LYS-ILE-LEU-VAL-THR-THR-ARG-ASN>, com os resíduos de serina, o primeiro resíduo de treonina e o resíduo de arginina conservados em até 80,2 % das sequências, os resíduos de lisina e a

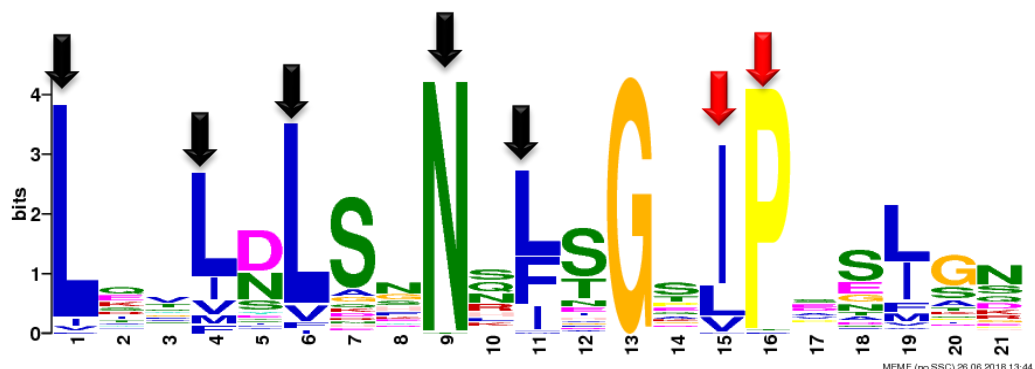
segunda treonina presentes em mais de 66 % e os demais altamente variáveis (Figura 5C). O motivo GLPL foi altamente conservado em 60 % das sequências. O resíduo de prolina estava presente em 144 sequências. Aproximadamente 24 % das sequências apresentaram variação em um aminoácido do motivo <(G/F)(V/S)LPL> enquanto uma sequência apresentou apenas os últimos resíduos <LA> (Figura 5D).

Figura 5. Motivos presentes no domínio NBS.



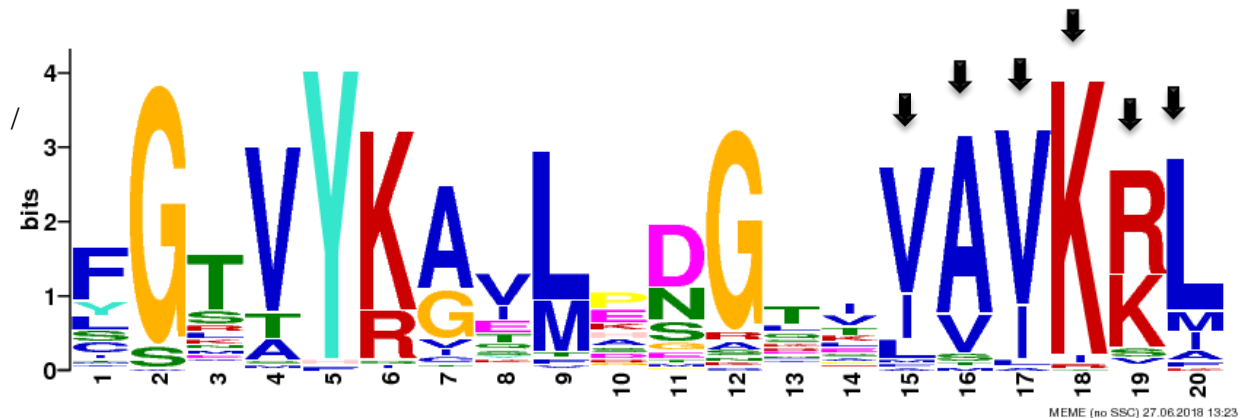
No domínio LRR, de RLP e RLK, foi observado um padrão bastante frequente de repetição de leucinas: LxxLxLxxNxL, onde L corresponde à presença do aminoácido leucina, sendo frequentemente alternada pelos aminoácidos isoleucina, valina, metionina e fenilalanina. N representa a asparagina, enquanto X representa qualquer outro aminoácido (Figura 6).

Figura 6. Motivo conservado no domínio LRR de *Vitis* spp. Destaque para setas pretas com os aminoácidos mais conservados e as setas vermelhas com os aminoácidos mais variáveis do motivo.



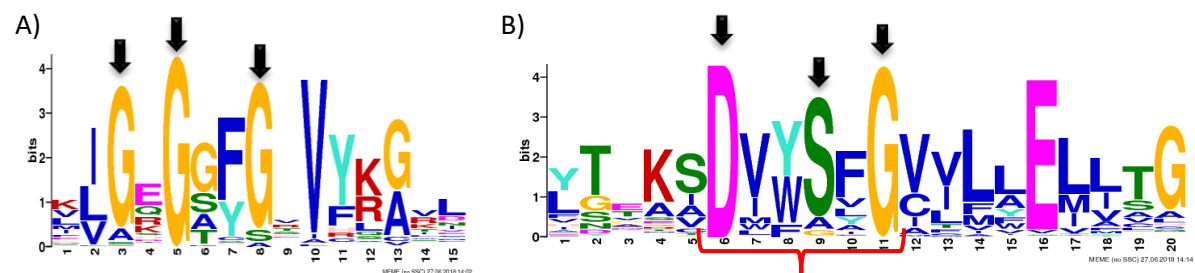
Para o domínio *Pkinase* foi identificado o motivo VAVKRL <VAL-ALA-VAL-LYS-ARG-LEU> (Figura 7), sendo o primeiro resíduo de valina (V) apresentou uma maior variação, no conjunto de sequências analisadas. Já o resíduo de arginina (R) sendo comumente substituído por lisina (K), um aminoácido com as mesmas propriedades polares. Por sua vez, a lisina apresentou o maior índice de conservação, estando presente em 93,4 % das sequências.

Figura 7. Motivo presente no domínio *Pkinase*. Destaque para setas pretas com os aminoácidos mais conservados e as setas vermelhas com os aminoácidos mais variáveis do motivo.



Para as proteínas STK foram identificados os motivos *P-loop* <GXGXXG>, onde X representa qualquer outro aminoácido, altamente conservado em 64 % das sequências, sendo cerca de 31 % dessas sequências representadas por pelo menos uma glicina nessas posições (Figura 8A). O motivo <DVYSFG> foi identificado em 30.76 %, com predominância nas demais sequências dos resíduos <D> Aspartato (100 %), <S> Serina (84,6 %) e <G> Glicina (99 %) (Figura 8B).

Figura 8. Motivos presentes no domínio STK, gerada a partir do programa MEME. Destacado em setas pretas os aminoácidos mais conservados.



Além dos motivos, foram identificados resíduos de aminoácidos altamente conservados para a classe STK (Tabela 5).

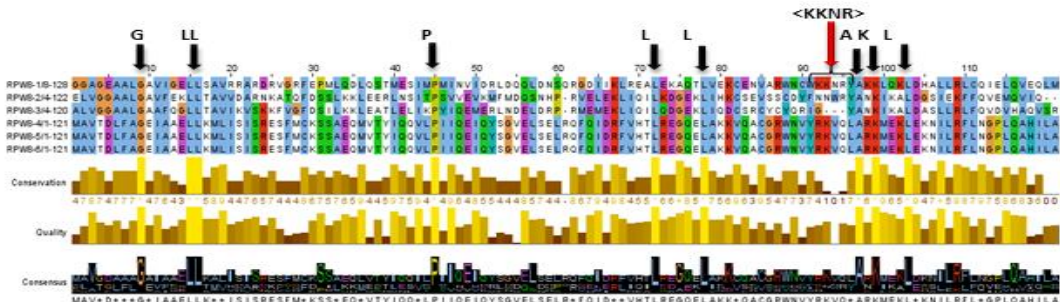
Tabela 5. Resíduos de aminoácidos conservados na classe IV (STK) de *Vitis* spp.

Posição (ClustalW)	Aminoácido	(%)	Posição (ClustalW)	Aminoácido	(%)
905	Glicina (G)	80,8	1074	Aspartato (D)	97,8
907	Glicina (G)	93,6	1076	Lisina (κ)	94,2
910	Glicina (G)	83,7	1079	Asparagina (N)	99,0
912	Valina (v)	84,6	1081	Leucina (L)	94,9
935	Alanina (A)	91,7	1093	Lisina (κ)	81,4
937	Lisina (κ)	95,2	1096	Aspartato (D)	99,7
963	Glutamato (E)	95,2	1097	Fenilalanina (F)	98,1
973	Histidina (H)	88,1	1098	Glicina (G)	98,1
977	Valina (v)	81,4	1165	Treonina (T)	83,7
1014	Glutamato (E)	84,6	1172	Tirosina (Y)	87,2
1061	Glutamato (E)	99,7	1175	Prolina (P)	100
1072	Histidina (H)	84,6	1176	Glutamato (E)	98,7
1073	Arginina (R)	91,3	1200	Glutamato (E)	94,2

% Porcentagem das sequências que possuíam o aminoácido indicado.

Para os seis candidatos que codificaram para RPW8, com domínio completo, foram identificados resíduos de aminoácidos neutros e básicos conservados em todas as sequências analisadas e resíduos básicos conservados de 66 a 100 % nas posições 31, 74, 80, 88, 94, 99, 100, 105, 109 e 116. Além disso, a sequência RPW8-1 (VV_DN37311_c0_g1_i2) foi a única que apresentou o motivo KKXR <KKNR> (Figura 9).

Figura 9. Alinhamento múltiplo das sequências previstas para RPW8 em *Vitis* spp. As setas pretas indicam os resíduos de aminoácidos e a seta vermelha destaca o motivo <KKNR>.

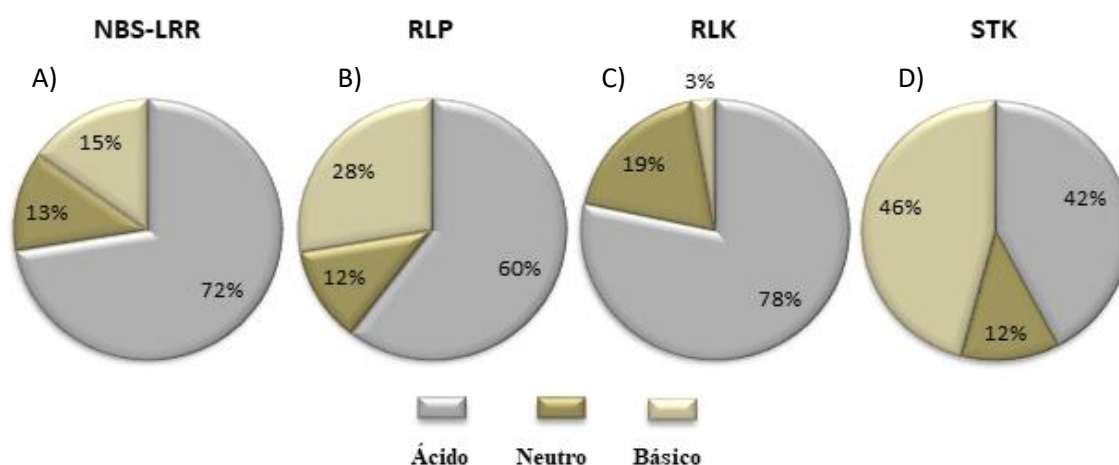


Características físico-químicas preditas para os genes *R*

O ponto isoelétrico observado no gel 2D para as proteínas NBS apresentou uma variação de pH de 4,81 e 9,46, com 72 % dos candidatos apresentando característica ácida (Gráfico 3A). O peso molecular variou entre 22,14 a 164,46 kDa (ANEXO B). Para RLP, o ponto isoelétrico variou de 3,2 a 11,04, com 60 % das proteínas apresentando características ácidas (Gráfico 3B). Já o peso molecular variou de 10,84 a 144,9 kDa (ANEXO C).

Os genes codificadores para RLK apresentaram variação no ponto isoelétrico de 5 a 8,6, com 78 % apresentando características ácidas (Gráfico 3c). O peso molecular variou de 11 a 134,7 kDa (ANEXO D). Os candidatos para STK apresentaram ponto isoelétrico entre 4,2 e 10,3, com 46 % apresentando características básicas e 42 % ácidas (Gráfico 3D). O peso molecular variou de 24,7 a 157,6 kDa (ANEXO E).

Gráfico 3. Ponto isoelétrico verificado em *Vitis* spp. para os genes *R*.



Para RPW8, os candidatos apresentaram ponto isoelétrico entre 5,84 e 8,86 e peso molecular variando de 18,91 a 94,01 kDa. Os candidatos estavam associados ao núcleo, citoplasma e cloroplasto, como descrito na tabela 6.

Tabela 6. Características físico-químicas e localização subcelular para RPW8.

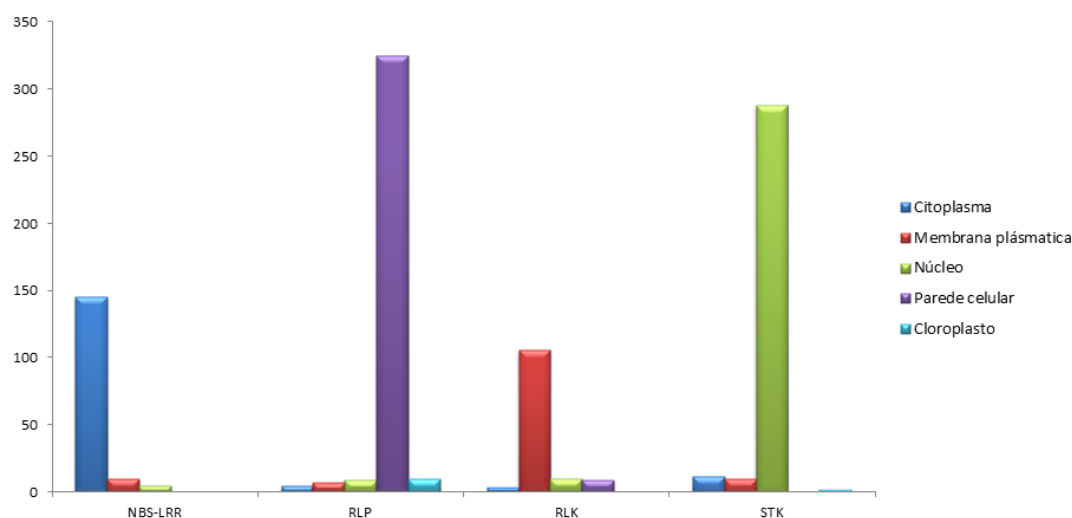
Classe V	ID	Nº	Comprimento (aa)	p.I	p.M	Localização subcelular
RPW8	VV_DN37311_c0_g1_i2	RPW8-1	164	8,86	18,92	Núcleo
	VV_DN53148_c0_g2_i1	RPW8-2	223	7,65	24,92	Citoplasma / Núcleo
	VV_DN49654_c0_g1_i1	RPW8-3	185	6,93	20,79	Núcleo
RPW8-	VV_DN53118_c0_g1_i1	RPW8-4	527	6,41	59,53	Cloroplasto /

NBS						Citoplasma
RPW8-NBS-LRR	VV_DN53118_c0_g1_i4	RPW8-5	825	5,84	93,96	Citoplasma
	VV_DN53118_c0_g1_i3	RPW8-6	825	5,84	94,00	Membrana celular / Citoplasma

Localização Subcelular

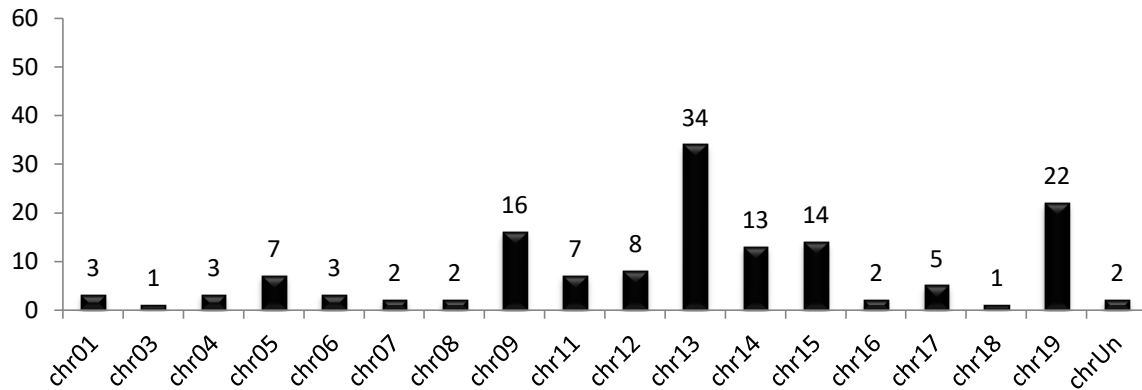
Todas as proteínas NBS-LRR candidatas apresentaram localização subcelular citoplasmática, estando também direcionadas para a membrana celular (16,6 %) e cloroplasto (8,3 %), e eventualmente associadas ao núcleo (1,4 %) (ANEXO 2). Todas as proteínas RLPs estavam associadas à parede celular, sendo direcionadas também para a membrana celular (16,6 %), cloroplasto (7,6 %), núcleo (0,7 %) e para o cloroplasto e o núcleo (0,7%) (Anexo C). Os RLK candidatos estavam localizados predominantemente na membrana celular e eventualmente associados ao núcleo e a parede celular (ANEXO D). Dos 312 STKs candidatos, 288 (92,3 %) estavam direcionados para o núcleo, com 24 candidatos distribuídos entre o citoplasma, membrana celular e cloroplasto (ANEXO E, Gráfico 4).

Gráfico 4. Figura esquemática da localização subcelular para as classes I, II, III e IV.

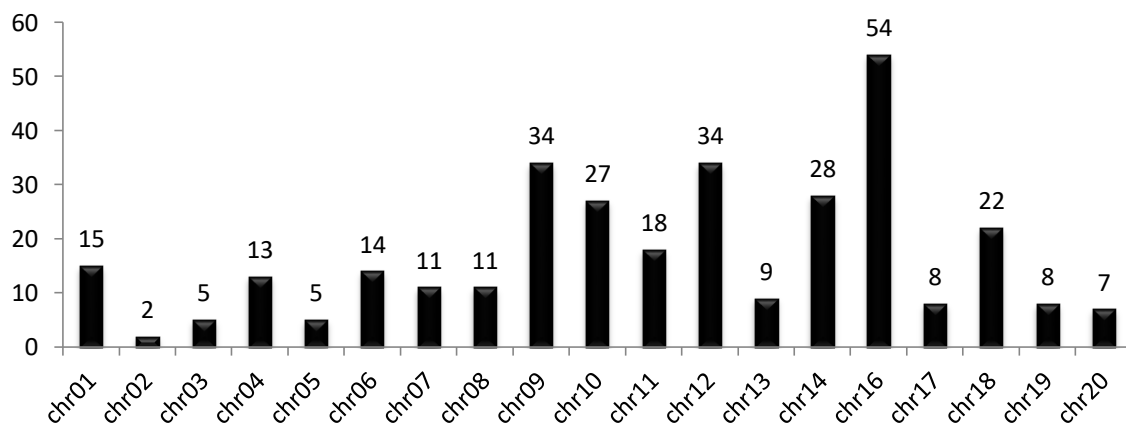


Ancoragem no genoma de *Vitis vinifera*

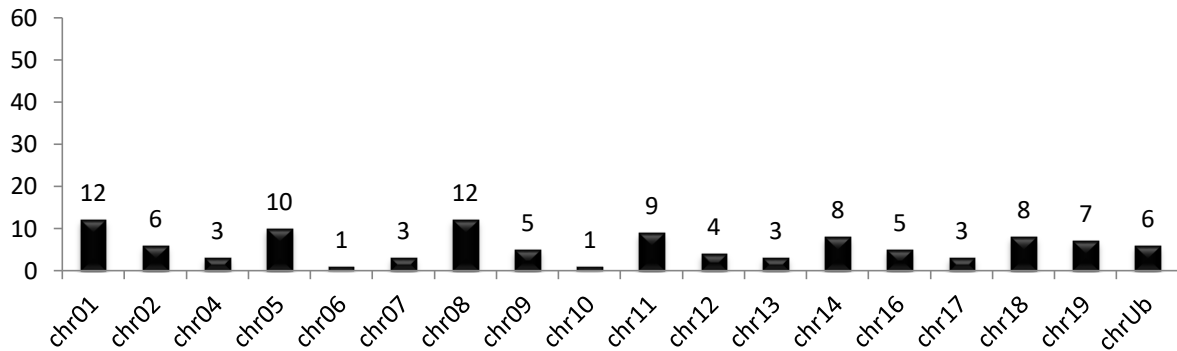
Os genes codificadores de NBS-LRR ancoraram em 18 cromossomos de *Vitis vinifera*, sendo mais representativos os chr13, chr19, chr09, chr15 e o chr14. Todos os genes apresentaram valores ótimos de *e-value*, com 92,4 % dos candidatos com *e-value* de 0.0 (Gráfico 5).

Gráfico 5. Principais locos identificados para o gene NSB-LRR em *Vitis* spp.

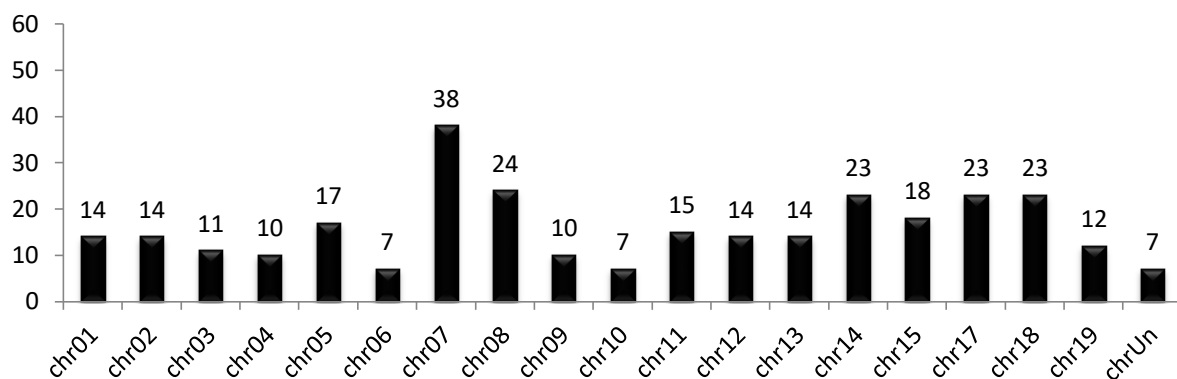
Os RLP estavam localizados de forma abundante nos cromossomos 16 (54 transcritos), 12 e 9 (34 transcritos cada), 10 (27 transcritos) e 18 (22 transcritos), com os cromossomos 2, 3 e 5 sendo pouco representativos. Do total de transcritos ancorados, 97 apresentaram *e-value* 0.0 e 228 transcritos tinham *e-value* variando de 6.29×10^{-18} e 4.56×10^{-175} (Gráfico 6).

Gráfico 6. Principais locos identificados para o gene RLP em *Vitis* spp.

Os genes codificadores de RLK estavam distribuídos em 18 cromossomos, com predominância para os cromossomos 1 (12 transcritos), 8 (12 transcritos) e 5 (10 transcritos), sendo que apenas um gene ancorou nos cromossomos 6 e 10. Os valores de *e-value* para 78 transcritos foi de 0.0, e para os demais variou de 3.89×10^{-43} e 6.81×10^{-168} (Gráfico 7).

Gráfico 7. Principais locos identificados para o gene RLK em *Vitis* spp.

Os genes STK ancoraram em sua maioria nos cromossomos 7 (38 transcritos), 8 (24 transcritos), 14, 17 e 18 (23 transcritos). Vale ressaltar que cada subfamília apresentou predominância em um cromossomo específico, com exceção da STK_IRAK, que apresentou uma maior variação (Gráfico 8). Os genes que codificavam para RPW8 estavam ancorados nos cromossomos 18 e 7, com um transcrito associado a um cromossomo não caracterizado (*chrUn*). Todos os genes apresentaram ancorados apresentaram valores de *e-value* variando de $2.94e^{-50}$ a 0.0.

Gráfico 8. Principais locos identificados para o gene STK em *Vitis* spp.

Análise de Neighbor-Joining

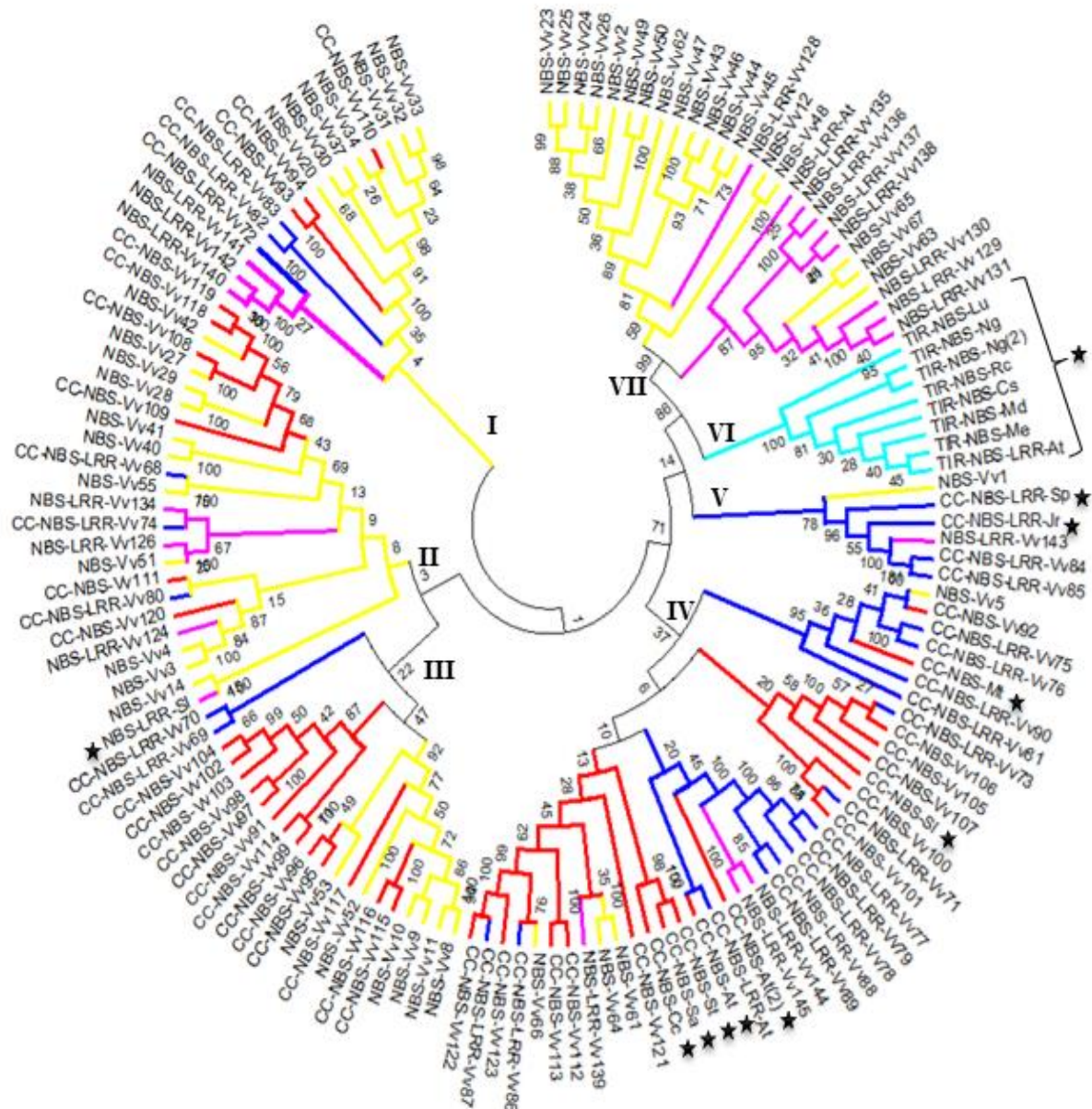
Para análise fenética dos candidatos a genes NBS-LRR em *V. vinifera* (Vv), foi construída uma árvore com base no domínio NBS de Vv e outras espécies já caracterizadas e

disponíveis no banco de dados do NCBI. Sete grandes *clusters* foram formados, porém todos os candidatos em *V. vinifera* foram agrupados nos *clusters* I (16 membros), II (24 membros), III (21 membros), IV (39 membros), V (6 membros), VII (27 membros), sendo o *cluster* VI (azul claro) composto apenas por espécies pertencentes à subfamília TIR, reafirmando a ausência da mesma na espécie em estudo. Quanto aos candidatos de Vv não foi possível identificar agrupamentos distintos de acordo com a presença dos domínios CC, NBS ou LRR.

Os *clusters* do I ao V apresentaram membros contendo os domínios CC, NBS e LRR. Enquanto o *cluster* VII, com bom valor de confiabilidade (*bootstrap* 86) quando comparado com o *cluster* VI (composto apenas por genes TIR em outras espécies vegetais), não apresentou nenhum candidato com o domínio CC, confirmando a classificação desses genes de acordo com as suas duas subfamílias: TIR e não-TIR (CC).

De acordo com a análise comparativa de sequências, a maioria apresentou uma maior similaridade dos candidatos NBS-LRR dentro da espécie *V. vinifera* do que em nível interespecífico, porém exceções foram observadas, por exemplo, para o membro NBS-Vv14 (*cluster* II) que agrupou com um NBS-LRR da espécie *Solanum lycopersicum*, pertencente à família Solanaceae.

Figura 10. Fenograma construído por meio do método de *Neighbor-Joining*, utilizando os genes-candidatos a NBS-LRR de *V. vinifera* (Vv), bem como sequências de *Solanum lycopersicum* (Sl), *Solanum acaule* (Sa), *Solanum tuberosum* (St), *Solanum pennellii* (Sp), *Nicotiana glutinosa* (Ng), *Arabidopsis thaliana* (At), *Linum usitatissimum* (Lu), *Manihot esculenta* (Me), *Medicago truncatula* (Mt), *Juglans regia* (Jr), *Rosa chinensis* (Rc), *Citrus sinensis* (Cs), *Malus domestica* (Md) e *Capsicum chacoense* (Cc), destacados com uma estrela. Foram identificados sete grandes clusters, numerados I, II, III, IV, V, VI e VII. As cores dos ramos representam os genes NBS: NBS (amarelo); CC-NBS (vermelho); CC-NBS-LRR (azul escuro); NBS-LRR (rosa); TIR-NBS-LRR (azul claro).



Análise de expressão *in silico*

Para a construção do perfil de expressão *in silico* das cultivares IAC-572 e Red Globe (contrastantes quanto à resistência à *X. citri*), foram selecionados os 20 melhores candidatos, com base nos níveis de expressão diferencial das bibliotecas de RNA-Seq, sendo possível observar a formação de dois *clusters* para cada classe de genes *R*.

Os genes NBS-LRR (Figura 11A), agrupados no *cluster* I, foram os genes que apresentaram os maiores níveis de expressão na cultivar resistente, com destaque para o NBS-131, que foi cinco vezes mais expresso comparativamente ao controle e apresentou níveis de expressão baixos na cultivar susceptível. O *cluster* II reuniu genes com baixos níveis de expressão ou ainda genes constitutivos na cultivar resistente, sendo reprimidos na susceptível.

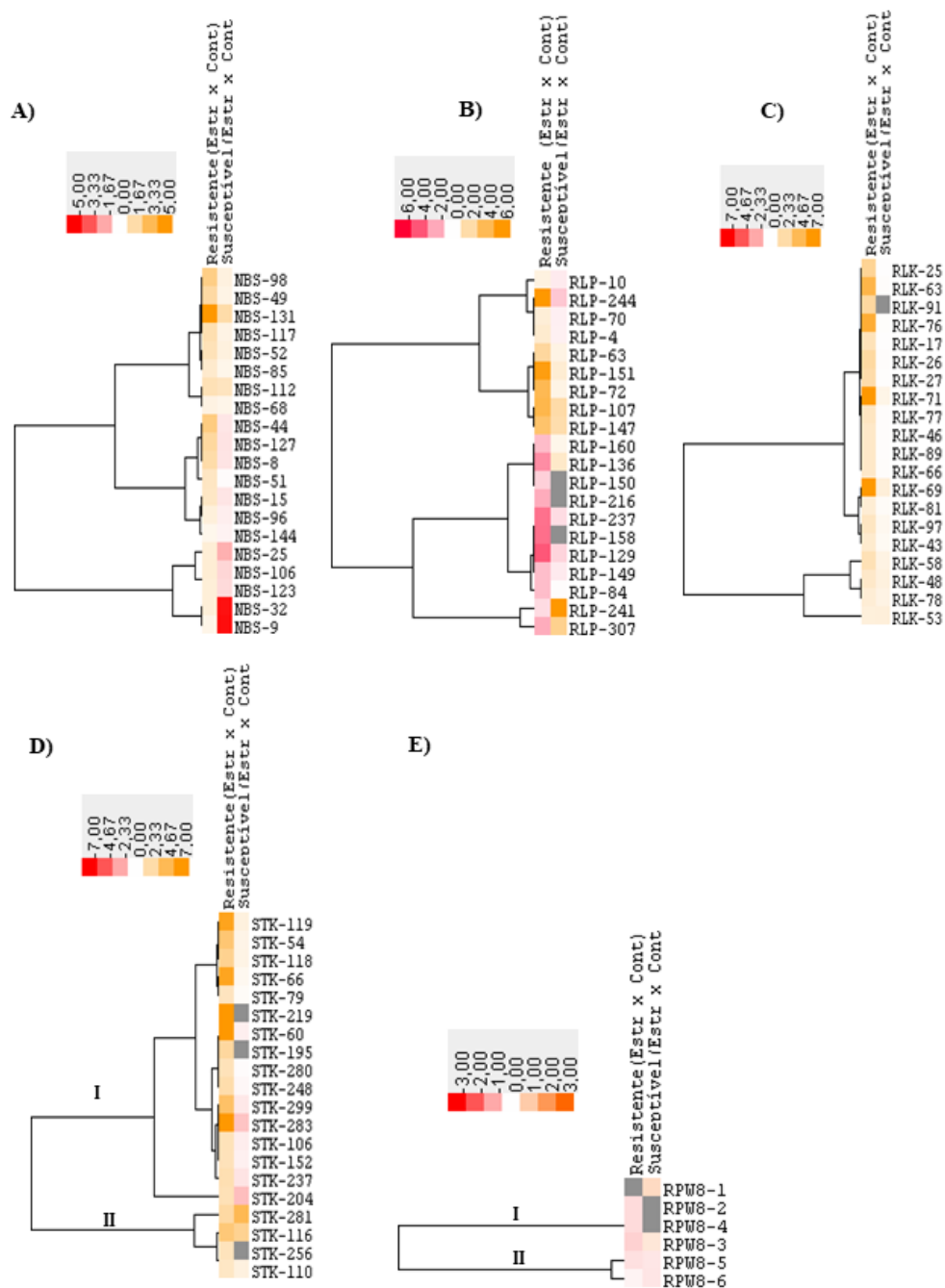
Para os RLPs (Figura 11B), o *cluster* I agrupou genes com níveis de expressão elevados na cultivar resistente, com os genes RLP-244 e RLP-151, sendo seis e cinco vezes mais expressos na cultivar resistente em relação ao controle, encontrando-se reprimidos ou com baixos níveis de expressão na susceptível. O *cluster* II teve em sua maioria genes reprimidos na cultivar resistente e não significativos na susceptível, com exceção do gene RLP-241 que foi sete vezes mais expresso na biblioteca resistente.

Em RLK (Figura 11C), o *cluster* I seguiu o mesmo padrão apresentado para NBS-LRR e RLP, com os genes RLK-71, RLK-69, RLK-76 e RLK-63 sendo de quatro a sete vezes mais expressos na cultivar resistente comparado ao controle. Os genes agrupados no *cluster* II apresentaram baixos níveis de expressão nas duas bibliotecas.

Em STK (Figura 11D), o *cluster* I seguiu o mesmo padrão apresentado para as classes descritas acima, com cinco genes (STK-60, STK-219, STK-66, STK-119 e STK-283) sendo seis ou sete vezes mais expressos na biblioteca resistente. O *cluster* II agrupou genes com baixos níveis de expressão na cultivar resistente e que foram não significativos na susceptível, como observado, por exemplo, para STK-256.

Para RPW8 (Figura 11E), o *cluster* I agrupou genes com expressão não significativa ou com baixos níveis em ambas as bibliotecas. O *cluster* II apresentou um perfil semelhante, porém não houve genes não significativos.

Figura 11. *Heatmap* dos genes *R* em dois genótipos de *Vitis* contrastantes quanto à infecção por *X. citri*. A) Classe I (NBS-LRR); B) Classe II (RLP); C) Classe III (RLK); D) Classe IV (STK); E) Classe V (RPW8).



Seleção de Genes de Referência (GRs)

Foram selecionados cinco (ACT, CYP, TRU5, TCPB e 60SRP) GRs baseados na literatura e cinco (CNX, CCR4, HSP, LOCI e TIF3) de acordo com os dados das bibliotecas de RNA-Seq. Todos os GRs amplificaram e apresentaram valores médios de Cqs (*Quantification cycle*) variando entre 22,96 para o gene CYP (mais expresso) e 33,51 para o gene TIF3 (menos expresso) (Tabela 7). Na análise da curva de *melting* foi possível observar que os genes ACT, CYP, TRU5, TCPB e 60SRP apresentaram pico único, enquanto CNX, CCR4, HSP, LOCI e TIF3 exibiram picos adicionais indicativos de formação de dímero (Figura 12).

Os GRs apresentaram eficiência variando de 83,6 % a 109,1 % para a cultivar IAC 572 (Figura 13), com coeficientes de correlação entre 0,970 e 0,999 e slope entre -3,02 e -3,79 (Tabela 7). Já para a cultivar Red Globe, as eficiências variam de 90 % a 106,8 % (Figura 14), com coeficientes de correlação variando de 0,985 a 1,00 e slope entre -3,16 e -3,62 (Tabela 7). De forma geral, os resultados obtidos estão de acordo com as considerações do *MIQE Guidelines*, exceto para ACT, CYP e HSP na cultivar IAC 572, que apresentaram eficiências de 88,2 %, 83,6 % e 113,9 %, respectivamente, ficando fora da faixa recomendada (90 a 110 %).

Tabela 7. Parâmetros obtidos nas análises de RT-qPCR.

Gene	Tm (°C)	Amplicon (bp)	Média Cq	E (%)	R	Slope	Y intercept	Média Cq	E (%)	R	Slope	Y intercept	CN (Cq)
IAC572								Red Globe					
CT	79,5	244	25,03	88,2	0,999	-3,641	20,414	23,50	90,0	0,999	-3,586	18,727	N.D.
CNX	81,5	244	26,99	112,7	0,981	-3,051	22,970	25,32	104,3	0,998	-3,224	21,797	N.D.
CCR4	83,0	175	27,57	90,3	0,995	-3,579	23,779	25,64	95,5	0,991	-3,435	21,684	35,66
CYP	84,0	138	22,96	83,6	0,995	-3,791	19,673	22,31	91,0	0,996	3,557	19,044	N.D.
HSP	81,5	153	31,53	113,9	0,990	-3,028	28,543	30,51	95,9	0,991	-3,424	24,655	36,27
LOC1	78,5	150	27,84	94,6	0,988	-3,457	25,657	28,30	90,7	0,998	-3,567	24,872	36,04
TCBP	84,0	238	27,99	91,6	0,998	-3,540	23,985	26,57	90,2	0,998	-3,583	22,618	N.D.
TIF3	81,0	227	33,51	109,1	0,973	-3,122	30,764	31,78	95,9	0,985	-3,424	28,534	36,83
TRU5	78,5	100	25,89	95,3	0,978	-3,440	24,668	25,52	88,9	1,000	-3,620	21,564	35,77
60SRP	81,5	165	26,32	91,0	0,989	-3,559	23,396	25,13	90,7	0,998	-3,566	21,277	N.D.
NBS12	79,5	165	31,98	101,0	0,984	-3,298	27,368	30,60	101,4	0,993	-3,290	23,250	38,44
RLK	81,0	222	30,97	96,1	0,979	-3,418	28,707	28,08	101,4	0,995	-3,288	25,198	36,31
STK	81,5	233	31,76	106,2	0,970	-3,183	24,548	26,14	100,8	0,994	-3,302	21,421	35,56
STK4	82,0	161	32,36	97,7	0,985	-3,378	25,794	30,09	106,8	0,991	-3,168	23,191	38,56

Tm: temperatura de *melting* (° C); Cq: Ciclo de quantificação; N.D.: Não detectado; CN: Controle negativo; E: Eficiência dos *primers*; R: Coeficiente de correlação. ACT: Actina; CNX: Calnexina; CCR4: C-C Motif Chemokine Receptor 4; CYP: Ciclofilina; HSP: Proteína de choque térmico; LOC1: Proteína não caracterizada; TCBP: Proteína 1 subunidade β do complexo T; TIF3: Fator de iniciação 3 da tradução em eucariotos.

Figura 12. Curvas de *melting* de dez genes de referência candidatos em amostras de cDNA de tecidos foliares de *Vitis* spp.

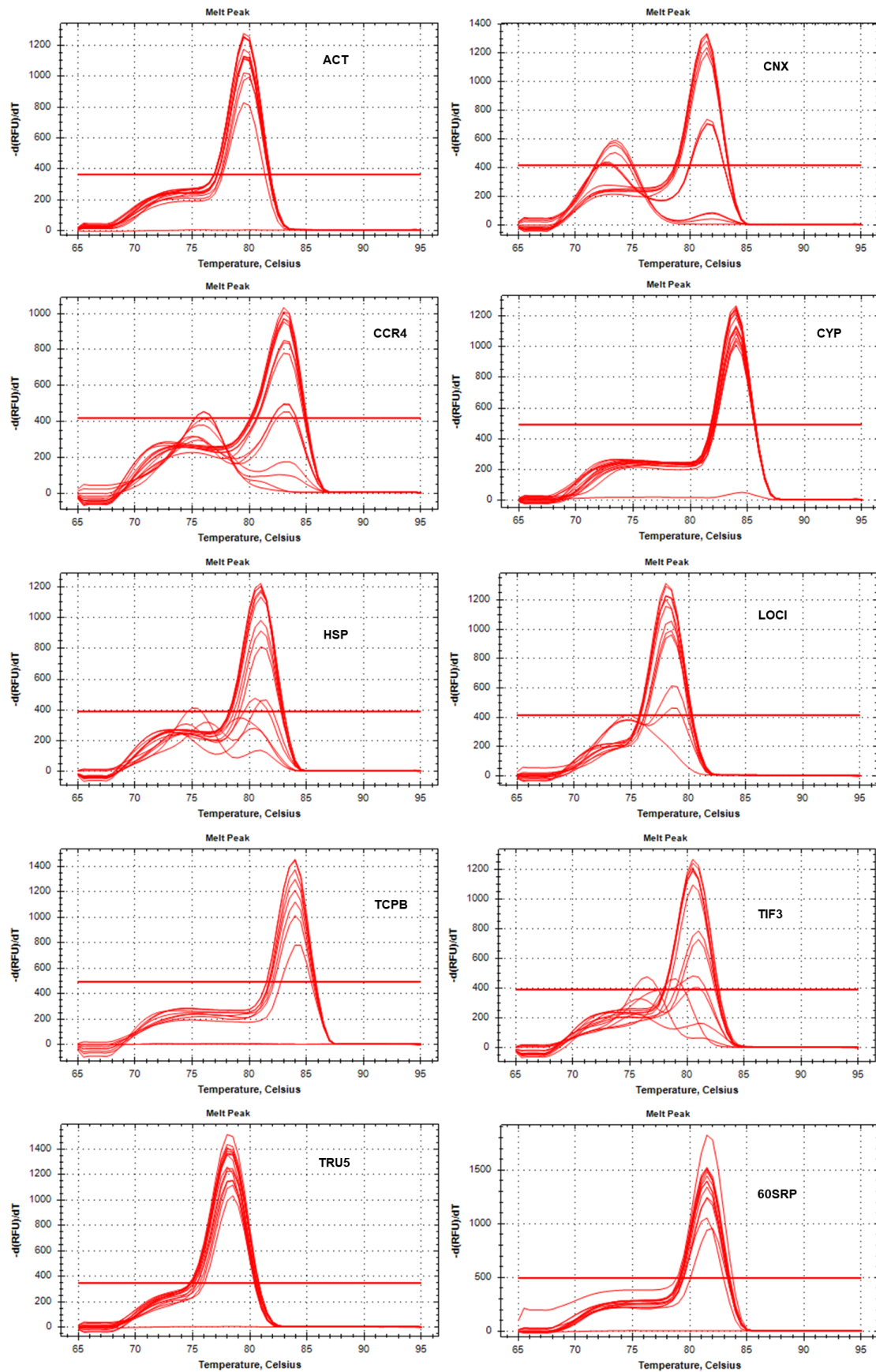


Figura 13. Eficiência dos dez genes referência candidatos em amostras de cDNA de tecidos foliares da cultivar IAC 572.

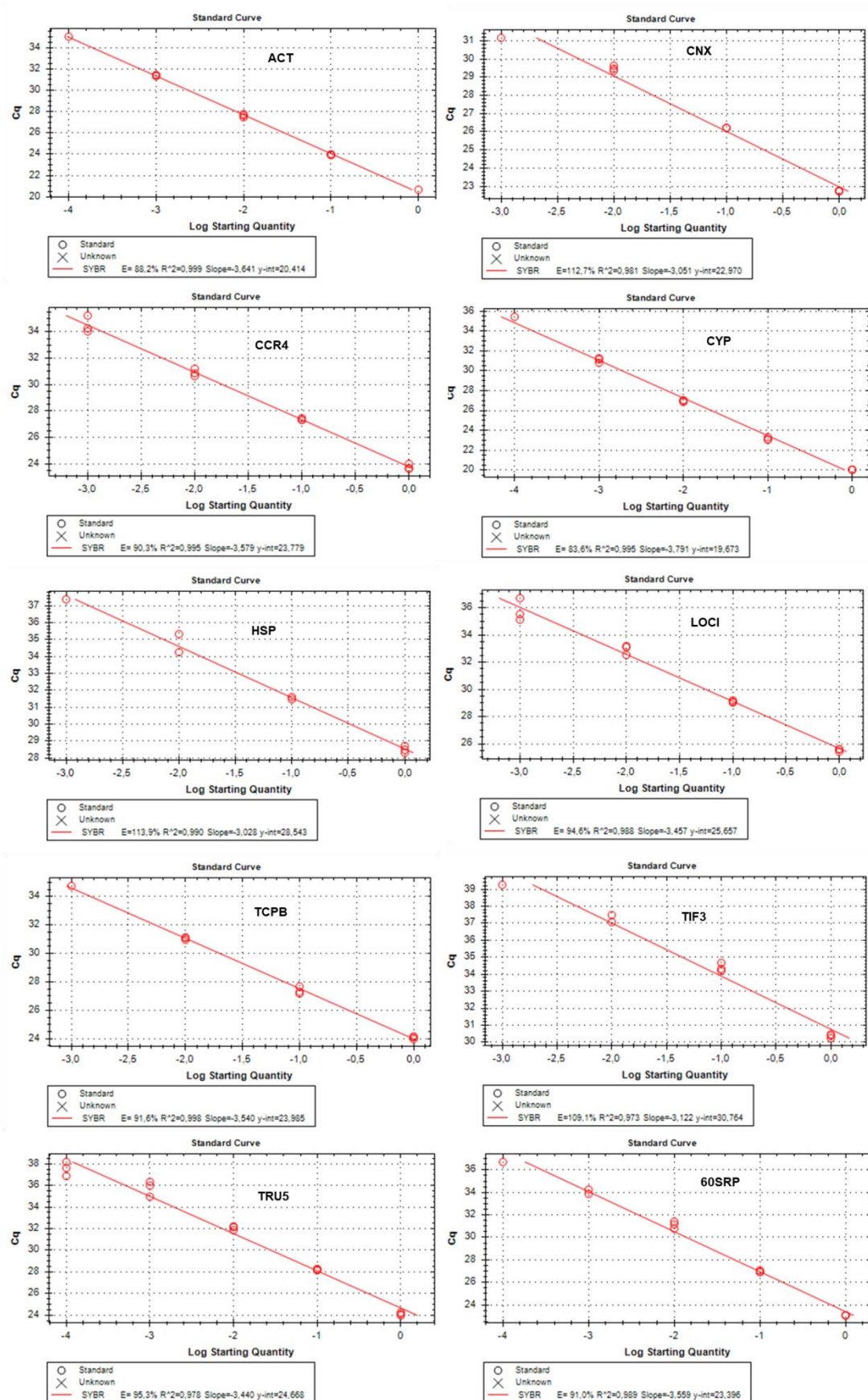
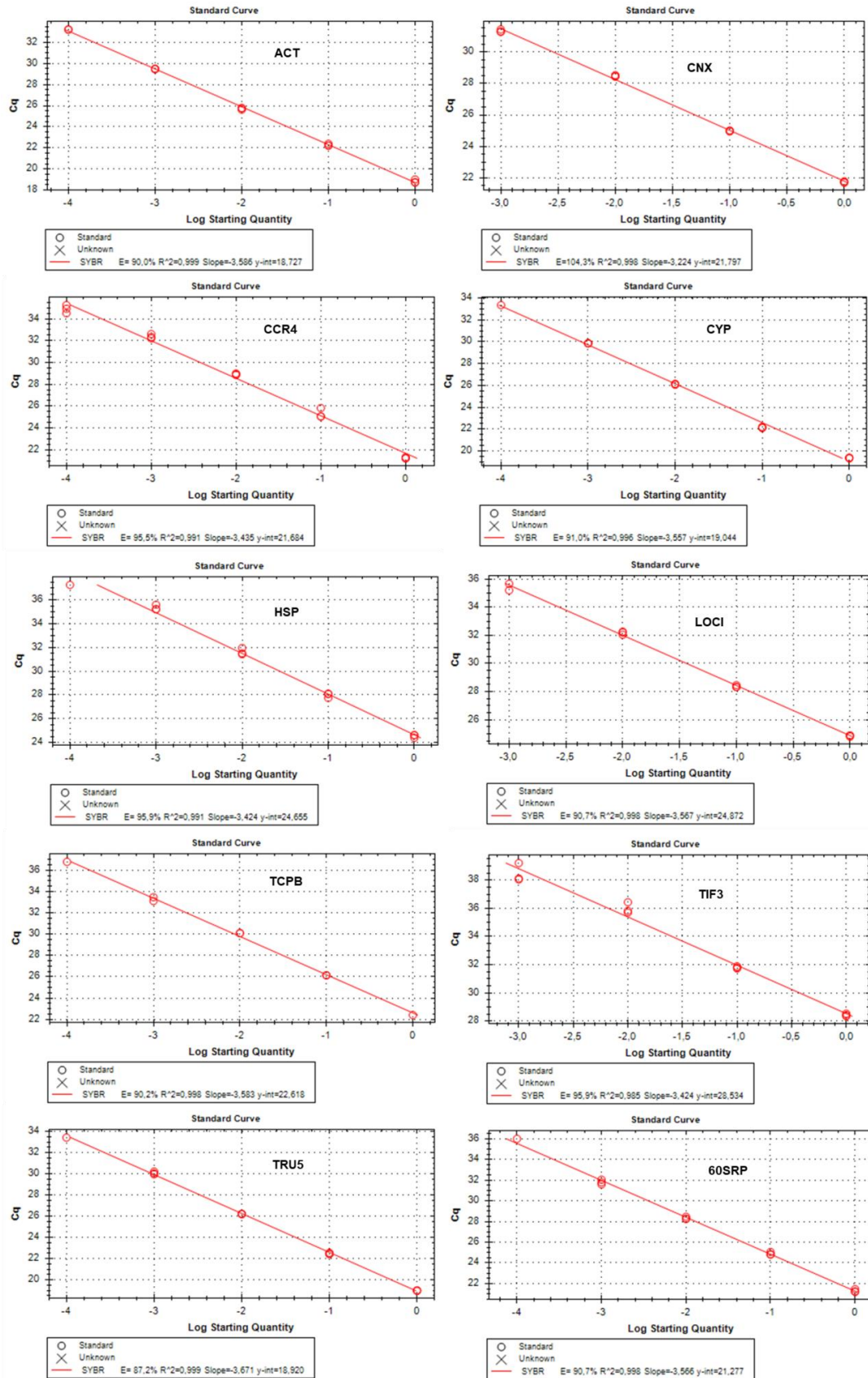


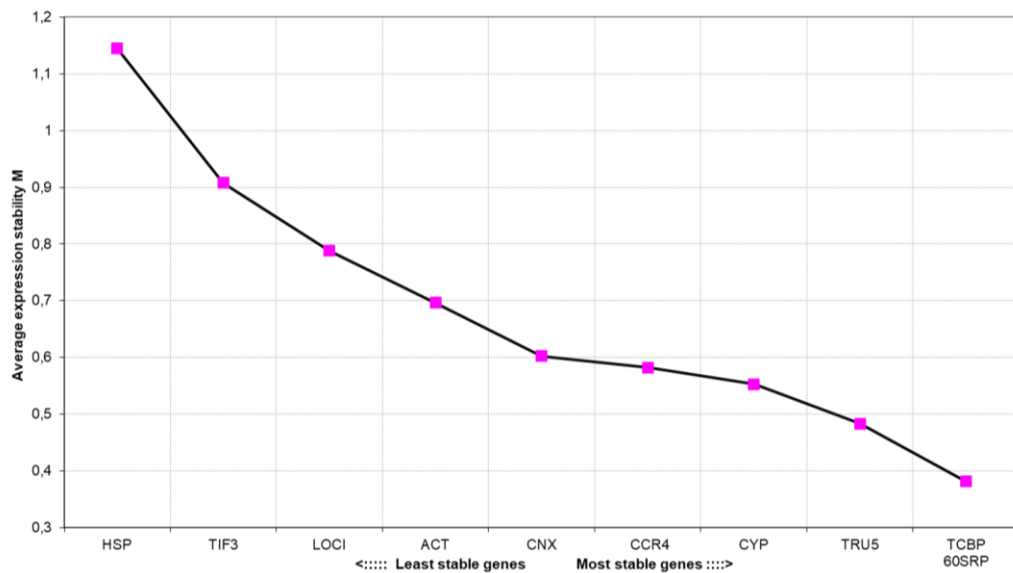
Figura 14. Eficiência dos dez genes referência candidatos em amostras de cDNA de tecidos foliares da cultivar Red Globe.



A fim de verificar a estabilidade de expressão dos GRs candidatos, foram utilizados os softwares GeNorm, NormFinder e Bestkeeper.

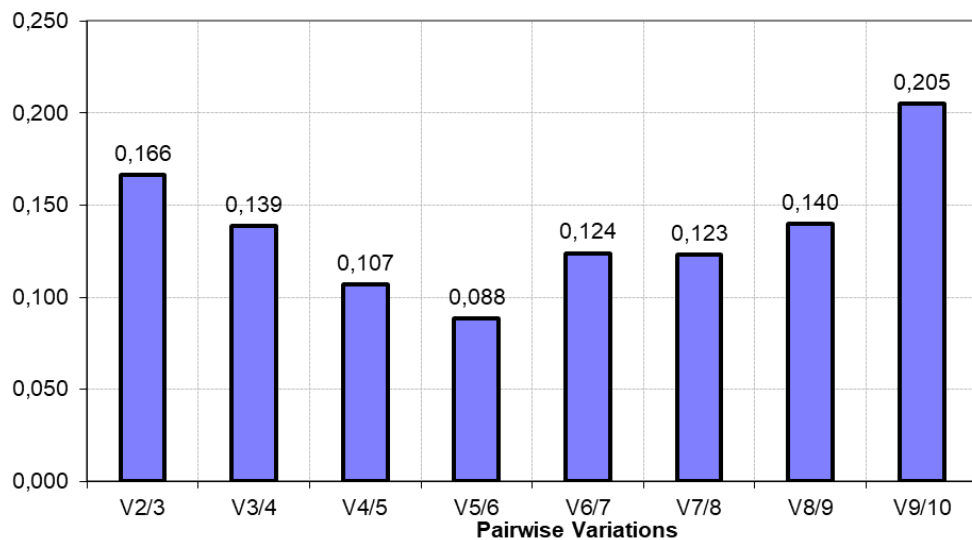
De acordo com os valores de estabilidade (M) verificados no GeNorm para a cultivar IAC 572, CYP ($M = 0,884$), CCR4 ($M = 0,923$), TRU5 ($M = 0,929$), CNX ($M = 0,931$) e TCBP ($M = 0,932$) foram os cinco GRs mais estáveis, enquanto que o HSP ($M = 2,091$) foi o gene que mais variou (Figura 15).

Figura 15. Valores médios de estabilidade de expressão gerado pelo programa GeNorm para os dez genes de referência testados em amostras de cDNA de tecidos foliares da cultivar IAC 572.



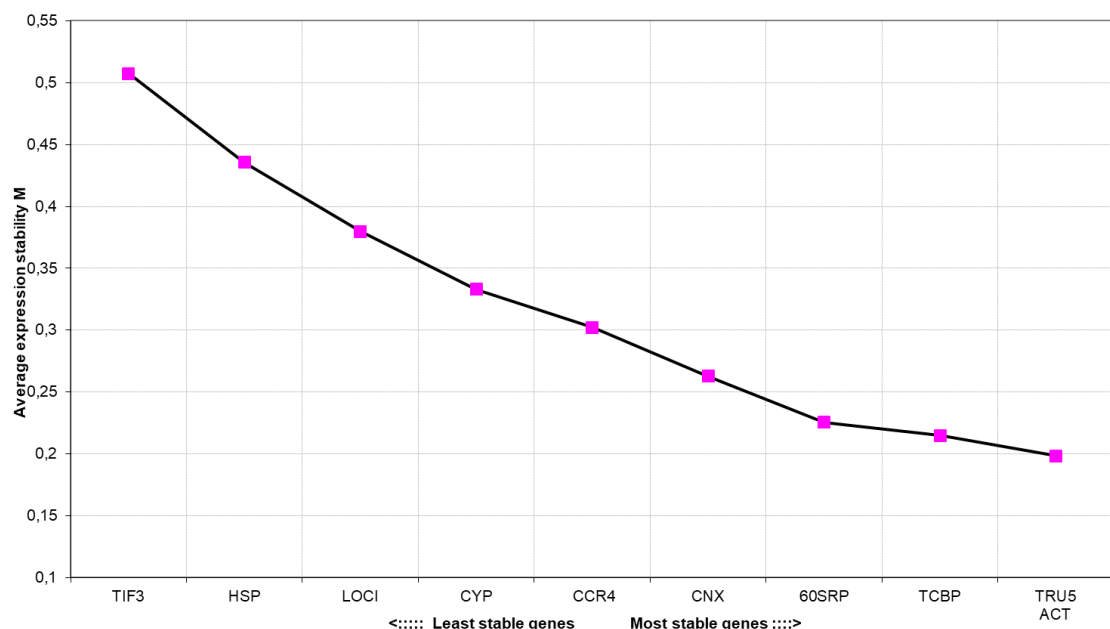
Na avaliação de determinação do número ideal de GRs para normalização dos dados da RT-qPCR, identificou-se que utilizando o melhor par de GRs (TCBP e 60SRP) e um terceiro gene (TRU5) a normalização ainda não seria adequada ($V2/3$), sendo necessária a adição de um quarto gene ($V3/4$) para atingir o ponto de corte recomendado (0,15) (Figura 16).

Figura 16. Determinação do número de genes de referência ideal para normalização dos dados de expressão da cultivar IAC 572.



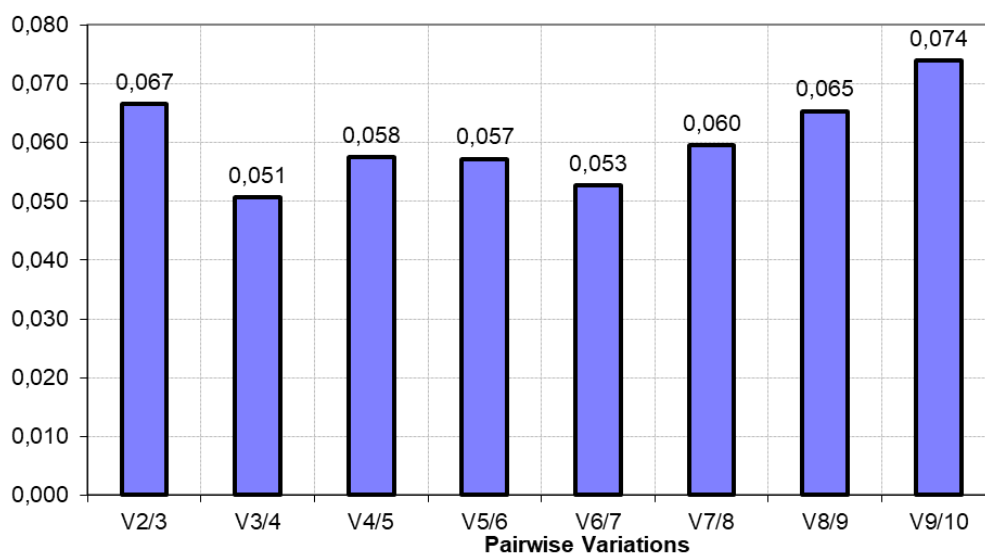
Para a cultivar Red Globe, todos os GRs apresentaram valores inferiores (Figura 18) ao ponto de corte indicado ($M < 1.5$), sugerindo que todo o conjunto avaliado seria apropriado para normalização dos resultados de expressão em tecidos foliares de *Vitis*. TRU5 ($M = 0,377$), TCBP ($M = 0,381$) e 60SRP ($M = 0,391$) exibiram os melhores valores de estabilidade da avaliação (Figura 17).

Figura 17. Valores médios de estabilidade de expressão gerado pelo programa GeNorm para os dez genes de referência testados em amostras de cDNA de tecidos foliares da cultivar IAC 572.



No que se refere ao número ideal de GRs, foi verificado que utilizando o melhor par de GRs (TRU5 e ACT) e o terceiro gene mais estável (TCBP) já seria suficiente para normalizar os dados de expressão (V2/3), com esse padrão sendo mantido em todas as outras combinações, corroborando o resultado verificado na análise individual de estabilidade (Figura 18).

Figura 18. Determinação do número de genes de referência ideal para normalização dos dados de expressão da cultivar Red Globe.



Com relação ao ranking de estabilidade fornecido pelo NormFinder e Bestkeeper para a cultivar IAC 572, os cinco GRs mais estáveis foram CYP, CCR4, TRU5, CNX e TCBP, com pequenas alterações na ordem de classificação (Tabela 8). HSP foi considerado o GR mais instável da análise, semelhantemente ao observado no Genorm. As avaliações para a cultivar Red Globe indicaram TRU5 ($M = 0,002$; $CV \pm SD = 0,52 \pm 2,04$), TCBP ($M = 0,002$; $CV \pm SD = 2,66 \pm 0,71$) e 60SRP ($M = 0,003$; $CV \pm SD = 2,42 \pm 0,61$) como os três melhores genes (Tabela 8).

Considerando os resultados indicados nos três programas e visando estabelecer um conjunto de GRs funcional para as duas cultivares, a combinação formada por TRU5, TCBP e 60SRP foi utilizada nas reações para normalização das reações de expressão relativa na RT-qPCR.

Tabela 8. Valores de estabilidade de expressão calculados pelos softwares NormFinder e BestKeeper.

NormFinder (IAC-572)			NormFinder (Red Globe)			BestKeeper (IAC-572)				BestKeeper (Red Globe)			
Ranking	Genes	M	Ranking	Genes	M	Ranking	Genes	R	CV±SD	Ranking	Genes	R	CV±SD
1	CYP	0,004	1	TRU5	0,002	1	CYP	0,957	(4,40±1,01)	1	TRU5	0,992	(0,52±2,04)
2	CCR4	0,004	2	TCBP	0,002	2	CCR4	0,948	(3,76±1,04)	2	TCBP	0,991	(2,66±0,71)
3	TRU5	0,004	3	60SRP	0,003	3	CNX	0,953	(4,15±1,12)	3	60SRP	0,974	(2,42±0,61)
4	CNX	0,005	4	ACT	0,004	4	TRU5	0,924	(3,32±0,86)	4	CNX	0,973	(3,13±0,79)
5	TCBP	0,006	5	CYP	0,005	5	TCBP	0,916	(3,74±1,05)	5	ACT	0,955	(2,66±0,63)
6	LOC1	0,007	6	CCR4	0,006	6	60SRP	0,888	(4,08±1,07)	6	HSP	0,947	(3,42±1,00)
7	60SRP	0,008	7	HSP	0,008	7	LOC1	0,794	(2,51±0,70)	7	CCR4	0,917	(2,57±0,66)
8	TIF3	0,011	8	CNX	0,009	8	ACT	0,797	(5,03±1,26)	8	TIF3	0,900	(3,06±0,97)
9	ACT	0,016	9	LOC1	0,009	9	TIF3	0,630	(2,49±0,83)	9	CYP	0,892	(2,00±0,45)
10	HSP	0,023	10	TIF3	0,009	10	HSP	0,230	(4,52±1,42)	10	LOC1	0,805	(0,93±0,26)

M: valor da estabilidade de expressão; R: Coeficiente de correlação de Pearson; CV: coeficiente de variação; SD: desvio padrão.

Validação da expressão gênica via RT-qPCR

Considerando os dados das bibliotecas de RNA-Seq foram desenhados 20 pares de *primers* para três classes de genes de resistência (NBS-LRR, RLK e STK). Desses, quatro pares de *primers* foram eficientes nos cDNAs das duas cultivares de *Vitis* (Tabelas 1; anexos 6 e 7) os quais foram avaliados via RT-qPCR sob condições normais (amostras não inoculadas) e sob estresse (90 minutos, 24 horas e 48 horas após a inoculação com *X. citri*), usando os genes de referência TRU5, TCBP e 60SRP.

Os resultados de RNA-Seq indicaram que os transcritos VV_DN56550_c2_g1_i3 e VV_DN44568_c0_g1_i6, anotados como NBS12 e STK4, foram induzidos 1,10 e 7,06 vezes na cultivar IAC 572 e reprimidos ou não significativos 0,47 e 0,50 vezes na cultivar Red Globe em relação aos seus controles, no tempo de 90 minutos (Tabela 9). Na quantificação relativa não foi verificada alteração significativa em nenhuma das cultivares nos tempos de 90 minutos e 24 horas após a aplicação do estresse, para os dois genes-alvo (Tabela 9; Figuras 19A, B e 20A, B). Com 48 horas após a inoculação, observou-se uma indução de 6,01 e 7,71 vezes na expressão desses alvos na cultivar IAC 572, ao passo que na cultivar Red Globe não houve expressão diferencial (Tabela 9; Figura 20 e 22), o que indica uma resposta, embora tardia, da cultivar resistente frente ao estresse causado pela bactéria, sendo provavelmente ambas as classes ativadas com a mesma intensidade à medida que a infecção se instala na planta.

Por sua vez, os transcritos VV_DN54351_c0_g2_i4 e VV_DN54025_c0_g1_i17, que codificam os genes RLK e STK, mantiveram a sua expressão não significativa ao longo dos três tempos de estresse, embora sua expressão na biblioteca de RNA-Seq (FC de 7,06 e 6,18; Tabela 9) os indicasse como alvos participativos no processo de defesa de videira em resposta ao patógeno.

Tabela 9. Expressão relativa dos genes alvos (NBS12, RLK, STK e STK4) baseada na RT-qPCR (90 minutos, 24 horas e 48 horas) de tecidos foliares de duas cultivares de videira infectadas com *X. citri* e sua regulação na biblioteca de RNA-Seq (90 minutos).

		RNA-Seq [FC / Reg.]		RT-qPCR*		RT-qPCR*		RT-qPCR*	
		90 minutos		90 minutos		24 horas		48 horas	
ID do transcrito	Anotação	IAC 572	Red Globe	IAC 572	Red Globe	IAC 572	Red Globe	IAC 572	Red Globe
VV_DN56550_c2_g1_i3	NBS12	1,10 / UR	-0,47 / DR	1,98 / ns	1,48 / ns	0,89 / ns	1,00 / ns	6,01 / UR	0,88 / ns
VV_DN54351_c0_g2_i4	RLK	7,06 / UR	-0,40 / DR	0,62 / ns	1,03 / ns	0,86 / ns	1,12 / ns	3,98 / ns	1,04 / ns
VV_DN54025_c0_g1_i17	STK	6,18 / UR	0,88 / ns	0,22 / ns	0,78 / ns	1,00 / ns	0,97 / ns	2,01 / ns	1,07 / ns
VV_DN44568_c0_g1_i6	STK4	7,06 / UR	0,50 / ns	0,68 / ns	1,09 / ns	1,78 / ns	2,08 / ns	7,71 / UR	1,65 / ns

FC: *Fold change* [taxa de frequência observada na biblioteca com estresse em relação a biblioteca controle]; Reg. = Regulação; *Nível de expressão relativa calculado pelo método $\Delta\Delta Cq$; UR: *up-regulated*; DR: *down-regulated*; ns: não significativo.

Figura 19. Expressão relativa dos genes NBS12 e RLK em cDNAs de tecidos foliares da cultivar IAC 572 após a infecção com *X. citri*, normalizada com os genes de referência TRU5, TCBP e 60 SRP. (A) 90 minutos após inoculação com *X. citri*; (B) 24 horas após inoculação com *X. citri*; (C) 48 horas de após inoculação com *X. citri*.

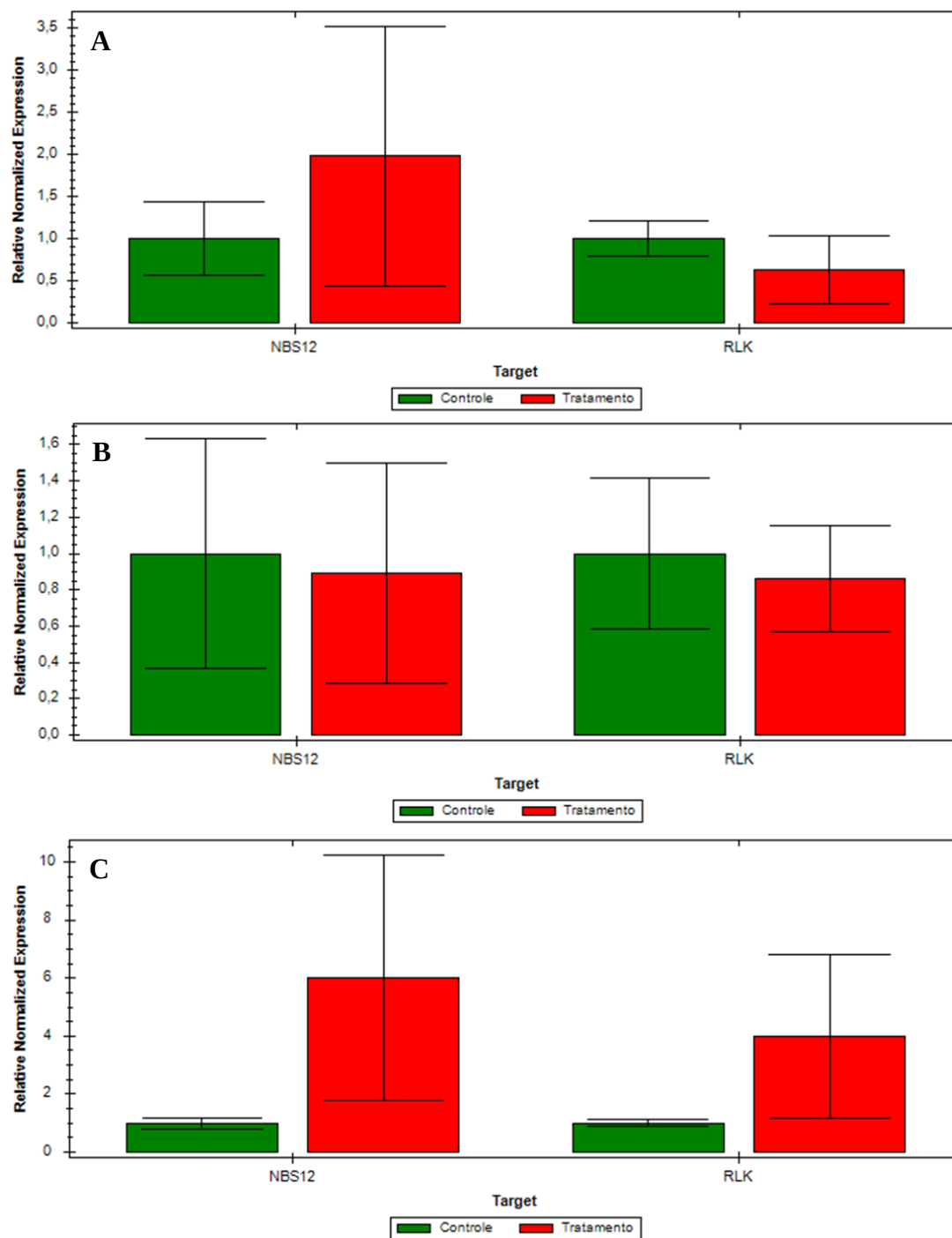


Figura 20. Expressão relativa dos genes NBS12 e RLK em cDNAs de tecidos foliares da cultivar Red Globe após a infecção com *X. citri*, normalizada com os genes de referência TRU5, TCBP e 60 SRP. (A) 90 minutos após inoculação com *X. citri*; (B) 24 horas após inoculação com *X. citri*; (C) 48 horas de após inoculação com *X. citri*.

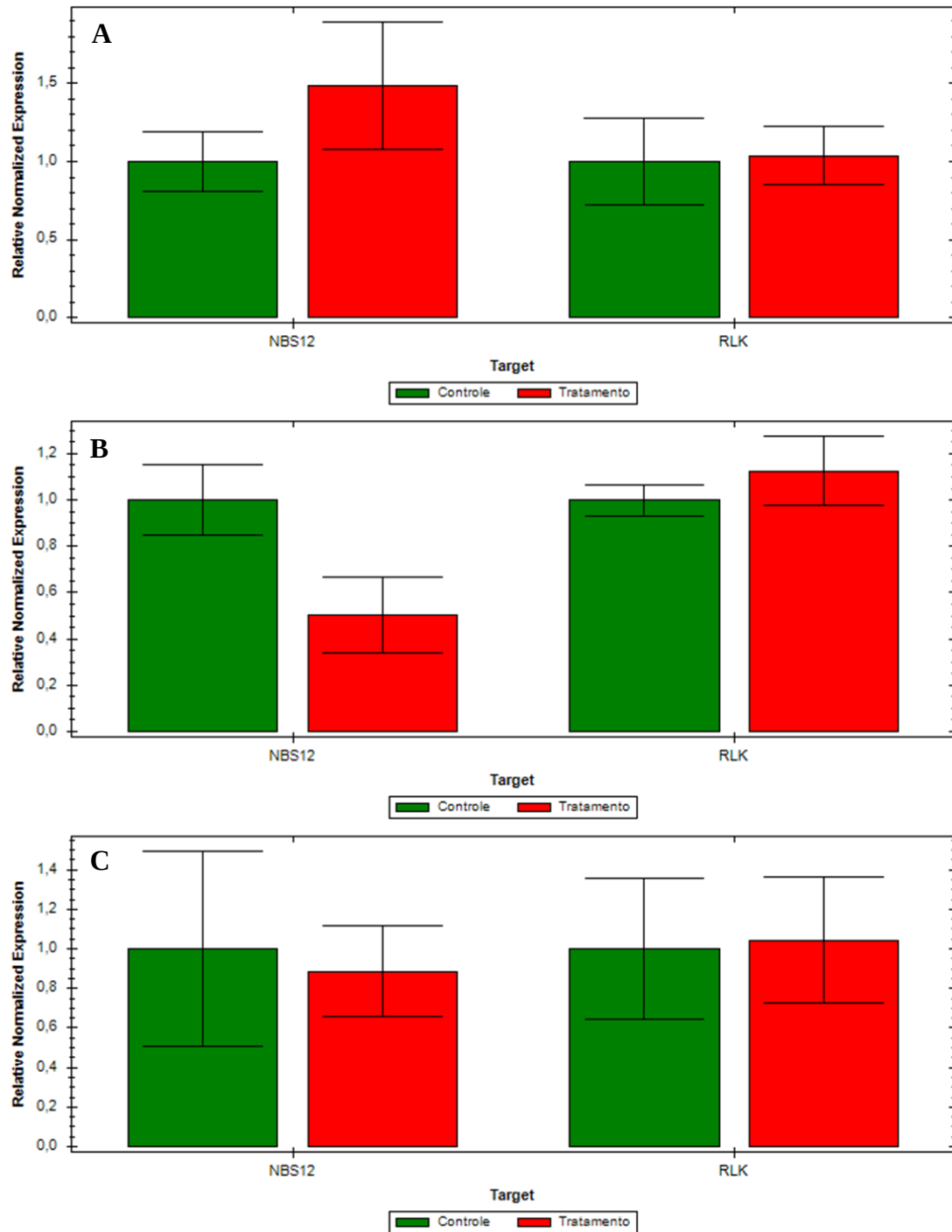


Figura 21. Expressão relativa dos genes STK e STK4 em cDNAs de tecidos foliares da cultivar IAC 572 após a infecção com *X. citri*, normalizada com os genes de referência TRU5, TCBP e 60 SRP. (A) 90 minutos após inoculação com *X. citri*; (B) 24 horas após inoculação com *X. citri*; (C) 48 horas de após inoculação com *X. citri*.

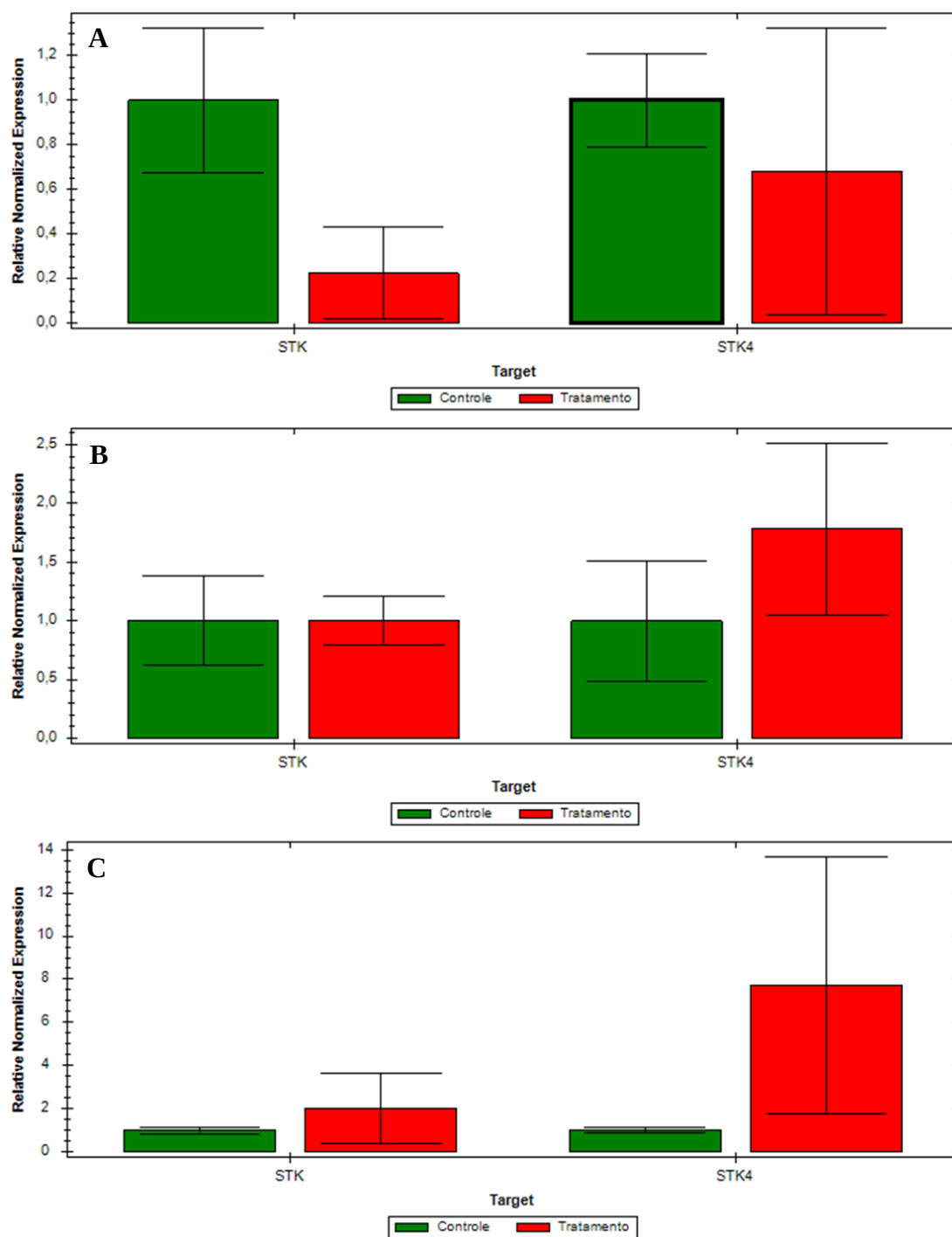
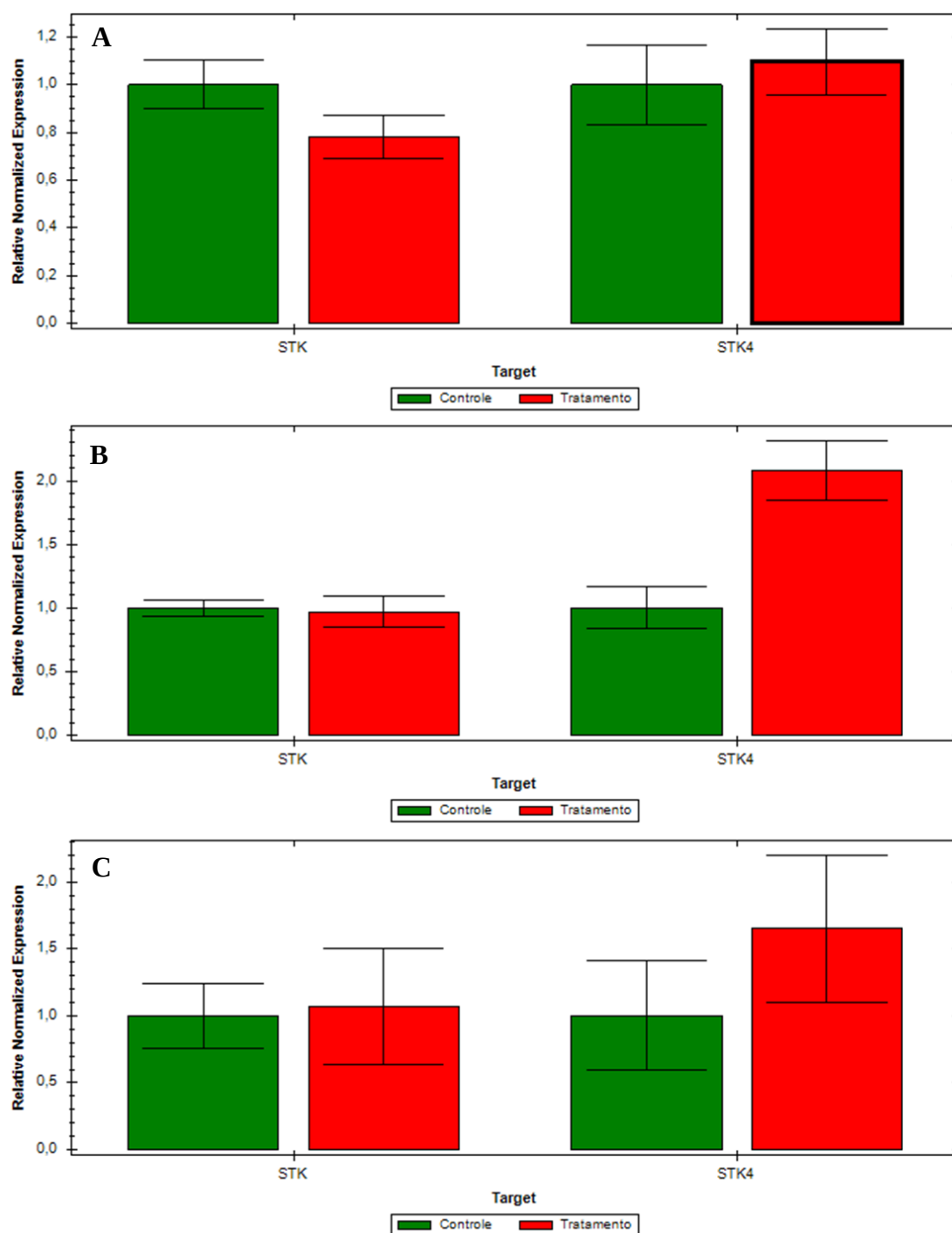


Figura 22. Expressão relativa dos genes STK e STK4 em cDNAs de tecidos foliares da cultivar Red Globe após a infecção com *X. citri*, normalizada com os genes de referência TRU5, TCBP e 60 SRP. (A) 90 minutos após inoculação com *X. citri*; (B) 24 horas após inoculação com *X. citri*; (C) 48 horas de após inoculação com *X. citri*.



Discussão

Mineração dos candidatos e análise de domínio

Os genes *R* são os principais genes de defesa em plantas, sendo alvo de diversos estudos abordando interações patogênicas em várias espécies vegetais. No presente trabalho, foram identificados candidatos para as cinco classes de genes *R*, com maior abundância de genes do tipo RLP (325 candidatos), STK (312 candidatos) e NBS-LRR (145 candidatos). Diversos estudos tem relatado a presença dessas classes de genes nos genomas de plantas como alface (CHRISTOPOULOU *et al.*, 2015), *Arabidopsis* (LI *et al.*, 2016), eucalipto (BARBOZA-DA-SILVA *et al.*, 2005), cana-de-açúcar (WANDERLEY-NOGUEIRA *et al.*, 2007), feijão-caupi, soja e Medicago (WANDERLEY-NOGUEIRA *et al.*, 2012).

Christopoulou *et al.* (2015), analisando genes de resistência no genoma de alface, identificaram 385 genes *R* da classe NBS (subdivididos nas classes CNL, TNL, NcL, NtL, Nc, Nt, CN, TN), 403 RLP (subdivididos nas classes RLP e LRR) e 298 RLK (subdivididos nas classes RLK e PkinL). Em relação à classe RLP, foram identificados resultados semelhantes, demonstrando que esses genes também são ativos frente à interação da videira com a bactéria *X. citri*. Em relação aos genes NBS, nossos resultados também foram semelhantes ao verificado Christopoulou *et al.* (2015) no que se refere aos resultados obtidos para CNL, NcL, Nc e CN, no entanto, neste estudo não foram identificados genes que codificam para TNL, NtL, Nt e TN. Em cana-de-açúcar, Wanderley-Nogueira *et al.* (2007) também relataram a ausência dessa subclasse em suas análises.

Neste trabalho foram identificados 106 transcritos codificadores para RLK, divergindo dos resultados obtidos por Wanderley-Nogueira *et al.* (2012) para *Medicago*, *Arabidopsis*, sendo mais semelhante ao verificado em soja, com 154 candidatos. Já o estudo de por Christopoulou *et al.* (2015) em alface, onde foram observados mais de 238 RLKs. No que se refere a classe STK, a mais abundante foi a STK_IRAK, a qual está envolvida diretamente com o recrutamento da morte celular em plantas frente à infecção por patógenos (COHN *et al.*, 2001).

Não foram encontrados dados comparativos para a classe RPW8 na literatura, sendo a mesma pouco representativa no genoma de *V. vinifera*, o que sugere que esses genes possivelmente não participam do processo de defesa contra a bactéria *X. citri* em videira.

Análise de motivos conservados

Os principais aspectos estruturais apresentados pelas sequências NBS-LRR identificadas no genoma expresso de *V. vinifera* demonstram que possivelmente seis transcritos apresentam sua função conservada para o domínio *Coiled-coil*. O motivo <EDVID>, presente em seu domínio, é considerado altamente importante para a interação intramolecular entre os domínios CC e NBS, como reportado por Bai *et al.* (2002) e Raidan *et al.* (2008) em *Oryza sativa*. Vale salientar que a variação nos resíduos de aminoácidos dentro desse motivo leva a uma perda de função do gene correspondente (RAIRDAN *et al.*, 2008).

O domínio NBS representa um dos mais importantes em genes de resistência em vegetais. Nossos resultados demonstraram que os motivos *P-loop (kinase-1)*, *Kinase-2*, *Kinase-3a* e *GLPL (kinase-3)* são altamente conservados em *Vitis*, assim como verificado em outras espécies, como a cana-de-açúcar (QUE *et al.*, 2009) e cereais do grupo *Triticeae* (BOUKTILA *et al.*, 2014). O motivo *P-loop (kinase-1)* e *kinase-2* realizam a função de ligação do fosfato ao ATP (TRAUT, 1994). Já o GLPL está envolvido na ligação ao ADP. O motivo *P-loop (kinase-1)* é essencial para o funcionamento de proteínas NBS-LRR, de forma que mutações nesse motivo poderão acarretar em perda de função da proteína (MCHALE *et al.*, 2006). Neste estudo, das 145 proteínas identificadas, 22 apresentaram ausência do motivo *P-loop (kinase-1)* e 20 apresentaram mutações pontuais em alguma glicina. Dessa forma, 103 proteínas possivelmente apresentam sua função conservada em *Vitis*.

O domínio LRR é amplamente encontrado em proteínas associadas à defesa vegetal no ataque de patógenos, como as NBS-LRR, RLPs e RLKs (JONES e DANGL, 2006; TENA *et al.*, 2011) desempenhando um importante papel no reconhecimento de moléculas efetoras do patógeno, além de promover a resistência vegetal (MONDRAGON-PALOMINO *et al.*, 2002). Estudos sugerem que as assinaturas de leucina podem conter os padrões <LxxLxxLxxLxLxx>, <LxxLxxLxx>, <LxxLxxL>, <LxxLxL> (JONES e JONES, 1997; BRYAN *et al.*, 2000; BUTTERBACH *et al.*, 2007; FRAZIER *et al.*, 2016). Para as RLPs, RLKs e outras LRR, já foram descritos padrões <LxxLxLxxNxL> como os identificados nesse estudo, repetições desse motivo vão levar à formação de folhas- β paralelas ligadas por *loops* adjacentes, representando o principal local de interação dessas proteínas e de ligação do ligante (BELLA *et al.*, 2008; ASHFIELD *et al.*, 2014). De forma geral, os motivos presentes nos domínios LRR estão envolvidos na detecção de potenciais partículas efetoras de patógenos.

Por sua vez, o motivo *p-kinase*, presente em RLK, foi recentemente identificado com sendo um sítio de acetilação de RLKs em *Arabidopsis* (LIU *et al.*, 2018). A presença de

motivos de acetilação em quinases sugere que pode existir um *crosstalk* entre a acetilação e eventos de fosforilação nessas proteínas. Porém, os mecanismos moleculares envolvidos nessa ação mútua ainda precisam ser bem mais elucidados (LIU *et al.*, 2018).

Em STK, o motivo <GxGxxGx> tem como função a ligação nucleotídica, sendo amplamente encontrado em eucariotos (ZHANG *et al.*, 2007; VAID *et al.*, 2013). Já os motivos <VYKGVV> e <DVYSFG> são considerados característicos das STKs (XU e DENG, 2010).

O motivo identificado neste estudo para RPW8 compreende o principal sinal de direcionamento a membrana extra-haustorial (EHM) em RPW8.2 de *Arabidopsis* (WANG *et al.*, 2013), também indicando uma possível funcionalidade dessas proteínas correspondentes em *Vitis* spp.

Localização Subcelular

As proteínas foram identificadas principalmente no citoplasma, parede celular, membrana plasmática e núcleo. Para Shen (2007), as proteínas *R*, apesar de não apresentarem sinalizadores nucleares, apresentam a tendência de se acumular no núcleo, em resposta à infecção por patógenos. Já Jones e Dangl (2006) relatam que o sistema de vigilância das plantas é composto principalmente por NLRs, com proteínas de reconhecimento de efetores citoplasmáticos, como as NBS-LRR, e por PRRs, com proteínas de detecção de efetores ou padrões apoplásticos, como as RLPs e RLKs.

Neste estudo, foram identificadas proteínas do tipo NLRs e PRRs. Além disso, 288 proteínas STK estavam direcionadas para o núcleo. Curiosamente, as proteínas efetoras de bactérias do gênero *Xanthomonas* têm como alvo o núcleo da célula vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2017), indicando que essas proteínas podem estar atuando efetivamente para impedir o crescimento e a disseminação do patógeno.

Análise fenética

Durante a evolução das angiospermas, diferentes padrões evolutivos foram sugeridos entre as duas subfamílias gênicas TIR-NBS e não-TIR-NBS (YANG *et al.* 2008; SHAO *et al.* 2016), estando incluída nessa última, os membros que apresentam o domínio *Coiled coil* (CC). No presente trabalho foram identificados apenas candidatos a genes NBS-LRR pertencentes à subfamília não-TIR, onde 89 apresentaram o domínio CC. Este resultado

também foi observado no gergelim (*Sesamum indicum*; SHOU et al., 2016), porém a grande maioria das espécies dicotiledôneas apresenta também genes codificadores para TIR-NBS, tais como *Brassica napus* (ALAMERY et al., 2018), *Cicer arietinum* (SAGI et al., 2017), *Vigna unguiculata* (WANDERLEY-NOGUEIRA et al., 2017), *Arachis duranensis* e *A. ipaensis* (SONG et al., 2017). Os estudos que identificaram as duas subfamílias mostram claramente o agrupamento dos genes NBS-LRR de acordo com as mesmas, fornecendo evidências da ausência da subfamília TIR-NBS, na espécie em estudo.

Seleção de genes de referência e validação dos genes de interesse

No presente trabalho, foram avaliados 10 genes de referência candidatos (ACT, CCR4, CNX, CYP, HSP, LOCI, TCBP, TIF3, TRU5 e 60 SRP) em tecidos foliares de duas cultivares (IAC-572 e Red Globe) de *Vitis* sob estresse biótico (inoculação com *X. citri*). Tashiro *et al.* (2013), avaliando 11 genes de referência candidatos em diferentes tecidos (folhas, raízes, sementes, bagas, entre outros) e estágios de desenvolvimento da cultivar ‘*Sauvignon blanc*’, reportaram os genes ACT e TRU5 como os mais estáveis para normalização de 24 tipos de tecidos analisados conjuntamente, bem como entre os quatro primeiros genes quando avaliados em diferentes estágios de desenvolvimento. Em nosso trabalho, o GeNorm indicou ACT e TRU5 como o melhor par de GRs para a cultivar Red Globe, seguidos por TCBP e 60SRP. No NormFinder e Bestkeeper, os resultados foram similares, exceto para ACT, que foi classificado como quarto ou quinto melhor gene, respectivamente. Resultados semelhantes foram relatados por Borges *et al.* (2013), analisando *Vitis vinifera* sob quatro diferentes estresses (inoculação com os fungos *Erysiphe necator* e *Phaeomoniella chlamydospora*, ferimento e irradiação UV-C), sendo verificado que o gene ACT, a depender do tipo de estresse aplicado, apresentava variação em sua expressão, demonstrando que possivelmente este gene pode ser regulado de forma diferente em condições distintas, exibindo um padrão de expressão gênica particular para cada situação de análise.

González-Agüero *et al.* (2013) avaliaram a estabilidade de expressão de 19 genes de referência selecionados em dados de RNA-Seq de diferentes genótipos (obtidos do cruzamento entre as cultivares ‘*Ruby Seedless*’ e ‘*Sultanina*’) em quatro condições fisiológicas e de desenvolvimento (antese, frutificação e bagas tratadas ou não com ácido giberélico) e verificaram que o gene TCBP foi um dos GRs mais estáveis em todas as

amostras testadas. Em nosso trabalho, TCBP foi considerado um dos três melhores genes avaliados nos softwares GeNorm, NormFinder e Bestkeeper, nas duas cultivares de *Vitis*.

No que se refere ao 60SRP, Gamm *et al.* (2011) o relataram como o segundo gene mais apropriado para a normalização de dados de expressão em folhas e bagas de videira infectadas pelos fungos *Plasmopara viticola* e *Botrytis cinerea* em todas as análises estatísticas aplicadas. Em contraste, Monteiro *et al.* (2013), avaliando amostras de cDNA de tecidos foliares de cultivares resistentes e susceptíveis de *V. vinifera* ('Regent' e 'Trincadeira', respectivamente) em diferentes momentos (6, 12, 18 e 24 horas) após a inoculação com *P. viticola*, observaram que o gene 60SRP foi classificado como um dos GRs mais instáveis da avaliação. Tais resultados ressaltam a necessidade de selecionar genes de referência adequados para cada experimento, especialmente em condições de estresse. Neste estudo, 60SRP foi indicado como um dos melhores candidatos entre o conjunto de GRs analisado, tanto para a cultivar IAC 572 quanto para a Red Globe.

De acordo com os resultados obtidos, TRU5, TCBP e 60SRP foram considerados os mais adequados para normalizar as reações de RT-qPCR nas duas cultivares de *Vitis*, sendo então utilizados para validar quatro genes de interesse (NBS-LRR12, RLK, STK e STK4) selecionados nas bibliotecas de RNA-Seq. Desses, RLK e STK não tiveram sua expressão alterada nos tempos avaliados em nenhuma das cultivares. NBS-LRR12 e STK4 não apresentaram expressão diferencial nos dois primeiros tempos (90 minutos e 24 horas após a inoculação), porém, foram superexpressos com 48 horas de estresse na cultivar resistente.

A expressão de genes NBS em resposta a estresses abióticos é muito relatada na literatura, em sua maioria, indicando a superexpressão dessa classe de genes frente a diversos patógenos, tecidos e cultivares. Arya *et al.* (2014) reportam a superexpressão de genes NBS em resposta a infecção por *Alternaria* e *Podosphaera leucotricha* em tecidos foliares de maçã (*Malus domestica*). Resultados similares foram obtidos por Rachana *et al.* (2016) avaliando a expressão de genes NBS em folhas da variedade 'Chowghat Green Dwarf' de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) frente à murcha da raiz, sendo verificados altos níveis de expressão nos genótipos resistentes quando comparado aos genótipos susceptíveis.

Em contraste, Hu *et al.* (2017) relatam perfil de expressão similar de genes NBS em duas cultivares ('Golden Delicious' e 'Starking') de maçã contrastantes quanto à resistência a *A. alternata*, sugerindo que os dois genótipos utilizam as mesmas estratégias de defesa frente ao patógeno. Curiosamente, o perfil de expressão observado variou conforme o tempo de estresse aplicado (0, 6, 18, 36 e 48 horas após a inoculação), com candidatos que não alteraram sua expressão durante todo o estresse, alguns que foram superexpressos apenas em

tempos precoces, outros que foram reprimidos ao longo do estresse, genes que foram reprimidos nos tempos iniciais e superexpressos nos últimos tempos, e por fim, candidatos que alternavam sua expressão (sendo induzidos ou reprimidos) em cada tempo avaliado.

Em nosso estudo, a superexpressão dos genes NBS e STK4 foi verificada com 48 horas após a inoculação por *X. citri* na cultivar resistente, sendo o mesmo não significativo na cultivar susceptível, indicando uma resposta genótipo específica, embora tardia, mas que sugere a participação na resposta de defesa da planta frente ao patógeno.

Lana *et al.* (2017) avaliaram a expressão gênica de análogos de genes de resistência (RGAs) associados à mancha branca do milho, causada pela bactéria *Pantoea ananatis*, em linhagens resistentes e susceptíveis da espécie. Os autores identificaram quatro (*Pto19*, *Pto20*, *Pto99* e *Xa26.151.4*) RGAs que compartilham domínios NBS, LRR e STK, os quais foram preferencialmente expressos em uma linhagem resistente doadora dos alelos associados com a resistência à doença. Em pimenta, Wan *et al.* (2013) analisaram a expressão diferencial de *CaPto1*, *CaPto3*, *CaPto4* e *CaPto8* (codificadores de STK) em diferentes tecidos e sob estresse hormonal (ácido abscísico - ABA e ácido salicílico - AS), abiótico (salinidade, seca, frio e calor) e biótico (inoculação com *Xanthomonas citri* pv *vesicatoria*). Os dados de validação com RT-qPCR revelaram que esses genes tiveram sua expressão alterada em pelo menos um dos tecidos avaliados e que são regulados positivamente na maioria dos tratamentos aplicados.

Ainda são poucos os estudos avaliando a resposta de videira contra bactérias patogênicas, sendo nosso trabalho o primeiro envolvendo a técnica de RNA-Seq e a validação da expressão por RT-qPCR. Também merece destaque a alta cobertura do sequenciamento e o tempo precoce pós-inoculação com o patógeno. Enquanto a ausência de modulação diferencial de genes R nos tempos precoces foi surpreendente, observa-se uma indução no resistente no tempo de 48 horas, indicando uma resposta específica ainda que tardia, a qual pode justificar a “resistência moderada” do híbrido IAC-572, ao passo que a cultivar Red Globe aparentemente faz pouco uso de seu arsenal de genes *R*, sendo altamente susceptível.

5. CONCLUSÕES GERAIS

1. Foram identificados 894 transcritos representantes das cinco classes de genes de resistência no transcriptoma da videira, sendo a RLP, STK e NBS as mais representativas;
2. A classe NSB-LRR apresentou transcritos do tipo *Coiled-coil* apenas, não sendo localizados TIR-NBS-LRR em *Vitis*, tal como ocorre com alguns grupos de Angiospermas, onde se propõe que essa categoria foi perdida ao longo da evolução;
3. Os genes da classe STK foram subdivididos em 22 subgrupos, com destaque para o STK-IRAK que apresentou o maior número de transcritos nessa classe;
4. Os candidatos da classe RPW8 foram pouco representados no transcriptoma de videira e apresentaram expressão constitutiva ou não significativa sob inoculação com *Xanthomonas citri* pv. *viticola*;
5. A seleção de genes de referência com base na análise de estabilidade em *softwares* específicos indicou um conjunto funcional de normalizadores para as duas cultivares de videira (IAC-572 e Red Globe);
6. Os maiores níveis de expressão de genes NBS-LRR e STK ocorreram 48 horas após a inoculação do patógeno indicando uma resposta de defesa tardia no acesso moderadamente resistente (Híbrido IAC-572);
7. Os resultados obtidos neste estudo contribuíram para um melhor entendimento das características moleculares dos genes de resistência e sua participação no processo de defesa ao agente bacteriano em videira, apresentando potencial para desenvolvimento de marcadores moleculares para mapeamento e seleção assistida, bem como aplicação em programas de melhoramento genético da cultura.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Mark D. et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1651-1656, 1991.
- AFROZ, A. et al. Enhanced resistance against bacterial wilt in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) lines expressing the Xa21 gene. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.104, n.2, p.227-237. fev. 2011.
- AGUDELO-ROMERO, Patricia et al. Transcriptome and metabolome reprogramming in *Vitis vinifera* cv. Trincadeira berries upon infection with *Botrytis cinerea*. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 7, p. 1769-1785, 2015.
- ALAMERY, Salman et al. Genome-wide identification and comparative analysis of NBS-LRR resistance genes in *Brassica napus*. **Crop and Pasture Science**, v. 69, n. 1, p. 72-93, 2018.
- AMRINE, Katherine CH et al. Comparative transcriptomics of Central Asian *Vitis vinifera* accessions reveals distinct defense strategies against powdery mildew. **Horticulture research**, v. 2, p. 15037, 2015.
- ANDRADE, V. A. Isolamento e caracterização de sequências expressas similares a genes de resposta de defesa a patógenos em soja. **Tese de Doutorado da Universidade Federal de Viçosa**. P.60-68. 2005.
- ANJOS, L. M. Diversidade genética de *Plasmopara viticola* e mapeamento de QTLs de resistência ao míldio em videira (*Vitis* spp.). 2013. xx, 277 f., il. **Tese de Doutorado em Fitopatologia da Universidade de Brasília**, Brasília, 2013.
- ARAÚJO, J. S. P.; ROBBS, C. F. Sintomatologia, patogenicidade e controle do cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) no Brasil. **Agronomia** v.34, p. 83-86. jan. 2000.
- ARNOLD, Konstantin et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195-201, 2006.
- ARYA, Preeti et al. Genome-wide identification and expression analysis of NBS-encoding genes in *Malus x domestica* and expansion of NBS genes family in Rosaceae. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107987, 2014.
- BAI, Shiwei et al. Structure-function analysis of barley NLR immune receptor MLA10 reveals its cell compartment specific activity in cell death and disease resistance. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, p. e1002752, 2012.
- BARBOSA, Maria Angélica Guimarães; RIBEIRO JUNIOR, P. M.; BATISTA, D. da C. Manejo do cancro bacteriano da videira no Vale do São Francisco. **Embrapa Semiárido- Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2016.
- BARBOSA, Maria Angélica Guimarães et al. **Embrapa Semi-Árido. Sistemas de**

Produção, ISSN 1807-0027, 2010. Disponível em:

<http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spuva/doencas.html>. Acessado em: 20 de junho 2018.

BARBOSA-DA-SILVA, Adriano et al. In silico survey of resistance (R) genes in Eucalyptus transcriptome. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 562-574, 2005.

BAXEVANIS, Andreas D.; OUELLETTE, BF Francis. **Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins**. John Wiley & Sons, 2004.

BEGCY, Kevin et al. A novel stress-induced sugarcane gene confers tolerance to drought, salt and oxidative stress in transgenic tobacco plants. **PLoS one**, v. 7, n. 9, p. e44697, 2012.

BELLA, J. et al. The leucine-rich repeat structure. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, n.15, p.2307-2333, apr. 2008.

BENKO-ISEPPON, Ana Maria et al. Overview on plant antimicrobial peptides. **Current protein & peptide science**, v. 11, n. 3, p. 181, 2010.

BENKO-ISEPPON, A.M. et al. Mendel e suas exceções à luz das ômicas e da biologia de sistemas. In: Francisco J. L. Aragão; José Roberto Moreira. Mendel: 150 anos depois. **Embrapa Edições** (Brasília, DF), ISBN 978-85-7035-705-2. 502 pp 2017.

BIGEARD, Jean; COLCOMBET, Jean; HIRT, Heribert. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular plant**, v. 8, n. 4, p. 521-539, 2015.

BONAS, Ulla; LAHAYE, Thomas. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 1, p. 44-50, 2002.

BORGES, Alexandre Filipe et al. Reference gene validation for quantitative RT-PCR during biotic and abiotic stresses in Vitis vinifera. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111399, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lista de pragas quarentenárias A1, A2 e não quarentenárias regulamentadas. **INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 38, de 14 de OUTUBRO de 1999**. Disponível em:

<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/PDF/in_38_99.pdf>. Acesso em: 26 fev 2018.

BRYAN, Gregory T. et al. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. **The Plant Cell**, v. 12, n. 11, p. 2033-2045, 2000.

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CAMPS, Céline et al. A transcriptomic study of grapevine (Vitis vinifera cv. Cabernet-Sauvignon) interaction with the vascular ascomycete fungus Eutypa lata. **Journal of**

experimental botany, v. 61, n. 6, p. 1719-1737, 2010.

BUTTERBACH, Patrick Bernhard Ernst. **Molecular evolution of the disease resistance gene Rx in Solanum**. 2007.

CHISHOLM, Stephen T. et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 803-814, 2006.

CHOU, Kuo-Chen; SHEN, Hong-Bin. Cell-PLoc 2.0: An improved package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. **Development**, v. 109, p. 1091, 2010.

CHRISTOPOULOU, Marilena et al. Genome-wide architecture of disease resistance genes in lettuce. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 5, n. 12, p. 2655-2669, 2015.

CODEVASF. Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba. 2016. Disponível em: < <http://www.codevasf.gov.br/noticias/2014/exportacao-de-uva-deve-crescer-30-em-projeto-da-codevasf-no-semiarido-baiano/?searchterm=viticultura> >. Acesso em 03 de jun de 2018.

COHN, Jonathan; SESSA, Guido; MARTIN, Gregory B. Innate immunity in plants. **Current opinion in immunology**, v. 13, n. 1, p. 55-62, 2001.

COIMBRA DE SÁ, Natalia; SALVADOR SILVA, Emília Maria; SILVA BANDEIRA, Ariadna da. A cultura da uva e do vinho no Vale do São Francisco. **RDE-Revista de Desenvolvimento Econômico**, 2015.

COITO, João L. et al. Microarray-based uncovering reference genes for quantitative real time PCR in grapevine under abiotic stress. **BMC research notes**, v.5, n.1, p.220, may. 2012.

COL. **Catalogue of Life: 2018 Annual Checklist (COL)**. 2018. Disponível em: < <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2018/> >. Acesso em 03 de jun de 2018.

DALIO, R.J.D. Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp. and European beech (*Fagus sylvatica* L.). Ph.D. Thesis. **Technische Universitaet Muenchen (TUM)**, Freising, Germany, 2013.

DANGL, Jeffery L.; JONES, Jonathan DG. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **nature**, v. 411, n. 6839, p. 826, 2001.

DE MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2011 Bento Gonçalves (Brasil) Brazilian viticulture: panorama 2011 Bento Gonçalves (Brazil). Brazil: **Embrapa Uva e Vinho**, Bento Gonçalves. Artigos Técnicos. 2012.

DE MELLO, Loiva Maria Ribeiro. Panorama da Vitivinicultura brasileira 2014. **Embrapa Uva e Vinho-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2015.

DERCKEL, Jean-Paul et al. Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v. 89, n. 3, p. 197-203, 1999.

DORAK, M. Tevfik (Ed.). **Real-time PCR**. Taylor & Francis, 2007.

DROZDETSKIY, Alexey et al. JPred4: a protein secondary structure prediction server. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W389-W394, 2015.

EMBRAPA UVA E VINHO. **Cultivares de Uva e Porta-Enxertos de Alta Sanidade**. 2018. Disponível em:
<<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/MesaNorteParana/cultivares.htm#copa>>.
Acesso em 26 de fev de 2018.

FACCIOLI, P. et al. Identification of a set of widely expressed genes in grape (*Vitis vinifera* L.) and its functional characterisation: a multi-evidence based study. **Vitis**, v.49, n.4, p.175-179, 2010.

FAJARDO, Thor Vinícius Martins (Ed.). **Uva para processamento: fitossanidade**. Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

FAO. Food and Agriculture Organization (FAO). 2018. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em 26 fevereiro 2018.

FARIAS, T. F. Viticultura e Enologia no Semiárido brasileiro (Submédio do Vale do São Francisco). **Relatório de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2011.

FIGUEIREDO, Andreia et al. Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. **Journal of experimental Botany**, v. 59, n. 12, p. 3371-3381, 2008.

FORDE, Brian G.; ROBERTS, Michael R. Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence?. **F1000prime reports**, v. 6, 2014.

FRAZIER, Taylor P. et al. Identification, characterization, and gene expression analysis of nucleotide binding site (NB)-type resistance gene homologues in switchgrass. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 892, 2016.

FREDERICK, Reid D. et al. Recognition specificity for the bacterial avirulence protein AvrPto is determined by Thr-204 in the activation loop of the tomato Pto kinase. **Molecular cell**, v. 2, n. 2, p. 241-245, 1998.

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

GAMA, Marco AS et al. Polyphasic characterization of pigmented strains of *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. **Plant disease**, v. 95, n. 7, p. 793-802, 2011.

GAMM, Magdalena et al. Identification of reference genes suitable for qRT-PCR in grapevine and application for the study of the expression of genes involved in pterostilbene synthesis. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 285, n. 4, p. 273-285, 2011.

- GARCION, Christophe; LAMOTTE, Olivier; MÉTRAUX, Jean-Pierre. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. **Induced Resistance for Plant Defence**, p. 109-132, 2007.
- GIOVANNINI, E. Manual de Viticultura. Série Tekne, Porto Alegre: Bookman. 194. 2014.
- GONZÁLEZ-AGÜERO, Mauricio et al. Identification of two putative reference genes from grapevine suitable for gene expression analysis in berry and related tissues derived from RNA-Seq data. **BMC genomics**, v.14, n.1, p.878, dec. 2013.
- GRABHERR, Manfred G. et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644, 2011.
- GRANT, Sarah R. et al. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 425-449, 2006.
- GUIMARÃES, P. M. et al. **Análise in silico da expressão gênica diferencial de *Arachis stenosperma* inoculado com *Meloidogyne arenaria***. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), aug. 2005.
- GUTIERREZ, Laurent et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant biotechnology journal**, v. 6, n. 6, p. 609-618, 2008.
- HANKS, Steven K.; HUNTER, Tony. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. **The FASEB journal**, v. 9, n. 8, p. 576-596, 1995.
- HILLER, Karsten et al. JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. **Bioinformatics**, v. 22, n. 19, p. 2441-2443, 2006.
- HU, Xiaoxuan et al. Differential expression of 12 NBS-encoding genes in two apple cultivars in response to *Alternaria alternata* f. sp. mali infection. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 98, n. 2, p. 279-287, 2017.
- JACOB, Florence; VERNALDI, Saskia; MAEKAWA, Takaki. Evolution and conservation of plant NLR functions. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 297, 2013.
- JONES, Jonathan DG; DANGL, Jeffery L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323, 2006.
- JONES D. A, Jones JDG. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. **Adv. Bot. Res**, v. 24, 1997.
- JUNIOR, VA Malavolta et al. Resistência de variedades de videira a *Xanthomonas campestris* pv. viticola. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 70, n. 3, p. 373-376, 2003.

KATAYAMA-IKEGAMI, A. et al. Reference gene validation for gene expression studies using quantitative RT-PCR during berry development of ‘Aki Queen’ grapes. **Vitis: Journal of Grapevine Research**, v. 55, n. 4, p. 157-160, 2016.

KHAN, Mueen Alam; NAEEM, Muhammad; IQBAL, Muhammad. Breeding approaches for bacterial leaf blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.), current status and future directions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, n. 1, p. 27-37, 2014.

KOBE, Bostjan; KAJAVA, Andrey V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. **Current opinion in structural biology**, v. 11, n. 6, p. 725-732, 2001.

KRUIJT, Marco et al. The Cf-4 and Cf-9 resistance genes against *Cladosporium fulvum* are conserved in wild tomato species. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 18, n. 9, p. 1011-1021, 2005.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LACHHAB, Nihed et al. Soybean and casein hydrolysates induce grapevine immune responses and resistance against *Plasmopara viticola*. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 716, 2014.

LANA, Ubiraci Gomes de Paula et al. Quantitative Trait Loci and Resistance Gene Analogs Associated with Maize White Spot Resistance. **Plant disease**, v. 101, n. 1, p. 200-208, 2017.

LEÃO, P. C. S. **Recursos genéticos de videira (Vitis spp.): análise da diversidade e caracterização da coleção de germoplasma da Embrapa semi-árido**. 115p. 2008. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado)—Universidade Federal de Viçosa.

LEAO, PC de S.; BORGES, Rita Mércia Estigarribia. Melhoramento genético da videira. **Embrapa Semiárido-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

LI, Xinlong et al. Comparative transcriptome analysis reveals defense-related genes and pathways against downy mildew in *Vitis amurensis* grapevine. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 95, p. 1-14, 2015.

LI, Pingchuan et al. RGAugury: a pipeline for genome-wide prediction of resistance gene analogs (RGAs) in plants. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 852, 2016.

LIMA, M. F. Cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*-1a parte. **Embrapa Semiárido-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2001.

LIU, Shichang et al. Establishment of dimethyl labelling-based quantitative acetylproteomics in Arabidopsis. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. mcp. RA117. 000530, 2018.

LOMBARDI, J. et al. Vitaceae In: **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica**, São Paulo. v.2, p.365-374. 2002.

LOPES, D. B. L.; NASCIMENTO, Ana Rosa P. Situação atual do cancro bacteriano da videira no semi-árido Nordeste. **seminário novas perspectivas para o cultivo da uva sem sementes. EMBRAPA semiárido, documento**, v. 185, 2004.

LOVE, Michael I.; HUBER, Wolfgang; ANDERS, Simon. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.

LU, Limin et al. Optimal data partitioning, multispecies coalescent and Bayesian concordance analyses resolve early divergences of the grape family (Vitaceae). **Cladistics**, v. 34, n. 1, p. 57-77, 2018.

MALAVOLTA JR, V. A. et al. Occurrence of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* in grape in Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 25, n. 3, p. 262-264, 1999.

MARCOLINO-GOMES, Juliana et al. Functional Characterization of a Putative Glycine max ELF4 in Transgenic Arabidopsis and Its Role during Flowering Control. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 618, 2017.

MARTIN, Gregory B. et al. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. **Science**, v. 262, n. 5138, p. 1432-1436, 1993.

MCHALE, Leah et al. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. **Genome biology**, v. 7, n. 4, p. 212, 2006.

MELLO, L. M. R. Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2017. **Anuário HF, Campo & Negócio**, p. 112-116, maio. 2018.

MELOTTO, M. et al. The anthracnose resistance locus Co-4 of common bean is located on chromosome 3 and contains putative disease resistance-related genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, n. 4, p. 690-699, 2004.

MEYERS, Blake C. et al. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. **The Plant Journal**, v. 20, n. 3, p. 317-332, 1999.

MICHEREFF, Sami Jorge; BARROS, Reginaldo. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. UFRPE, 2001.

MILLER, Robert NG et al. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 15, 2008.

MIYA, Ayako et al. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19613-19618, 2007.

MOFFETT, P. Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. In: **Advances in virus research**. Academic Press, 2009. p. 1-229.

MONDRAGÓN-PALOMINO, Mariana et al. Patterns of positive selection in the complete NBS-LRR gene family of *Arabidopsis thaliana*. **Genome research**, v. 12, n. 9, p. 1305-1315, 2002.

MONTEIRO, Filipa et al. Reference gene selection and validation for the early responses to downy mildew infection in susceptible and resistant *Vitis vinifera* cultivars. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e72998, 2013.

MORAIS, D. A. L. Análise bioinformática de genes de resistência a patógenos no genoma da cana-de-açúcar. **Tese de Doutorado da Universidade Federal de Pernambuco**, Recife. 2003.

PEIXOTO, Ana Rosa Nascimento; RAMOS, Rosa de Lima Mariano. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 301-307, 2004.

NASCIMENTO, Sabrina; SUAREZ, Eloah Rabello; PINHAL, Maria Aparecida da Silva. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 7-19, 2010.

NAUE, CARINE ROSA et al. Efeito do tratamento de bacelos de videira Red Globe no controle do cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. viticola. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

NAWKAR, Ganesh M. et al. In silico study on *Arabidopsis* BAG gene expression in response to environmental stresses. **Protoplasma**, v. 254, n. 1, p. 409-421, 2017.

NEGI, Bhawana et al. Molecular cloning, in-silico characterization and functional validation of monodehydroascorbate reductase gene in *Eleusine coracana*. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0187793, 2017.

OFFORD, V.; COFFEY, T. J.; WERLING, D. LRRfinder: a web application for the identification of leucine-rich repeats and an integrative Toll-like receptor database. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 10, p. 1035-1041, 2010.

OIV. **International Organisation of Vine and Wine (OIV)**. Disponível em: <http://www.oiv.int/public/medias/5479/oiv-en-bilan-2017.pdf>. 2017 Acesso em 03 de junho de 2018.

OLIVEIRA, J. E. M; Paranhos, B. A. J; Moreira, A. N. **Embrapa Semi-Árido**. Sistemas de Produção, 2010. Disponível em: http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/sistema_producao/spuva/pragas.html.>. Acessado em: 20 de junho de 2018.

OSUNA-CRUZ, Cristina M. et al. PRGdb 3.0: a comprehensive platform for prediction and analysis of plant disease resistance genes. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D1197-D1201, 2017.

PAGE, Roderic DM. Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Bioinformatics**, v. 12, n. 4, p. 357-358, 1996.

PANDOLFI, Valesca et al. Resistance (R) genes: applications and prospects for plant biotechnology and breeding. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, n. 4, p. 323-334, 2017.

PEDLEY, Kerry F.; MARTIN, Gregory B. Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. **Annual review of phytopathology**, v. 41, n. 1, p. 215-243, 2003.

POMMER, C. V.; TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P. Cultivares, melhoramento e fisiologia. **POMMER, CV Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes**, p. 109-152, 2003.

PELLIZZARI, G. Grapevine. In: **World Crop Pests**. Elsevier. p.323-331. 1997.

PFAFFL, Michael W.; HORGAN, Graham W.; DEMPFLER, Leo. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36-e36, 2002.

POLESANI, Marianna et al. General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 117, 2010.

POMMER, C. V. Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. **Porto Alegre: Cinco Continentes**, v.777. 2003.

PROTAS, JF da S.; CAMARGO, Umberto Almeida; DE MELLO, L. M. R. A Viticultura brasileira: realidade e perspectivas. In: **Embrapa Uva e Vinho-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1., 2002, Andradas, MG. Anais... Viticultura e Enologia: atualizando conceitos. Caldas: EPAMIG, 2002., 2002.

PROTAS, JF da S.; CAMARGO, Umberto Almeida; DE MELLO, L. M. R. A Viticultura brasileira: realidade e perspectivas. In: **Embrapa Uva e Vinho-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1., 2002, Andradas, MG. Anais... Viticultura e Enologia: atualizando conceitos. Caldas: EPAMIG, 2002., 2002.

PRYOR, T.; ELLIS, J. Genetic complexity of fungal resistance genes in plants. **Advances in Plant Pathology**, 1993.

QIAN, Wei et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome research**, v. 15, n. 6, p. 757-767, 2005.

RACHANA, Kaitheri Edathil et al. Cloning, characterization and expression analysis of NBS-LRR-type resistance gene analogues (RGAs) in coconut. **Acta Botanica Croatica**, v. 75, n. 1, p. 1-10, 2016.

RAIRDAN, Gregory J. et al. The coiled-coil and nucleotide binding domains of the potato Rx disease resistance protein function in pathogen recognition and signaling. **The Plant Cell**, v. 20, n. 3, p. 739-751, 2008.

REID, Karen E. et al. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. **BMC plant biology**, v. 6, n. 1, p. 27, 2006.

ROBINSON, Mark D.; MCCARTHY, Davis J.; SMYTH, Gordon K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.

ROZEN, Steve; SKALETSKY, Helen. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: **Bioinformatics methods and protocols**. Humana Press, Totowa, NJ, 2000. p. 365-386.

SAGI, Mandeep S.; DEOKAR, Amit A.; TAR'AN, Bunyamin. Genetic analysis of NBS-LRR gene family in chickpea and their expression profiles in response to *Ascochyta* blight infection. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 838, 2017.

SALVAUDON, Lucie; HÉRAUDET, Virginie; SHYKOFF, Jacqui A. Parasite-host fitness trade-offs change with parasite identity: genotype-specific interactions in a plant-pathogen system. **Evolution**, v. 59, n. 12, p. 2518-2524, 2005.

SANABRIA, Natasha M.; HUANG, Ju-Chi; DUBERY, Ian A. Self/non-self perception in plants in innate immunity and defense. **Self/nonself**, v. 1, n. 1, p. 40-54, 2010.

SCHWESSINGER, Benjamin; ZIPFEL, Cyril. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 389-395, 2008.

SECRETARIA DA EDUCAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ, Disponível em: <<http://www.geografia.seed.pr.gov.br/modules/galeria/detalhe.php?foto=1421&evento=5>>. Acesso em 05 de jun. 2018.

SELIM, M. et al. Identification of suitable reference genes for real-time RT-PCR normalization in the grapevine-downy mildew pathosystem. **Plant cell reports**, v. 31, n. 1, p. 205-216, 2012.

SHANG, Junjun et al. Identification of a new rice blast resistance gene, Pid3, by genomewide comparison of paired nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. **Genetics**, v. 182, n. 4, p. 1303-1311, 2009.

SHAO, Zhu-Qing et al. Large-scale analyses of angiosperm nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes reveal three anciently diverged classes with distinct evolutionary patterns. **Plant physiology**, v. 170, n. 4, p. 2095-2109, 2016.

SHEN, Qian-Hua et al. Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. **science**, v. 315, n. 5815, p. 1098-1103, 2007.

SHIU, Shin-Han; BLEECKER, Anthony B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10763-10768, 2001.

SHIU, Shin-Han; BLEECKER, Anthony B. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 132, n. 2, p. 530-543, 2003.

SILVA, ADRIANO MÁRCIO FREIRE et al. Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira. **Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2012.

SOEJIMA, Akiko; WEN, Jun. Phylogenetic analysis of the grape family (Vitaceae) based on three chloroplast markers. **American Journal of Botany**, v. 93, n. 2, p. 278-287, 2006.

SONG, Wen-Yuan et al. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. **science**, v. 270, n. 5243, p. 1804-1806, 1995.

SONG, Hui et al. Comparative analysis of NBS-LRR genes and their response to *Aspergillus flavus* in *Arachis*. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0171181, 2017.

STANGARLIN, José R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18, 2011.

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

TAKAGI, Hiroki et al. Rice blast resistance gene Pii is controlled by a pair of NBS-LRR genes Pii-1 and Pii-2. **bioRxiv**, p. 227132, 2017.

TANG, Xiaoyan et al. Overexpression of Pto activates defense responses and confers broad resistance. **The Plant Cell**, v. 11, n. 1, p. 15-29, 1999.

TASHIRO, Rebecca M.; PHILIPS, Joshua G.; WINEFIELD, Christopher S. Identification of suitable grapevine reference genes for qRT-PCR derived from heterologous species. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 1, p. 483-492, 2016.

TENA, Guillaume; BOUDSOCQ, Marie; SHEEN, Jen. Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 5, p. 519-529, 2011.

THIS, Patrice; LACOMBE, Thierry; THOMAS, Mark R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **TRENDS in Genetics**, v. 22, n. 9, p. 511-519, 2006.

TOSTES, G. O. Contribuições Ao Estudo Bioquímico Molecular e Epidemiológico de *Xanthomonas Campestris* Pv. *Viticola* e Implicações No Patossistema do Cancro Bacteriano Da Videira. **Dissertação de Mestrado da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, 2012.

TRAUT, Thomas W. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. In: **EJB Reviews 1994**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1994. p. 105-115.

TUZUN, Sadik. **Plant immunization: an alternative to pesticides for control of plant diseases in the greenhouse and field**. 1991.

VAID, Neha; MACOVEI, Anca; TUTEJA, Narendra. Knights in action: lectin receptor-like kinases in plant development and stress responses. **Molecular plant**, v. 6, n. 5, p. 1405-1418, 2013.

VAN LEEUWEN, Hans et al. Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes. **Molecular genetics and genomics**, v. 273, n. 3, p. 240-251, 2005.

VELCULESCU, Victor E. et al. Serial analysis of gene expression. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 484-487, 1995.

VENTURINI, Luca et al. De novo transcriptome characterization of *Vitis vinifera* cv. Corvina unveils varietal diversity. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 41, 2013.

WAN, Hongjian et al. Identification, phylogeny, and expression analysis of Pto-like genes in pepper. **Plant molecular biology reporter**, v. 31, n. 4, p. 901-916, 2013.

WANDERLEY-NOGUEIRA, Ana Carolina et al. Abundance and diversity of resistance genes in the sugarcane transcriptome revealed by in silico analysis. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 6, n. 4, p. 866-89, 2007.

WANDERLEY-NOGUEIRA, Ana Carolina et al. Insight on pathogen defense mechanisms in the sugarcane transcriptome. **Funct Plant Sci Biotechnol**, v. 6, p. 134-148, 2012.

WANDERLEY-NOGUEIRA, Ana Carolina et al. Plant Elite Squad: first defense line and resistance genes—identification, diversity and functional roles. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, n. 4, p. 294-310, 2017.

WANG, Wenming et al. A comprehensive mutational analysis of the Arabidopsis resistance protein RPW8. 2 reveals key amino acids for defense activation and protein targeting. **The Plant Cell**, p. tpc. 113.117226, 2013.

XIAO, Shunyuan et al. Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. **Science**, v. 291, n. 5501, p. 118-120, 2001.

XIAO, Shunyuan et al. The Arabidopsis genes RPW8. 1 and RPW8. 2 confer induced resistance to powdery mildew diseases in tobacco. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 16, n. 4, p. 289-294, 2003.

XU, Wei-Hui et al. The autophosphorylated Ser686, Thr688, and Ser689 residues in the intracellular juxtamembrane domain of XA21 are implicated in stability control of rice receptor-like kinase. **The Plant Journal**, v. 45, n. 5, p. 740-751, 2006.

XU, Qiang; DENG, Xiuxin. Cloning and phylogenetic analyses of serine/threonine kinase class defense-related genes in a wild fruit crop 'chestnut rose'. **BMC research notes**, v. 3, n. 1, p. 202, 2010.

YACOUB, A. et al. Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeomoniella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease. **Biological control**, v. 92, p. 7-16, 2016.

YANG, Sihai et al. Recent duplications dominate NBS-encoding gene expansion in two woody species. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 280, n. 3, p. 187-198, 2008.

YOU-XIONG, Q. U. E. et al. Isolation and characterization of NBS-LRR resistance gene analogs from sugarcane. **Acta Agronomica Sinica**, v. 35, n. 4, p. 631-639, 2009.

ZHANG, Xiaowen et al. Genome-wide survey of putative serine/threonine protein kinases in cyanobacteria. **BMC genomics**, v. 8, n. 1, p. 395, 2007.

ZHANG, Ningbo et al. Genome-wide evolutionary characterization and expression analyses of major latex protein (MLP) family genes in *Vitis vinifera*. **Molecular genetics and genomics**, v. 293, n. 5, p. 1061-1075, 2018.

ZHAO, Lu et al. An improved CTAB–ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. **Phytochemical analysis**, v. 23, n. 6, p. 647-650, 2012.

ANEXOS

ANEXO A. SEQUÊNCIAS SONDA (*seed sequences*) UTILIZADAS PARA MINERAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA EM *Vitis* spp.

Classe	Banco de dados	ID	Espécie	Gene	ORF
I	NCBI	AAD27815.1	<i>S. lycopersicum</i>	I2	1266
	NCBI	A54810	<i>N. glutinosa</i>	N	1144
	NCBI	AAK38117.1	<i>A. thaliana</i>	RPS2	909
	NCBI	NP_190237.1	<i>A. thaliana</i>	RPP13	835
	NCBI	OAP03581.1	<i>A. thaliana</i>	RPP13	842
	NCBI	NP_001328661.1	<i>A. thaliana</i>	RPP4	985
	NCBI	NP_193420.2	<i>A. thaliana</i>	RPP4	1147
	NCBI	AAF08790.1	<i>A. thaliana</i>	RPP5	1361
	NCBI	NP_001332592.1	<i>A. thaliana</i>	RPP8	908
	NCBI	BAB11393.1	<i>A. thaliana</i>	RPS4	1232
	NCBI	AAD25976.1	<i>L. usitatissimum</i>	L	1294
	NCBI	T18548	<i>L. usitatissimum</i>	M	1305
	NCBI	AAK28806.1	<i>L. usitatissimum</i>	P2	1211
	NCBI	AAF09256.1	<i>C. chacoense</i>	BS2	905
	NCBI	A54810	<i>N. glutinosa</i>	N	1144
	NCBI	AAF04603.1	<i>S. tuberosum</i>	Gpa2	912
	NCBI	CAB56299.1	<i>S. acaule</i>	Rx2	938
	NCBI	CAD29728.1	<i>S. lycopersicum</i>	HERO	1283
	NCBI	AAC72977.1	<i>A. thaliana</i>	RPP1-WsA	1189
II	NCBI	2207203A	<i>S. lycopersicum</i>	Cf-2	1112
	NCBI	CAA05268.1	<i>S. habrochaites</i>	Cf-4	806
	NCBI	AAC78591.1	<i>S. lycopersicum</i>	Cf-5	968
	NCBI	AAN15323.1	<i>A. thaliana</i>	Cf-5	326
	NCBI	AAA65235.1	<i>S. pimpinellifolium</i>	Cf-9	863

III	NCBI	XP_006427561.2	<i>C. clementina</i>	Cf-9	985
	NCBI	AAC78591.1	<i>S. lycopersicum</i>	CF-5	968
	UniProt	Q2R2D5	<i>O. sativa Japonica</i>	Xa21	1037
	NCBI	NP_001053894.1	<i>O. sativa Japonica</i>	OsFLS2	1183
	NCBI	NP_199445.1	<i>A. thaliana</i>	FLS2	1173
	NCBI	NP_197548	<i>A. thaliana</i>	EF-TU receptor	1031
	NCBI	NP_177451.1	<i>A. thaliana</i>	PEP1 receptor 1	1123
	NCBI	AAC49302	<i>A. thaliana</i>	ERECTA	976
	NCBI	BAB11088.1	<i>A. thaliana</i>	FLS2	1173
	NCBI	AAC49123.1	<i>O. sativa Indica</i>	Xa21	1025
IV	NCBI	At4g36180	<i>A. thaliana</i>	MAR1	1136
	NCBI	AAF26772	<i>A. thaliana</i>	CLAVATA1	978
	NCBI	2112354A	<i>S. lycopersicum</i>	Pto	321
	NCBI	AAM53295.1	<i>A. thaliana</i>	MAP kinase ATMPK6	395
	NCBI	AAC49629.1	<i>T. aestivum</i>	LRK10	636
V	NCBI	AAC61805.1	<i>S. lycopersicum</i>	Pti1	354
	UniProt	Q9C5Z6	<i>A. thaliana</i>	RPW8	174
	UniProt	Q9C5Z7	<i>A. thaliana</i>	RPW8	148

ANEXO B. TRANSCRITOS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E ANCORAGEM DOS GENES DA CLASSE NBS-LRR

Classe I	ID	Nº	ORFs	p.I	p.M	Localização subcelular	Loci
NBS	VV_DN49750_c2_g1_i9	NBS-1	324	5.84	37.13	Citoplasma	chr9
	VV_DN3199_c0_g2_i1	NBS-2	233	5.53	26.41	Citoplasma	chr15
	VV_DN56843_c0_g3_i7	NBS-3	235	5.04	27.23	Citoplasma/cloroplasto	chr15
	VV_DN37193_c0_g1_i1	NBS-4	294	5.47	33.70	Citoplasma	chr5
	VV_DN56437_c1_g3_i1	NBS-5	405	6.69	47.02	Citoplasma	chr5
	VV_DN35817_c0_g1_i2	NBS-6	323	7.68	37.33	Citoplasma	chr15
	VV_DN37367_c0_g1_i1	NBS-7	390	7.91	44.42	Citoplasma	chrUn
	VV_DN56550_c2_g1_i12	NBS-8	287	6.10	33.29	Citoplasma	chr12
	VV_DN53900_c1_g4_i3	NBS-9	421	6.14	48.63	Citoplasma	chr13
	VV_DN53900_c1_g4_i2	NBS-10	442	6.45	49.72	Citoplasma	chr13
	VV_DN50729_c0_g1_i4	NBS-11	423	5.74	47.18	Cloroplasto/ Citoplasma/ Núcleo	chr13
	VV_DN56550_c2_g1_i10	NBS-12	276	6.34	31.91	Citoplasma	chr12
	VV_DN56550_c2_g1_i7	NBS-13	297	6.67	34.03	Citoplasma	chr12
	VV_DN50729_c0_g1_i1	NBS-14	464	5.46	52.25	Citoplasma	chr13
	VV_DN39787_c0_g1_i1	NBS-15	595	6.39	68.39	Membrana celular/ Citoplasma	chr13
	VV_DN39560_c0_g1_i2	NBS-16	300	6.82	34.47	Citoplasma	chr7_random
	VV_DN56781_c2_g1_i15	NBS-17	823	6.05	93.05	Membrana celular/ Citoplasma	chr19

VV_DN56781_c2_g1_i10	NBS-18	868	5.93	98.31	Citoplasma	chr19
VV_DN56781_c2_g1_i8	NBS-19	864	6.08	97.38	Membrana celular/ Citoplasma	chr19
VV_DN56781_c2_g1_i7	NBS-20	869	5.69	98.40	Citoplasma	chr19
VV_DN56550_c2_g1_i8	NBS-21	296	5.99	34.17	Citoplasma	chr12
VV_DN56550_c2_g1_i3	NBS-22	285	5.69	32.75	Citoplasma	chr12
VV_DN9993_c0_g1_i1	NBS-23	377	6.38	42.89	Citoplasma	chr19
VV_DN53900_c1_g6_i3	NBS-24	313	5.48	36.04	Citoplasma	chr13
VV_DN56437_c1_g3_i2	NBS-25	402	6.49	46.45	Cloroplasto/ Citoplasma	Chr5
VV_DN43348_c0_g4_i1	NBS-26	261	6.43	29.68	Citoplasma	chr19
VV_DN32604_c0_g1_i1	NBS-27	263	8.47	30.08	Citoplasma	chr13_random
VV_DN56906_c7_g3_i2	NBS-28	297	5.17	33.58	Citoplasma	chr13
VV_DN56906_c7_g3_i1	NBS-29	297	4.94	33.64	Citoplasma	chr13
VV_DN51902_c0_g2_i2	NBS-30	420	8.17	48.58	Citoplasma	chr12
VV_DN51902_c0_g2_i1	NBS-31	420	8.17	48.58	Citoplasma	chr12
VV_DN49421_c2_g1_i2	NBS-32	294	5.20	33.53	Citoplasma	chr13
VV_DN39476_c0_g6_i1	NBS-33	235	7.87	26.56	Citoplasma	chr19
VV_DN55178_c0_g1_i1	NBS-34	299	4.81	34.50	Citoplasma	chr9
VV_DN43348_c0_g6_i2	NBS-35	251	8.25	28.37	Citoplasma	chr19
VV_DN52714_c0_g2_i6	NBS-36	528	7.93	60.52	Citoplasma	chr15

VV_DN55847_c2_g3_i3	NBS-37	224	6.66	25.95	Citoplasma	chr9
VV_DN55847_c2_g2_i1	NBS-38	194	4.97	22.14	Citoplasma	chr9
VV_DN56751_c2_g1_i5	NBS-39	1005	5.27	113.30	Membrana celular Citoplasma	chr19
VV_DN45274_c0_g3_i1	NBS-40	982	5.32	110.20	Membrana celular Citoplasma	Chr6
VV_DN53201_c0_g3_i1	NBS-41	309	5.10	35.23	Citoplasma	chr9
VV_DN55847_c2_g3_i5	NBS-42	248	8.31	28.25	Citoplasma	Chr3
VV_DN53201_c0_g3_i12	NBS-43	229	5.32	25.95	Citoplasma	chr9
VV_DN53201_c0_g3_i10	NBS-44	237	5.48	27.11	Citoplasma	chr9
VV_DN53201_c0_g3_i8	NBS-45	377	5.59	43.04	Citoplasma	chr9
VV_DN53201_c0_g3_i2	NBS-46	376	6.00	42.65	Citoplasma	chr9
VV_DN53201_c0_g3_i7	NBS-47	311	5.98	35.18	Citoplasma	chr9
VV_DN53201_c0_g3_i6	NBS-48	314	5.35	35.65	Citoplasma	chr9
VV_DN53201_c0_g3_i3	NBS-49	312	5.24	35.39	Citoplasma /Núcleo	chr9
VV_DN47380_c0_g4_i6	NBS-50	255	5.99	28.40	Citoplasma	chr14
VV_DN47380_c0_g4_i9	NBS-51	252	6.09	27.90	Citoplasma	chr14
VV_DN47380_c0_g4_i5	NBS-52	254	5.99	28.13	Citoplasma	chr14
VV_DN47380_c0_g4_i4	NBS-53	235	5.65	26.14	Citoplasma	chr14
VV_DN47380_c0_g4_i1	NBS-54	255	7.16	28.28	Citoplasma	chr14
VV_DN45247_c0_g3_i2	NBS-55	456	8.88	51.17	Citoplasma	chr14

	VV_DN45247_c0_g3_i1	NBS-56	456	8.15	50.90	Citoplasma	chr14
	VV_DN56909_c2_g2_i1	NBS-57	537	5.63	60.37	Citoplasma	chr14
	VV_DN55453_c3_g1_i1	NBS-58	320	7.99	35.56	Citoplasma	chr14
	VV_DN12776_c0_g1_i1	NBS-59	417	7.29	47.35	Citoplasma	chr14
	VV_DN55453_c3_g1_i4	NBS-60	347	5.68	39.07	Citoplasma	chr14
	VV_DN55453_c3_g1_i2	NBS-61	318	5.14	35.52	Citoplasma	chr14
	VV_DN55453_c3_g1_i3	NBS-62	318	7.33	35.33	Citoplasma	chr14
	VV_DN44112_c1_g4_i1	NBS-63	253	9.08	28.67	Citoplasma	chr13
	VV_DN56893_c2_g2_i1	NBS-64	453	5.62	51.89	Citoplasma	chr9
	VV_DN56843_c0_g3_i2	NBS-65	390	5.37	44.40	Citoplasma	chr15
	VV_DN56863_c2_g1_i2	NBS-66	348	8.84	39.30	Citoplasma	chr15
	VV_DN56843_c0_g3_i5	NBS-67	299	7.89	28.99	Citoplasma	chr15
	VV_DN56831_c1_g1_i4	NBS-68	988	5.20	112.50	Citoplasma	chr7_random
	VV_DN56657_c0_g1_i5	NBS-69	1160	6.19	131.96	Citoplasma	chr13
	VV_DN56657_c0_g1_i3	NBS-70	1076	6.23	122.30	Citoplasma	chr13
CC-NBS-LRR	VV_DN56086_c0_g1_i1	NBS-71	650	6.56	74.25	Citoplasma	chr11
	VV_DN56081_c0_g1_i2	NBS-72	1426	6.04	161.46	Membrana celular/ Citoplasma	chr6
	VV_DN55712_c0_g2_i2	NBS-73	1036	6.51	119.16	Citoplasma	chr5
	VV_DN55057_c0_g1_i4	NBS-74	729	7.60	82.92	Citoplasma	chr13_random

	VV_DN53515_c0_g1_i2	NBS-75	708	7.60	80.49	Citoplasma	chr19
	VV_DN53515_c0_g1_i1	NBS-76	745	7.60	84.42	Citoplasma	chr19
	VV_DN52344_c1_g1_i9	NBS-77	917	9.13	105.22	Citoplasma	chr13
	VV_DN52344_c1_g1_i6	NBS-78	918	8.69	105.34	Citoplasma	chr13
	VV_DN52344_c1_g1_i2	NBS-79	917	9.13	105.22	Citoplasma	chr13
	VV_DN50406_c0_g1_i1	NBS-80	1448	6.10	164.46	Membrana celular/ Citoplasma	chr19
	VV_DN45817_c0_g1_i1	NBS-81	912	8.56	105.81	Citoplasma	chrUn
	VV_DN44714_c0_g1_i2	NBS-82	1071	6.62	121.15	Citoplasma	chr13
	VV_DN44714_c0_g1_i1	NBS-83	1112	6.65	125.66	Membrana celular/ Citoplasma	chr13
	VV_DN53274_c0_g1_i3	NBS-84	850	6.15	96.23	Citoplasma	chr4
	VV_DN53274_c0_g1_i1	NBS-85	850	6.15	96.22	Citoplasma	chr4
	VV_DN52714_c0_g2_i7	NBS-86	912	7.18	104.96	Citoplasma	chr15
	VV_DN52714_c0_g2_i3	NBS-87	857	7.52	98.70	Citoplasma	chr15
	VV_DN52344_c1_g1_i8	NBS-88	917	8.16	105.06	Citoplasma	chr13
	VV_DN52344_c1_g1_i1	NBS-89	917	8.16	105.06	Citoplasma	chr13
	VV_DN41491_c0_g1_i1	NBS-90	915	7.28	105.18	Citoplasma	chr12
CC-NBS	VV_DN56884_c2_g1_i3	NBS-91	584	5.70	66.92	Citoplasma	chrUn
	VV_DN56863_c2_g1_i1	NBS-92	523	5.81	64.26	Citoplasma	chr12
	VV_DN56805_c2_g1_i3	NBS-93	457	5.85	52.13	Citoplasma	chr9

VV_DN56805_c2_g1_i2	NBS-94	510	5.58	57.86	Citoplasma	chr9
VV_DN56783_c3_g6_i5	NBS-95	613	5.52	70.15	Citoplasma	chr13
VV_DN56783_c3_g6_i4	NBS-96	613	5.68	70.28	Cloroplasto/ Citoplasma	chr13
VV_DN56695_c0_g1_i5	NBS-97	619	6.66	70.12	Citoplasma	chr8
VV_DN56695_c0_g1_i1	NBS-98	587	6.26	66.78	Citoplasma	chr8
VV_DN56621_c0_g1_i3	NBS-99	508	5.63	57.98	Citoplasma	chr1
VV_DN56086_c0_g1_i4	NBS-100	597	6.30	68.01	Cloroplasto/ Citoplasma	chr11
VV_DN56086_c0_g1_i2	NBS-101	597	6.53	68.18	Citoplasma	chr11
VV_DN55952_c0_g1_i9	NBS-102	473	5.50	53.31	Citoplasma	chr17
VV_DN55952_c0_g1_i7	NBS-103	510	5.43	57.78	Cloroplasto/ Citoplasma	chr17
VV_DN55952_c0_g1_i6	NBS-104	509	5.43	57.49	Citoplasma	chr17
VV_DN55712_c0_g2_i4	NBS-105	667	6.28	76.98	Cloroplasto/ Citoplasma	chr5
VV_DN55712_c0_g2_i3	NBS-106	667	6.28	76.98	Cloroplasto/ Citoplasma	chr5
VV_DN55712_c0_g2_i1	NBS-107	667	6.39	76.94	Cloroplasto/ Citoplasma	chr5
VV_DN53900_c1_g6_i1	NBS-108	513	5.54	59.14	Cloroplasto/ Citoplasma	chr13
VV_DN53900_c1_g1_i1	NBS-109	372	6.36	41.87	Citoplasma	chr18
VV_DN53201_c0_g3_i11	NBS-110	375	7.48	42.45	Citoplasma	chr9
VV_DN52744_c2_g2_i1	NBS-111	523	5.56	59.55	Citoplasma	chr13
VV_DN52714_c0_g1_i5	NBS-112	551	8.66	63.81	Citoplasma	chr16

	VV_DN52714_c0_g1_i2	NBS-113	572	8.30	66.09	Citoplasma	chr16
	VV_DN43630_c0_g1_i1	NBS-114	440	6.51	49.46	Citoplasma	chr17
	VV_DN43348_c0_g3_i2	NBS-115	483	5.27	54.63	Citoplasma	chr13
	VV_DN43348_c0_g3_i1	NBS-116	507	6.25	57.25	Cloroplasto/ Citoplasma	chr19
	VV_DN39476_c0_g4_i1	NBS-117	346	6.03	39.66	Citoplasma	chr19
	VV_DN38781_c0_g2_i2	NBS-118	493	6.35	56.16	Citoplasma	chr13
	VV_DN38781_c0_g2_i1	NBS-119	455	6.10	51.87	Citoplasma	chr13
	VV_DN38024_c0_g1_i1	NBS-120	480	5.52	54.02	Cloroplasto/ Citoplasma	chr13
	VV_DN53936_c0_g1_i1	NBS-121	586	7.18	67.17	Citoplasma	chr17
	VV_DN52714_c0_g2_i8	NBS-122	656	8.09	75.22	Citoplasma	chr15
	VV_DN52714_c0_g2_i4	NBS-123	623	7.51	71.55	Citoplasma	chr15
NBS-LRR	VV_DN56913_c4_g2_i7	NBS-124	859	7.22	96.77	Membrana celular/ Citoplasma	chr13
	VV_DN56907_c3_g5_i2	NBS-125	975	5.78	110.65	Membrana celular/ Citoplasma	chr13
	VV_DN56873_c1_g1_i6	NBS-126	978	6.25	110.84	Membrana celular/ Citoplasma	chr13
	VV_DN56781_c2_g1_i6	NBS-127	703	6.20	79.44	Membrana celular/ Citoplasma	chr19
	VV_DN56055_c1_g1_i1	NBS-128	891	5.08	100.48	Membrana celular/ Citoplasma	chr11
	VV_DN54862_c1_g1_i6	NBS-129	739	5.84	86.03	Membrana celular/ Citoplasma	chr19
	VV_DN54862_c1_g1_i16	NBS-130	756	5.77	86.85	Membrana celular/ Citoplasma	chr19

VV_DN54862_c1_g1_i1	NBS-131	746	5.91	86.90	Membrana celular/ Citoplasma	chr19
VV_DN52830_c0_g3_i3	NBS-132	754	5.63	85.64	Membrana celular/ Citoplasma	chr11
VV_DN52830_c0_g3_i2	NBS-133	754	5.70	85.59	Membrana celular/ Citoplasma	chr11
VV_DN43730_c0_g2_i1	NBS-134	1282	7.31	145.77	Citoplasma	chr6
VV_DN38212_c0_g1_i4	NBS-135	880	5.88	99.14	Membrana celular/ Citoplasma	chr19
VV_DN38212_c0_g1_i3	NBS-136	880	5.88	99.14	Membrana celular/ Citoplasma	chr19
VV_DN38212_c0_g1_i2	NBS-137	914	5.78	103.07	Citoplasma	chr19
VV_DN38212_c0_g1_i1	NBS-138	914	5.78	103.07	Citoplasma	chr19
VV_DN35817_c0_g1_i1	NBS-139	691	9.46	78.91	Membrana celular/ Citoplasma	chr15
VV_DN29282_c0_g2_i1	NBS-140	1007	6.02	114.74	Membrana celular/ Citoplasma	chr15
VV_DN29282_c0_g1_i2	NBS-141	1044	6.42	118.65	Membrana celular/ Citoplasma	chr15
VV_DN29282_c0_g1_i1	NBS-142	1070	6.26	121.74	Membrana celular/ Citoplasma	chr15
VV_DN53274_c0_g1_i2	NBS-143	745	6.60	83.94	Citoplasma	chr4
VV_DN52433_c1_g1_i7	NBS-144	856	8.81	98.22	Citoplasma	chr13
VV_DN52433_c1_g1_i4	NBS-145	856	8.89	98.20	Citoplasma	chr13

ANEXO C. TRANSCRITOS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E ANCORAGEM DOS GENES DA CLASSE RLP

Classe II	ID	Nº	ORF	p.I	p.M	Localização subcelular	Loci
	VV_DN56782_c5_g3_i2	RLP-1	359	5,64	66,04	Parede celular e núcleo	chr18
	VV_DN56869_c1_g1_i2	RLP-2	885	8,10	63,67	Parede celular	chr1
	VV_DN55936_c1_g4_i4	RLP-3	1032	8,67	50,86	Parede celular	chrUn
	VV_DN45825_c0_g1_i1	RLP-4	297	8,60	65,70	Parede celular e núcleo	chr10
	VV_DN38989_c0_g2_i1	RLP-5	352	5,02	124,68	Núcleo	chr16
	VV_DN55856_c0_g1_i2	RLP-6	408	5,78	114,59	Núcleo	chr19
	VV_DN46807_c0_g1_i1	RLP-7	364	5,59	88,89	Parede celular	chr6
	VV_DN56732_c0_g3_i7	RLP-8	281	5,80	69,33	Parede celular e núcleo	chr6
	VV_DN56732_c0_g3_i5	RLP-9	427	5,73	69,36	Parede celular e núcleo	chr6
	VV_DN56867_c3_g1_i1	RLP-10	356	5,74	99,74	Parede celular	chrUn
	VV_DN48427_c0_g1_i3	RLP-11	359	6,58	114,04	Parede celular	chr9
	VV_DN55809_c0_g1_i8	RLP-12	885	9,08	42,55	Parede celular e núcleo	chr14
	VV_DN55488_c0_g1_i2	RLP-13	1032	4,57	92,58	Núcleo	chr14
	VV_DN55488_c0_g1_i1	RLP-14	297	4,68	92,68	Núcleo	chr14
	VV_DN55555_c0_g1_i2	RLP-15	352	7,21	61,98	Núcleo	chr7
	VV_DN56732_c0_g3_i9	RLP-16	408	6,02	80,59	Parede celular e núcleo	chr6

VV_DN54791_c0_g2_i3	RLP-17	364	6,99	53,17	Parede celular	chr8
VV_DN49784_c0_g1_i2	RLP-18	281	6,22	24,43	Parede celular	chr1
VV_DN49784_c0_g1_i1	RLP-19	427	6,21	21,62	Parede celular	chr1
VV_DN56770_c2_g4_i5	RLP-20	356	5,40	45,62	Parede celular e núcleo	chr9
VV_DN56770_c2_g4_i4	RLP-21	650	6,06	37,35	Parede celular e núcleo	chr9
VV_DN56782_c5_g3_i7	RLP-22	338	5,27	34,15	Parede celular	chr18
VV_DN54919_c1_g2_i5	RLP-23	346	7,04	23,69	Parede celular	chr3
VV_DN45940_c0_g1_i1	RLP-24	671	5,41	23,80	Parede celular	chr8
VV_DN42685_c0_g1_i3	RLP-25	679	5,10	23,44	Parede celular	chr6
VV_DN42685_c0_g1_i2	RLP-26	359	5,10	23,42	Parede celular	chr6
VV_DN56451_c1_g4_i2	RLP-27	885	5,53	30,92	Parede celular	chr12
VV_DN56860_c2_g3_i4	RLP-28	1032	5,49	17,70	Parede celular	chr10
VV_DN29010_c0_g2_i1	RLP-29	297	8,10	26,84	Parede celular	chr4
VV_DN55936_c1_g4_i5	RLP-30	352	7,63	31,65	Parede celular	chr10
VV_DN55936_c1_g4_i2	RLP-31	408	8,80	26,16	Parede celular	chr10
VV_DN47016_c0_g1_i14	RLP-32	364	8,36	28,00	Parede celular	chr10
VV_DN55936_c1_g4_i11	RLP-33	281	8,26	46,04	Parede celular	chr10
VV_DN11640_c0_g1_i1	RLP-34	427	5,58	30,96	Parede celular	chrUn

VV_DN56292_c0_g1_i1	RLP-35	356	4,79	70,27	Núcleo	chr14
VV_DN52181_c0_g1_i1	RLP-36	650	8,98	53,12	Parede celular	chr18
VV_DN52181_c0_g1_i3	RLP-37	338	9,04	47,55	Parede celular	chr18
VV_DN55809_c0_g1_i5	RLP-38	346	9,86	35,43	Parede celular	chr14
VV_DN45833_c0_g2_i12	RLP-39	671	4,86	72,80	Parede celular e núcleo	chr14
VV_DN45833_c0_g2_i7	RLP-40	679	4,78	71,67	Parede celular e núcleo	chr14
VV_DN56666_c2_g1_i4	RLP-41	408	5,08	49,06	Parede celular	chr11
VV_DN56869_c1_g1_i5	RLP-42	364	8,17	57,42	Parede celular e núcleo	chr1
VV_DN33117_c0_g1_i1	RLP-43	281	7,17	16,92	Parede celular	chr6
VV_DN40798_c0_g1_i1	RLP-44	427	5,48	35,14	Parede celular	chr16
VV_DN55856_c0_g1_i4	RLP-45	356	8,90	50,15	Núcleo	chr19
VV_DN53507_c0_g5_i2	RLP-46	650	9,47	20,09	Parede celular e núcleo	chr8
VV_DN56488_c1_g2_i3	RLP-47	338	5,91	18,23	Parede celular	chr14
VV_DN54595_c0_g1_i1	RLP-48	346	5,01	58,77	Parede celular e núcleo	chrUn
VV_DN54595_c0_g1_i2	RLP-49	671	5,11	53,81	Parede celular	chrUn
VV_DN54393_c0_g3_i4	RLP-50	679	4,46	39,79	Parede celularL	chr17
VV_DN55809_c0_g1_i1	RLP-51	359	8,11	31,58	Parede celularL	chr14
VV_DN56488_c1_g2_i10	RLP-52	885	6,28	47,28	Parede celularL/ Núcleo	chr14

VV_DN56488_c1_g2_i5	RLP-53	1032	5,57	34,78	Pared celularL/ Núcleo	chr14
VV_DN56825_c2_g4_i6	RLP-54	297	4,86	30,49	Pared celularL/ Núcleo	chr16
VV_DN55936_c1_g4_i9	RLP-55	352	8,48	43,18	Pared celularL	chrUn
VV_DN40165_c0_g1_i1	RLP-56	408	7,60	53,81	Pared celularL	chr9
VV_DN52677_c0_g1_i3	RLP-57	364	5,33	80,93	Pared celularL/ Núcleo	chr4
VV_DN52677_c0_g1_i2	RLP-58	281	5,42	80,87	Pared celularL/ Núcleo	chr4
VV_DN55730_c0_g1_i2	RLP-59	427	9,37	69,67	Pared celularL/ Núcleo	chr18
VV_DN35423_c0_g2_i1	RLP-60	359	5,51	39,11	Pared celularL/ Núcleo	chr11
VV_DN56731_c1_g1_i3	RLP-61	885	4,50	95,96	Pared celularL	chr7
VV_DN56583_c0_g1_i1	RLP-62	1032	5,16	114,31	Membrana celular/ Pared celular	chr4
VV_DN52144_c0_g1_i5	RLP-63	297	6,32	32,41	Pared celularL	chr10
VV_DN52144_c0_g1_i4	RLP-64	352	8,24	39,01	Pared celularL/ Núcleo	chr12
VV_DN44135_c0_g1_i1	RLP-65	408	9,33	43,80	Pared celularL/ Núcleo	chr3
VV_DN54267_c1_g1_i2	RLP-66	364	8,19	39,27	Pared celularL	chr6
VV_DN50463_c0_g1_i8	RLP-67	281	7,16	30,79	Pared celularL	chr12
VV_DN41821_c0_g1_i1	RLP-68	427	5,76	46,34	Pared celularL/ Núcleo	chr18
VV_DN45213_c0_g1_i1	RLP-69	356	5,92	37,97	Pared celularL	chr13
VV_DN43168_c0_g1_i1	RLP-70	650	4,75	70,71	Pared celularL/ Núcleo	chr11

VV_DN52144_c0_g1_i9	RLP-71	338	6,16	37,46	Parede celularL/ Núcleo	chr10
VV_DN52144_c0_g1_i8	RLP-72	346	7,90	38,10	Parede celularL/ Núcleo	chr12
VV_DN47500_c0_g1_i2	RLP-73	671	5,32	72,47	membrana celular	chr6
VV_DN47500_c0_g1_i1	RLP-74	679	5,32	73,19	membrana celular	chr6
VV_DN54624_c0_g1_i3	RLP-75	408	10,07	17,71	Parede celular e núcleo	chr16
VV_DN49784_c0_g1_i7	RLP-76	364	9,72	12,89	Parede celular	chr1
VV_DN36362_c1_g1_i1	RLP-77	281	5,66	12,31	Parede celular	chr16
VV_DN45940_c0_g1_i3	RLP-78	427	5,35	24,63	Parede celular	chr8
VV_DN38350_c0_g2_i1	RLP-79	356	8,75	13,16	Parede celular	chr12
VV_DN45448_c0_g1_i3	RLP-80	650	4,86	33,43	Membrana e parede celular	chr5
VV_DN45448_c0_g1_i1	RLP-81	338	4,85	33,13	Parede celular	chr5
VV_DN52677_c0_g1_i1	RLP-82	346	4,45	26,26	Parede celular	chr4
VV_DN56770_c2_g4_i3	RLP-83	671	9,70	19,38	Parede celular	chr9
VV_DN15362_c0_g1_i1	RLP-84	679	5,12	27,71	Parede celular	chr9_random
VV_DN51266_c0_g6_i7	RLP-85	359	5,18	13,15	Parede celular	chr9
VV_DN54078_c2_g2_i2	RLP-86	885	5,11	20,15	Parede celular	chr16
VV_DN56732_c0_g3_i3	RLP-87	1032	4,66	19,60	Parede celular	chr6
VV_DN56732_c0_g3_i1	RLP-88	297	4,33	16,97	Parede celular	chr6

VV_DN56632_c3_g3_i7	RLP-89	352	5,46	18,11	Parede celular	chr12
VV_DN55765_c1_g1_i3	RLP-90	408	4,78	12,94	Parede celular	chr12
VV_DN54791_c0_g2_i1	RLP-91	364	7,01	54,73	Parede celular	chr8
VV_DN52705_c0_g1_i5	RLP-92	281	5,44	36,04	Parede celular	chr16
VV_DN52705_c0_g1_i13	RLP-93	427	5,29	45,59	Parede celular	chr16
VV_DN45868_c1_g1_i3	RLP-94	346	8,50	30,88	Parede celular e núcleo	chr5
VV_DN51266_c0_g6_i2	RLP-95	671	5,06	20,57	Parede celular	chr9
VV_DN51266_c0_g7_i5	RLP-96	679	5,04	11,04	Parede celular	chr9
VV_DN51266_c0_g7_i4	RLP-97	408	4,78	12,56	Parede celular	chr9
VV_DN56444_c1_g1_i2	RLP-98	364	3,69	13,45	Parede celular	chr16
VV_DN38779_c0_g3_i3	RLP-99	281	5,31	18,79	Parede celular	chr14
VV_DN56451_c1_g4_i4	RLP-100	427	5,28	30,82	Parede celular	chr19
VV_DN38779_c0_g3_i8	RLP-101	356	5,63	16,58	Parede celular	chr14
VV_DN52144_c0_g1_i1	RLP-102	650	7,95	33,62	Parede celular e núcleo	chr12
VV_DN53837_c0_g5_i3	RLP-103	338	7,58	56,95	Parede celular e núcleo	chr8
VV_DN56825_c3_g3_i8	RLP-104	346	4,29	17,65	Parede celular	chr16
VV_DN55936_c1_g4_i8	RLP-105	671	9,06	17,03	Parede celular	chr10
VV_DN55936_c1_g4_i3	RLP-106	679	7,26	26,17	Parede celular	chr10

VV_DN55488_c0_g1_i7	RLP-107	359	4,62	28,13	Parede celular e núcleo	chr14
VV_DN54624_c0_g1_i4	RLP-108	885	9,75	22,41	Parede celular e núcleo	chr16
VV_DN56444_c1_g3_i7	RLP-109	1032	4,23	16,66	Parede celular	chr16
VV_DN54624_c0_g1_i8	RLP-110	297	10,01	23,10	Parede celular e núcleo	chr16
VV_DN36664_c0_g3_i4	RLP-111	352	5,34	13,15	Parede celular	chr12
VV_DN36664_c0_g3_i1	RLP-112	408	4,95	12,17	Parede celular	chr12
VV_DN56732_c0_g3_i6	RLP-113	364	7,87	20,91	Parede celular	chr6
VV_DN56860_c2_g3_i2	RLP-114	281	9,09	11,98	Parede celular e núcleo	chr10
VV_DN51266_c0_g7_i1	RLP-115	427	6,59	25,84	Parede celular e núcleo	chr9
VV_DN56896_c2_g1_i3	RLP-116	346	5,63	15,12	Parede celular	chr9
VV_DN54624_c0_g1_i5	RLP-117	671	9,17	13,46	Parede celular	chr16
VV_DN38588_c1_g1_i12	RLP-118	679	5,24	16,37	Parede celular	chr9
VV_DN70714_c0_g1_i1	RLP-119	408	4,54	16,20	Parede celular	chr18
VV_DN39166_c0_g1_i2	RLP-120	364	9,95	13,47	Parede celular e núcleo	chr16
VV_DN43818_c0_g1_i8	RLP-121	281	6,32	16,60	Parede celular	chr9
VV_DN43818_c0_g2_i1	RLP-122	427	6,04	17,27	Membrana celular	chr9
VV_DN43818_c0_g1_i1	RLP-123	356	7,21	17,41	Membrana celular	chr9
VV_DN53507_c0_g5_i1	RLP-124	650	9,00	20,04	Parede celular e núcleo	chr8

VV_DN52705_c0_g1_i8	RLP-125	338	5,15	15,92	Parede celular	chr16
VV_DN56905_c4_g1_i12	RLP-126	346	6,21	65,49	Parede celular	chr18
VV_DN56892_c4_g1_i1	RLP-127	671	7,30	24,85	Parede celular	chr12
VV_DN38779_c0_g3_i7	RLP-128	679	5,28	14,93	Parede celular e núcleo	chr14
VV_DN51266_c0_g7_i2	RLP-129	359	4,40	16,24	Parede celular	chr9
VV_DN51266_c0_g7_i3	RLP-130	885	4,51	15,28	Parede celular	chr9
VV_DN56892_c4_g1_i4	RLP-131	1032	8,01	15,32	Parede celular	chr12
VV_DN39166_c0_g1_i1	RLP-132	297	9,48	11,94	Parede celular e núcleo	chr16
VV_DN43552_c1_g2_i1	RLP-133	352	3,71	11,36	Parede celular	chr16
VV_DN56892_c4_g1_i10	RLP-134	408	7,81	37,75	Parede celular e núcleo	chr12
VV_DN52144_c0_g1_i13	RLP-135	364	8,76	14,45	Parede celular	chr10
VV_DN19229_c0_g1_i1	RLP-136	281	6,59	21,80	Parede celular	chr11
VV_DN53074_c0_g1_i2	RLP-137	427	5,16	61,89	Núcleo	chr2
VV_DN53074_c0_g1_i1	RLP-138	346	4,91	57,57	Parede celular	chr2
VV_DN56117_c2_g2_i1	RLP-139	671	6,59	42,05	Parede celular	chr1
VV_DN56870_c1_g1_i2	RLP-140	679	5,22	41,24	Parede celular e núcleo	chr17
VV_DN41707_c0_g1_i2	RLP-141	408	8,99	30,92	Parede celular	chr1
VV_DN55809_c0_g1_i11	RLP-142	364	8,01	23,32	Parede celular	chr14

VV_DN55809_c0_g1_i9	RLP-143	281	9,28	31,72	Parede celular	chr14
VV_DN55809_c0_g1_i3	RLP-144	427	6,97	35,69	Parede celular e núcleo	chr14
VV_DN47016_c0_g1_i7	RLP-145	356	5,78	12,26		chr10
VV_DN48373_c1_g3_i9	RLP-146	650	6,38	44,40	Parede celular	chr13
VV_DN33816_c0_g1_i1	RLP-147	338	8,24	51,65	Parede celular e núcleo	chr12
VV_DN28932_c0_g1_i1	RLP-148	346	8,81	32,25	Parede celular	chr10
VV_DN42700_c0_g2_i3	RLP-149	671	5,61	18,64	Parede celular	chr9
VV_DN32468_c1_g1_i3	RLP-150	679	4,20	20,30	Parede celular	chr16
VV_DN32468_c1_g1_i1	RLP-151	359	4,25	19,77	Parede celular e núcleo	chr16
VV_DN37950_c0_g1_i1	RLP-152	885	5,20	51,44	Parede celular e núcleo	chr17
VV_DN32468_c1_g1_i2	RLP-153	1032	4,31	20,46	Parede celular	chr16
VV_DN56908_c1_g1_i2	RLP-154	297	3,68	11,32	Parede celular	chr16
VV_DN56869_c0_g2_i6	RLP-155	352	4,81	46,73	Parede celular	chr1
VV_DN46997_c0_g2_i3	RLP-156	408	9,23	36,42	Parede celular	chr10
VV_DN37591_c0_g1_i1	RLP-157	364	4,47	33,26	Parede celular e núcleo	chr4
VV_DN47016_c0_g1_i1	RLP-158	281	5,40	30,81	Parede celular	chr10
VV_DN50732_c0_g1_i10	RLP-159	427	5,65	27,64	Membrana celular	chr19
VV_DN48373_c1_g3_i7	RLP-160	359	6,49	50,12	Membrana celular	chr13

VV_DN48373_c1_g3_i6	RLP-161	885	6,07	34,50	Parede celular e núcleo	chr13
VV_DN48373_c1_g3_i4	RLP-162	1032	5,89	34,67	Parede celular	chr13
VV_DN48373_c1_g3_i3	RLP-163	297	5,71	34,36	Parede celular	chr13
VV_DN47016_c0_g1_i9	RLP-164	352	6,02	13,34	Parede celular	chr10
VV_DN19523_c0_g1_i1	RLP-165	408	6,05	43,16	Parede celular e núcleo	chr9
VV_DN50463_c0_g1_i13	RLP-166	364	6,55	17,63	Parede celular	chr12
VV_DN56770_c0_g1_i1	RLP-167	281	3,76	15,06	Parede celular	chr9
VV_DN55856_c0_g1_i1	RLP-168	427	5,72	84,33	Parede celular	chr19
VV_DN47016_c0_g1_i16	RLP-169	356	6,19	28,70	Parede celular e núcleo	chr10
VV_DN47016_c0_g1_i10	RLP-170	359	4,89	30,65	Parede celular	chr10
VV_DN56825_c2_g4_i5	RLP-171	885	5,78	15,62	Parede celular e núcleo	chr16
VV_DN56287_c1_g1_i1	RLP-172	1032	4,99	33,32	Parede celular	chr16
VV_DN55936_c1_g4_i6	RLP-173	297	8,50	33,57	Parede celular	chr10
VV_DN52953_c0_g2_i1	RLP-174	352	9,34	43,66	Núcleo	chr9
VV_DN40803_c0_g1_i1	RLP-175	408	4,78	32,69	Parede celular	chr19
VV_DN56666_c1_g2_i5	RLP-176	364	4,74	57,04	Parede celular	chr11
VV_DN10129_c0_g1_i1	RLP-177	281	4,98	20,96	Parede celular e núcleo	chr10
VV_DN56870_c1_g1_i1	RLP-178	427	5,76	10,94	Parede celular	chr17

VV_DN56825_c2_g4_i1	RLP-179	356	4,45	19,31	Parede celular	chr16
VV_DN47016_c0_g1_i15	RLP-180	650	6,08	26,32	Parede celular	chr10
VV_DN42991_c0_g2_i4	RLP-181	338	3,60	17,62	Parede celular e núcleo	chr16
VV_DN9946_c0_g1_i1	RLP-182	346	5,67	29,18	Parede celular e núcleo	chr1
VV_DN56292_c0_g1_i4	RLP-183	671	5,09	77,82	Parede celular	chr14
VV_DN55730_c0_g1_i4	RLP-184	679	9,43	68,33	Parede celular e núcleo	chr18
VV_DN69969_c0_g1_i1	RLP-185	359	4,76	25,84	Parede celular	chr5
VV_DN36664_c0_g3_i3	RLP-186	885	5,10	16,07	Parede celular	chr12
VV_DN55730_c0_g1_i3	RLP-187	1032	11,04	26,95	Parede celular	chr18
VV_DN45409_c0_g4_i3	RLP-188	297	9,56	39,47	Parede celular e núcleo	chr13
VV_DN48373_c1_g3_i2	RLP-189	352	9,09	20,58	Parede celular e núcleo	chr11
VV_DN55936_c1_g5_i2	RLP-190	408	6,04	16,50	Parede celular	chr12
VV_DN56746_c1_g4_i6	RLP-191	364	4,34	48,75	Parede celular	chr16
VV_DN47863_c0_g3_i2	RLP-192	281	6,10	13,51	Parede celular	chr16
VV_DN49093_c0_g1_i1	RLP-193	427	9,18	14,43	Parede celular	chr10
VV_DN37984_c2_g1_i1	RLP-194	359	5,39	48,15	Parede celular e núcleo	chr12
VV_DN52619_c0_g2_i2	RLP-195	885	4,43	27,16	Parede celular	chr16
VV_DN37984_c2_g6_i1	RLP-196	1032	5,17	42,20	Membrana celular	chr12

VV_DN42078_c0_g1_i1	RLP-197	297	5,03	59,42	Membrana celular	chr12
VV_DN52619_c0_g3_i1	RLP-198	352	4,11	28,16	Parede celular e núcleo	chr16
VV_DN56908_c2_g1_i2	RLP-199	408	4,62	20,48	Parede celular	chr16
VV_DN56908_c2_g1_i1	RLP-200	364	5,06	20,42	Parede celular	chr16
VV_DN56870_c1_g1_i6	RLP-201	281	5,29	69,82	Parede celular	chr17
VV_DN55620_c0_g1_i2	RLP-202	427	5,24	107,07	Parede celular e núcleo	chr17
VV_DN55620_c0_g1_i1	RLP-203	356	5,14	107,07	Parede celular	chr17
VV_DN54919_c1_g2_i9	RLP-204	359	8,63	23,02	Parede celular	chr3
VV_DN44890_c0_g1_i5	RLP-205	885	3,56	24,68	Parede celular	chr12
VV_DN42770_c0_g1_i1	RLP-206	1032	6,31	44,62	Parede celular e núcleo	chr3
VV_DN36097_c0_g1_i1	RLP-207	297	7,79	22,41	Parede celular	chr7
VV_DN46182_c0_g1_i1	RLP-208	352	9,22	43,90	Parede celular e núcleo	chr7
VV_DN41648_c0_g1_i2	RLP-209	408	8,49	37,36	Parede celular	chr8
VV_DN44890_c0_g1_i3	RLP-210	364	3,74	27,15	Parede celular	chr12
VV_DN42848_c0_g1_i1	RLP-211	281	5,57	62,94	Núcleo	chr9
VV_DN56444_c0_g2_i13	RLP-212	427	6,72	17,29	Parede celular	chr16
VV_DN56444_c0_g2_i11	RLP-213	356	5,07	14,58	Parede celular	chr16
VV_DN56444_c0_g2_i1	RLP-214	650	4,22	13,00	Parede celular e núcleo	chr16

VV_DN50463_c0_g1_i14	RLP-215	338	6,67	33,38	Parede celular	chr12
VV_DN32563_c0_g1_i1	RLP-216	346	4,69	14,62	Parede celular	chr7
VV_DN21481_c0_g1_i1	RLP-217	671	4,78	18,29	Parede celular	chr7
VV_DN45940_c0_g1_i4	RLP-218	679	8,00	18,69	Parede celular e núcleo	chr8
VV_DN50463_c0_g1_i12	RLP-219	359	7,87	24,73	Parede celular e núcleo	chr12
VV_DN55765_c1_g1_i7	RLP-220	885	6,06	15,44	Parede celular	chr1
VV_DN55765_c1_g1_i2	RLP-221	1032	9,17	15,35	Parede celular e núcleo	chr1
VV_DN37853_c0_g1_i2	RLP-222	297	4,49	62,84	Parede celular	chr7
VV_DN81407_c0_g1_i1	RLP-223	352	4,75	13,22	Parede celular	chr1
VV_DN55765_c1_g1_i19	RLP-224	359	5,45	15,73	Parede celular	chr12
VV_DN51445_c0_g3_i1	RLP-225	885	6,80	28,28	Parede celular e núcleo	chr11
VV_DN39050_c0_g1_i1	RLP-226	1032	4,67	35,52	Parede celular e núcleo	chr18
VV_DN56684_c6_g3_i4	RLP-227	297	7,56	32,59	Parede celular	chr7
VV_DN56684_c6_g3_i2	RLP-228	352	6,31	20,70	Parede celular	chr7
VV_DN51351_c0_g1_i7	RLP-229	408	6,57	31,50	Parede celular	chr14
VV_DN51351_c0_g1_i5	RLP-230	364	5,88	27,87	Parede celular	chr14
VV_DN44028_c0_g1_i1	RLP-231	281	9,26	25,29	Parede celular e núcleo	chr18
VV_DN31571_c0_g1_i1	RLP-232	427	8,61	45,12	Parede celular	chr9

VV_DN45613_c1_g2_i6	RLP-233	356	7,73	48,02	Membrana celular	chr9
VV_DN45613_c1_g2_i5	RLP-234	359	7,25	43,99	Membrana celular	chr9
VV_DN44028_c0_g1_i2	RLP-235	885	8,84	52,82	Parede celular e núcleo	chr18
VV_DN38617_c0_g1_i1	RLP-236	1032	7,25	49,51	Parede celular	chr14
VV_DN51496_c0_g1_i6	RLP-237	297	5,62	133,73	Parede celular	chr9
VV_DN51496_c0_g1_i1	RLP-238	352	5,57	144,94	Parede celular	chr9
VV_DN56874_c1_g2_i2	RLP-239	408	5,54	26,24	Parede celular e núcleo	chr4
VV_DN31206_c0_g1_i1	RLP-240	364	6,44	44,00	Parede celular	chr12
VV_DN50610_c1_g1_i9	RLP-241	281	6,00	68,98	Parede celular	chr11
VV_DN50610_c1_g1_i8	RLP-242	427	6,00	68,60	Parede celular	chr11
VV_DN50610_c1_g1_i7	RLP-243	356	6,00	69,45	Parede celular e núcleo	chr11
VV_DN50610_c1_g1_i6	RLP-244	650	5,69	52,50	Parede celular	chr11
VV_DN50610_c1_g1_i5	RLP-245	338	6,00	66,54	Parede celular e núcleo	chr11
VV_DN50610_c1_g1_i4	RLP-246	346	6,00	67,01	Parede celular	chr11
VV_DN50610_c1_g1_i3	RLP-247	671	6,00	66,92	Parede celular	chr11
VV_DN50610_c1_g1_i2	RLP-248	679	6,00	67,39	Núcleo	chr11
VV_DN50610_c1_g1_i1	RLP-249	359	6,00	69,07	Parede celular	chr11
VV_DN41588_c0_g1_i3	RLP-250	885	5,44	23,91	Parede celular	chr14

VV_DN56874_c1_g2_i3	RLP-251	1032	4,90	28,34	Parede celular e núcleo	chr4
VV_DN9382_c0_g2_i1	RLP-252	297	9,26	18,06	Parede celular	chr19
VV_DN3032_c0_g1_i1	RLP-253	352	4,28	18,23	Parede celular	chr7
VV_DN36304_c0_g1_i1	RLP-254	408	4,30	22,00	Parede celular	chr3
VV_DN29150_c0_g1_i1	RLP-255	364	8,95	25,32	Parede celular e núcleo	chr13
VV_DN56654_c1_g6_i1	RLP-256	281	4,70	25,22	Parede celular e núcleo	chr9
VV_DN32125_c0_g1_i1	RLP-257	359	6,04	28,34	Parede celular	chr4
VV_DN34469_c0_g1_i4	RLP-258	885	5,13	46,48	Parede celular e núcleo	chr9
VV_DN58226_c0_g1_i1	RLP-259	1032	9,93	23,33	Parede celular	chr16
VV_DN56874_c1_g2_i6	RLP-260	297	5,66	29,99	Parede celular	chr4
VV_DN56874_c1_g2_i4	RLP-261	352	5,07	28,38	Parede celular	chr4
VV_DN37335_c0_g1_i3	RLP-262	408	6,39	19,38	Parede celular e núcleo	chr16
VV_DN37335_c0_g1_i5	RLP-263	364	6,77	19,63	Parede celular e núcleo	chr16
VV_DN47528_c1_g2_i11	RLP-264	281	4,76	15,24	Parede celular	chr16
VV_DN56444_c0_g2_i6	RLP-265	427	8,29	17,74	Parede celular	chr16
VV_DN55241_c0_g2_i5	RLP-266	356	7,79	20,79	Parede celular	chr16
VV_DN55241_c0_g2_i4	RLP-267	359	6,31	16,94	Parede celular	chr16
VV_DN55241_c0_g2_i3	RLP-268	885	7,79	20,76	Parede celular e núcleo	chr16

VV_DN55241_c0_g2_i2	RLP-269	1032	6,31	16,91	Parede celular	chr16
VV_DN55241_c0_g2_i1	RLP-270	297	6,31	16,93	Membrana celular	chr16
VV_DN34954_c0_g1_i1	RLP-271	352	7,89	11,23	Membrana celular	chr8
VV_DN47579_c0_g1_i1	RLP-272	408	4,48	38,52	Parede celular e núcleo	chr1
VV_DN52865_c0_g2_i1	RLP-273	364	4,71	44,18	Parede celular	chr18
VV_DN54791_c0_g2_i2	RLP-274	281	5,31	26,61	Parede celular	chr8
VV_DN54624_c0_g1_i7	RLP-275	427	9,53	25,30	Parede celular	chr16
VV_DN38566_c0_g2_i1	RLP-276	356	4,19	16,91	Parede celular e núcleo	chr12
VV_DN59724_c0_g1_i1	RLP-277	650	4,75	13,78	Parede celular	chr1
VV_DN47016_c0_g1_i4	RLP-278	338	6,16	28,36	Parede celular	chr10
VV_DN54624_c0_g1_i13	RLP-279	346	9,49	24,78	Parede celular	chr16
VV_DN45868_c1_g1_i6	RLP-280	671	8,27	41,55	Parede celular e núcleo	chr5
VV_DN33258_c0_g1_i2	RLP-281	679	9,48	14,35	Parede celular	chr4
VV_DN33258_c0_g1_i1	RLP-282	359	7,38	20,22	Parede celular e núcleo	chr4
VV_DN79579_c0_g1_i1	RLP-283	885	8,22	15,61	Parede celular	chr18
VV_DN19895_c0_g1_i1	RLP-284	1032	4,80	25,87	Parede celular	chrUn
VV_DN56896_c2_g1_i6	RLP-285	297	5,62	13,62	Núcleo	chr9
VV_DN56746_c0_g1_i5	RLP-286	352	7,42	25,20	Parede celular	chr16

VV_DN56731_c1_g1_i5	RLP-287	408	5,05	14,97	Parede celular	chr7
VV_DN38792_c0_g1_i3	RLP-288	364	5,01	15,01	Parede celular e núcleo	chr12
VV_DN52705_c0_g1_i10	RLP-289	281	4,79	20,75	Parede celular	chr16
VV_DN54624_c0_g4_i1	RLP-290	427	9,63	13,92	Parede celular	chr16
VV_DN56905_c4_g1_i1	RLP-291	359	6,15	62,29	Parede celular	chr18
VV_DN54929_c0_g2_i2	RLP-292	885	6,22	22,96	Parede celular e núcleo	chr18_random
VV_DN56451_c1_g4_i3	RLP-293	1032	5,10	37,70	Parede celular e núcleo	chr12
VV_DN38779_c0_g3_i5	RLP-294	297	5,75	17,68	Parede celular	chr14
VV_DN38779_c0_g3_i4	RLP-295	352	6,09	18,20	Parede celular e núcleo	chr14
VV_DN26858_c0_g1_i1	RLP-296	408	7,19	10,85	Parede celular	chr11
VV_DN79969_c0_g1_i1	RLP-297	364	4,69	13,39	Parede celular	chr1
VV_DN40907_c0_g1_i2	RLP-298	281	6,10	14,55	Parede celular	chr12
VV_DN56732_c0_g2_i1	RLP-299	427	4,08	12,42	Parede celular e núcleo	chr6
VV_DN52144_c0_g1_i7	RLP-300	356	8,53	14,22	Parede celular e núcleo	chr10
VV_DN52144_c0_g1_i10	RLP-301	359	6,58	33,23	Parede celular	chr12
VV_DN52144_c0_g1_i2	RLP-302	885	6,31	11,85	Parede celular	chr12
VV_DN52144_c0_g1_i14	RLP-303	1032	7,78	14,49	Parede celular	chr10
VV_DN52081_c0_g1_i1	RLP-304	297	6,06	32,38	Parede celular	chr10

VV_DN51266_c0_g6_i3	RLP-305	352	5,71	15,54	Parede celular e núcleo	chr9
VV_DN56825_c3_g3_i9	RLP-306	408	3,87	16,92	Parede celular	chr16
VV_DN51266_c0_g6_i6	RLP-307	364	8,50	20,14	Membrana celular	chr9
VV_DN56666_c2_g1_i2	RLP-308	281	4,49	13,05	Membrana celular	chr11
VV_DN56451_c1_g4_i1	RLP-309	427	4,82	14,69	Parede celular e núcleo	chr19
VV_DN52144_c0_g1_i12	RLP-310	356	8,57	10,96	Parede celular	chr12
VV_DN52144_c0_g1_i3	RLP-311	650	8,75	12,00	Parede celular	chr12
VV_DN49366_c1_g1_i1	RLP-312	338	8,61	17,12	Parede celular	chr18
VV_DN40848_c0_g1_i4	RLP-313	346	7,88	13,10	Parede celular e núcleo	chr9
VV_DN42991_c0_g2_i3	RLP-314	671	3,21	17,96	Parede celular	chr16
VV_DN56746_c0_g1_i1	RLP-315	679	6,48	25,21	Parede celular	chr16
VV_DN41640_c0_g2_i2	RLP-316	359	6,67	45,52	Parede celular	chr13
VV_DN56905_c4_g1_i7	RLP-317	885	5,49	41,76	Parede celular e núcleo	chr18
VV_DN52865_c1_g2_i3	RLP-318	1032	6,75	54,23	Parede celular	chr18
VV_DN52865_c1_g2_i2	RLP-319	297	7,73	52,83	Parede celular e núcleo	chr18
VV_DN52865_c1_g2_i1	RLP-320	352	7,58	59,98	Parede celular	chr18
VV_DN56870_c1_g1_i5	RLP-321	408	5,02	32,05	Parede celular	chr17
VV_DN43752_c0_g1_i1	RLP-322	364	6,03	23,40	Núcleo	chr14

VV_DN54078_c2_g3_i2	RLP-323	671	4,03	18,80	Parede celular	chr16
VV_DN55809_c0_g1_i10	RLP-324	679	8,12	20,53	Parede celular	chr14
VV_DN55809_c0_g1_i2	RLP-325	359	6,74	17,83	Parede celular e núcleo	chr14

ANEXO D. TRANSCRITOS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E ANCORAGEM DOS GENES DA CLASSE RLK

Classe III	ID	Nº	ORF	p.I	p.M	Localização subcelular	Loci
Pkinase	VV_DN54768_c0_g1_i1	RLK-1	596	7,32	95,3	Membrana celular	chr18
	VV_DN54228_c0_g1_i1	RLK-2	1021	6,05	106,5	Membrana celular	chr18
	VV_DN55439_c0_g1_i1	RLK-3	976	6,49	129,9	Membrana celular	chr7
	VV_DN47167_c0_g1_i3	RLK-4	1111	5,97	68,0	Membrana celular	chr14
	VV_DN47167_c0_g1_i1	RLK-5	1078	5,97	68,0	Membrana celular	chr14
	VV_DN38779_c0_g1_i1	RLK-6	624	6,01	59,3	Membrana celular	chr14
	VV_DN56860_c3_g1_i4	RLK-7	624	5,76	76,0	Membrana celular	chr12
	VV_DN54523_c0_g1_i2	RLK-8	948	6,96	82,7	Membrana celular	chr5
	VV_DN56445_c1_g1_i1	RLK-9	1012	6,40	111,8	Membrana celular	chr16
	VV_DN49879_c1_g1_i1	RLK-10	896	6,58	69,8	Membrana celular	chr14
	VV_DN49430_c0_g2_i1	RLK-11	628	6,94	128,9	Membrana celular	chr12
	VV_DN49226_c0_g1_i3	RLK-12	628	6,52	64,2	Membrana celular	chr1
	VV_DN49226_c0_g1_i1	RLK-13	628	7,03	69,4	Membrana celular	chr1
	VV_DN54493_c0_g1_i1	RLK-14	1066	5,36	134,7	Membrana celular	chr19
	VV_DN53504_c0_g2_i2	RLK-15	722	5,65	66,5	Membrana celular	chr1
	VV_DN53504_c0_g2_i1	RLK-16	473	5,77	66,5	Membrana celular	chr1
	VV_DN51687_c0_g1_i8	RLK-17	888	7,66	69,0	Membrana celular	chr11
	VV_DN51687_c0_g1_i6	RLK-18	888	7,66	68,9	Membrana celular	chr11
	VV_DN51687_c0_g1_i4	RLK-19	626	7,66	69,0	Membrana celular	chr11
	VV_DN51687_c0_g1_i3	RLK-20	626	7,66	69,0	Membrana celular	chr11
	VV_DN51687_c0_g1_i2	RLK-21	624	7,66	68,9	Membrana celular	chr11
	VV_DN51687_c0_g1_i1	RLK-22	626	7,66	69,0	Membrana celular	chr11
	VV_DN51181_c0_g1_i2	RLK-23	967	6,78	106,4	Membrana celular	chr4
	VV_DN49093_c0_g2_i1	RLK-24	1171	6,12	126,8	Membrana celular	chr10
	VV_DN55669_c0_g1_i1	RLK-25	994	5,90	109,1	Membrana celular	chr16
	VV_DN56667_c1_g2_i3	RLK-26	862	5,85	95,0	Membrana celular	chr5
	VV_DN56667_c1_g2_i1	RLK-27	1001	6,06	110,5	Membrana celular	chr16
	VV_DN53895_c0_g1_i3	RLK-28	1101	5,47	120,7	Membrana celular	chr17
	VV_DN55176_c0_g1_i1	RLK-29	1021	5,84	113,6	Membrana celular	chr11
	VV_DN51924_c0_g5_i1	RLK-30	881	5,93	95,4	Membrana celular	chrUn
	VV_DN55353_c0_g1_i1	RLK-31	1088	5,03	118,8	Membrana celular	chr18
	VV_DN49752_c0_g1_i1	RLK-32	1182	6,57	129,0	Membrana celular	chr1
	VV_DN55347_c0_g1_i2	RLK-33	959	5,18	105,9	Membrana celular	chr19
	VV_DN55347_c0_g1_i1	RLK-34	959	5,18	105,9	Membrana celular	chr19

VV_DN51542_c0_g1_i1	RLK-35	948	5,62	102,8	Membrana celular	chr4
VV_DN55454_c1_g1_i1	RLK-36	1053	6,46	116,2	Membrana celular	chr19
VV_DN49781_c1_g6_i1	RLK-37	596	5,19	65,5	Membrana celular	chr9
VV_DN53601_c0_g1_i1	RLK-38	1021	5,14	112,0	Membrana celular	chr1
VV_DN54833_c0_g1_i1	RLK-39	976	6,51	106,4	Membrana celular	chr12
VV_DN55906_c1_g1_i1	RLK-40	1111	6,16	122,6	Membrana celular	chr19
VV_DN53378_c0_g1_i1	RLK-41	1078	6,26	118,7	Membrana celular	chr9
VV_DN51351_c0_g1_i6	RLK-42	624	6,52	69,2	Membrana celular	chr14
VV_DN51351_c0_g1_i3	RLK-43	624	6,52	69,2	Membrana celular	chr14
VV_DN55556_c0_g2_i6	RLK-44	948	6,31	105,1	Membrana celular	chr8
VV_DN54523_c0_g1_i1	RLK-45	1012	6,22	110,9	Membrana celular	chr5
VV_DN41880_c0_g1_i1	RLK-46	896	6,21	97,4	Membrana celular	chr8
VV_DN55241_c0_g1_i8	RLK-47	628	7,27	69,1	Membrana celular	chr2
VV_DN55241_c0_g1_i6	RLK-48	628	7,27	69,1	Membrana celular	chr2
VV_DN55241_c0_g1_i2	RLK-49	628	7,27	69,1	Membrana celular	chr2
VV_DN53414_c0_g2_i4	RLK-50	1066	6,26	117,6	Membrana celular	chr14
VV_DN54228_c0_g1_i2	RLK-51	722	8,16	79,9	Membrana celular	chr18
VV_DN49226_c0_g1_i2	RLK-52	473	6,81	53,3	Membrana celular	chr1
VV_DN49104_c0_g1_i3	RLK-53	888	5,70	96,8	Membrana celular	chr8
VV_DN49104_c0_g1_i1	RLK-54	888	5,70	96,8	Membrana celular	chr8
VV_DN50422_c0_g1_i4	RLK-55	653	7,77	71,7	Membrana celular	chr1
VV_DN50422_c0_g1_i1	RLK-56	653	7,77	71,7	Membrana celular	chr1
VV_DN50278_c0_g1_i1	RLK-57	606	5,50	65,8	Membrana celular/ Núcleo	chr1
VV_DN56667_c1_g2_i4	RLK-58	803	6,30	88,7	Membrana celular	chr16
VV_DN46758_c0_g1_i3	RLK-59	659	6,54	72,8	Membrana celular	chr11
VV_DN53378_c0_g1_i2	RLK-60	867	6,04	95,5	Membrana celular	chr9
VV_DN55241_c0_g1_i1	RLK-61	545	8,23	60,0	Membrana celular	chr2
VV_DN50422_c0_g2_i3	RLK-62	662	6,49	72,6	Membrana celular	chr18
VV_DN50422_c0_g2_i1	RLK-63	662	6,49	72,6	Membrana celular	chr18
VV_DN42862_c1_g1_i1	RLK-64	672	7,22	73,1	Membrana celular	chr17
VV_DN51264_c0_g1_i3	RLK-65	667	7,81	73,3	Membrana celular	chr8
VV_DN51264_c0_g1_i2	RLK-66	667	7,81	73,3	Membrana celular	chr8
VV_DN51264_c0_g1_i1	RLK-67	667	7,81	73,3	Membrana celular	chr8
VV_DN54351_c0_g2_i8	RLK-68	1109	5,67	121,7	Membrana celular	chr5
VV_DN54351_c0_g2_i6	RLK-69	1109	5,67	121,7	Membrana celular	chr5
VV_DN54351_c0_g2_i5	RLK-70	1109	5,67	121,8	Membrana celular	chr5
VV_DN54351_c0_g2_i4	RLK-71	1109	5,67	121,7	Membrana celular	chr5

Pkinase_Ty r	VV_DN54351_c0_g2_i3	RLK-72	1109	5,67	121,7	Membrana celular	chr5
	VV_DN54351_c0_g2_i2	RLK-73	1109	5,67	121,7	Membrana celular	chr5
	VV_DN54351_c0_g2_i1	RLK-74	1109	5,67	121,7	Membrana celular	chr5
	VV_DN53142_c0_g1_i1	RLK-75	984	5,42	108,4	Membrana celular	chr18
	VV_DN55556_c0_g2_i4	RLK-76	948	6,13	105,1	Membrana celular	chr8
	VV_DN48850_c0_g1_i2	RLK-77	620	6,21	69,0	Membrana celular	chr17
	VV_DN46786_c0_g1_i2	RLK-78	625	6,49	69,0	Membrana celular	chrUn
	VV_DN46786_c0_g1_i1	RLK-79	625	6,49	69,0	Membrana celular	chrUn
	VV_DN56396_c0_g1_i3	RLK-80	1005	5,40	110,7	Membrana celular	chrUn
	VV_DN53240_c0_g1_i2	RLK-81	826	5,37	91,0	Membrana celular	chr16
	VV_DN54493_c0_g1_i1	RLK-82	1237	5,36	134,7	Membrana celular	chr19
	VV_DN55439_c0_g1_i1	RLK-83	596	6,49	129,9	Membrana celular	chr7
	VV_DN49430_c0_g2_i1	RLK-84	1021	6,94	128,9	Membrana celular	chr12
	VV_DN55353_c0_g1_i1	RLK-85	976	5,03	118,8	Membrana celular	chr18
	VV_DN49752_c0_g1_i1	RLK-86	1111	6,57	129,0	Membrana celular	chr1
	VV_DN51542_c0_g1_i1	RLK-87	1078	5,62	102,8	Membrana celular	chr4
	VV_DN55454_c1_g1_i1	RLK-88	624	6,46	116,2	Membrana celular	chr19
	VV_DN41880_c0_g1_i1	RLK-89	596	6,21	97,4	Membrana celular	chr8
	VV_DN50760_c0_g1_i4	RLK-90	1021	5,68	73,0	Membrana celular	chr2
	VV_DN45833_c1_g1_i1	RLK-91	976	6,89	11,0	Parede celular	chr14
	VV_DN54678_c0_g1_i3	RLK-92	1111	6,21	83,9	Membrana celular	chrUn
	VV_DN54678_c0_g1_i1	RLK-93	1078	6,17	84,0	Membrana celular	chrUn
	VV_DN52124_c0_g1_i1	RLK-94	624	5,42	94,1	Membrana celular	chr11_random
	VV_DN40885_c0_g1_i1	RLK-95	624	5,98	70,8	Membrana celular	chr7
	VV_DN53630_c1_g1_i6	RLK-96	948	5,03	71,1	Membrana celular	chr13
	VV_DN53098_c0_g1_i1	RLK-97	1012	5,43	110,7	Membrana celular	chr6
	VV_DN41157_c0_g1_i2	RLK-98	896	7,57	74,5	Membrana celular	chr2
	VV_DN43688_c0_g2_i4	RLK-99	628	7,52	91,5	Membrana celular	chr8
	VV_DN43688_c0_g2_i3	RLK-100	628	7,52	91,5	Membrana celular	chr8
	VV_DN43688_c0_g1_i1	RLK-101	628	8,60	93,8	Membrana celular	chr13
	VV_DN45613_c1_g2_i3	RLK-102	1066	6,23	77,3	Membrana celular	chr9
	VV_DN52436_c0_g1_i4	RLK-103	722	6,56	102,2	Membrana celular	chr1
	VV_DN55179_c2_g2_i3	RLK-104	948	5,53	104,5	Membrana celular	chr8
	VV_DN53021_c0_g1_i1	RLK-105	1012	6,13	104,0	Membrana celular	chr13
	VV_DN45613_c1_g2_i11	RLK-106	896	6,14	73,3	Membrana celular	chr9

ANEXO E. TRANSCRITOS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E ANCORAGEM DOS GENES DA CLASSE STK

Subclasse STK	ID	Nº	Comprimento (aa)	p.I	p.M	Localização subcelular	Cromossomo
ATG1_ULK_like	VV_DN56011_c0_g3_i6	STK-1	829			Núcleo	chr6
Aurora	VV_DN41097_c0_g1_i1	STK-2	293			Núcleo	chr5
	VV_DN36124_c0_g1_i1	STK-3	281			Núcleo	chr9
CAMK	VV_DN42325_c0_g1_i2	STK-4	468	8,91	51,24	Núcleo	chr18
	VV_DN42325_c0_g1_i1	STK-5	468	8,91	51,24	Núcleo	chr18
CDC2L1	VV_DN56798_c1_g2_i8	STK-6	358	8,67	41,03	Citoplasma/ Núcleo	chr1
	VV_DN56798_c1_g2_i7	STK-7	657	5,63	74,18	Núcleo	chr1
	VV_DN56798_c1_g2_i6	STK-8	754	6,15	85,38	Núcleo	chr1
Cdc7_like	VV_DN54422_c0_g1_i6	STK-9	1415	5,67	156,51	Núcleo	chr1
	VV_DN54422_c0_g1_i4	STK-10	1425	5,67	157,58	Núcleo	chr1
CDK	VV_DN43317_c0_g1_i8	STK-11	273	6,87	31,34	Citoplasma/ Núcleo	chr8
	VV_DN43317_c0_g1_i5	STK-12	273	6,87	31,34	Citoplasma/ Núcleo	chr8
	VV_DN43317_c0_g1_i4	STK-13	273	6,87	31,34	Citoplasma/ Núcleo	chr8
	VV_DN43317_c0_g1_i2	STK-14	273	6,87	31,34	Citoplasma/ Núcleo	chr8
	VV_DN49236_c2_g1_i1	STK-15	422	9,633	48,134	Núcleo	chr17
	VV_DN50828_c0_g2_i8	STK-16	502	9,871	55,49	Núcleo	chr7
	VV_DN50828_c0_g2_i6	STK-17	502	9,871	55,49	Núcleo	chr7

	VV_DN49038_c0_g1_i5	STK-18	688	10,13	76,6	Núcleo	chr7
	VV_DN51051_c0_g1_i1	STK-19	741	9,796	82,257	Núcleo	chr12
	VV_DN52000_c0_g1_i8	STK-20	575	9,722	63,912	Núcleo	chr14
	VV_DN52000_c0_g1_i7	STK-21	426	9,035	47,645	Núcleo	chr14
	VV_DN52000_c0_g1_i6	STK-22	436	8,797	48,887	Núcleo	chr14
	VV_DN52000_c0_g1_i4	STK-23	575	9,722	63,912	Núcleo	chr14
	VV_DN52156_c0_g1_i2	STK-24	587	9,869	65,172	Núcleo	chr17
	VV_DN48949_c0_g1_i2	STK-25	713	9,67	79,456	Núcleo	chr14
	VV_DN48949_c0_g1_i1	STK-26	713	9,67	79,482	Núcleo	chr14
	VV_DN47537_c0_g1_i2	STK-27	517	9,597	57,262	Núcleo	chr7_rando m
	VV_DN47537_c0_g1_i1	STK-28	517	9,597	57,262	Núcleo	chr7_rando m
	VV_DN52000_c0_g1_i3	STK-29	582	9,918	64,497	Núcleo	chr14
	VV_DN49027_c0_g1_i2	STK-30	686	9,545	76,189	Núcleo	chr17
	VV_DN49256_c1_g1_i3	STK-31	513	9,377	57,388	Núcleo	chr7_rando m
	VV_DN48178_c0_g1_i1	STK-32	709	9,228	80,284	Núcleo	chr14
CK2_alpha	VV_DN49320_c1_g1_i1	STK-33	333	8,533	36,105	Núcleo	chr7
	VV_DN52884_c0_g1_i16	STK-34	409	8,521	46,458	Núcleo	chr15
GSK3	VV_DN52884_c0_g1_i13	STK-35	409	8,521	46,458	Núcleo	chr15
	VV_DN52884_c0_g1_i11	STK-36	409	8,521	46,458	Núcleo	chr15

IRAQ	VV_DN52884_c0_g1_i9	STK-37	409	8,521	46,458	Núcleo	chr15
	VV_DN52884_c0_g1_i7	STK-38	409	8,521	46,458	Núcleo	chr15
	VV_DN52884_c0_g1_i5	STK-39	409	8,521	46,458	Núcleo	chr15
	VV_DN52884_c0_g1_i3	STK-40	409	8,521	46,458	Núcleo	chr15
	VV_DN55387_c0_g3_i1	STK-41	468	7,572	52,74	Núcleo	chr15
	VV_DN45709_c0_g1_i2	STK-42	422	8,224	47,873	Núcleo	chr15
	VV_DN44564_c0_g1_i2	STK-43	335	8,823	38,288	Núcleo	chr15
	VV_DN56461_c0_g1_i5	STK-44	342	8,667	39,37	Núcleo	chr12
	VV_DN56461_c0_g1_i4	STK-45	415	8,239	47,173	Núcleo	chr15
	VV_DN56461_c0_g1_i2	STK-46	314	8,533	36,105	Núcleo	chr15
	VV_DN56461_c0_g1_i1	STK-47	415	8,239	47,173	Núcleo	chr15
	VV_DN48599_c0_g1_i8	STK-48	483	8,521	46,458	Membrana Celular/ Núcleo	chr17
	VV_DN29052_c0_g1_i1	STK-49	407	7,282	44,368	Membrana Celular/ Núcleo	chr18
	VV_DN55815_c0_g1_i4	STK-50	611	6,01	66,779	Núcleo	chr7
	VV_DN55815_c0_g1_i2	STK-51	611	8,239	47,173	Núcleo	chr7
	VV_DN54486_c0_g1_i3	STK-52	519	8,533	36,105	Membrana Celular	chr11
	VV_DN54724_c0_g1_i1	STK-53	319	8,239	47,173	Núcleo	chr3
	VV_DN55751_c2_g1_i2	STK-54	316	8,521	46,458	Núcleo	chr18
	VV_DN54724_c0_g1_i2	STK-55	319	7,282	44,368	Núcleo	chr3

VV_DN44017_c0_g1_i1	STK-56	329	6,01	66,779	Núcleo	chr17
VV_DN42633_c0_g1_i1	STK-57	430	8,694	48,675	Núcleo	chr4
VV_DN47728_c0_g3_i7	STK-58	474	7,572	52,74	Núcleo	chr15
VV_DN47728_c0_g3_i2	STK-59	474	8,521	46,458	Núcleo	chr15
VV_DN54025_c0_g1_i17	STK-60	429	7,282	44,368	Núcleo	chr13
VV_DN54025_c0_g1_i16	STK-61	429	6,01	66,779	Núcleo	chr13
VV_DN54025_c0_g1_i15	STK-62	453	8,239	47,173	Núcleo	chr13
VV_DN54025_c0_g1_i14	STK-63	429	8,533	36,105	Núcleo	chr13
VV_DN54025_c0_g1_i12	STK-64	453	8,239	47,173	Núcleo	chr13
VV_DN54025_c0_g1_i11	STK-65	338	8,521	46,458	Núcleo	chr13
VV_DN54025_c0_g1_i8	STK-66	453	7,282	44,368	Núcleo	chr13
VV_DN54025_c0_g1_i7	STK-67	453	6,01	66,779	Núcleo	chr13
VV_DN54025_c0_g1_i6	STK-68	453	8,694	48,675	Núcleo	chr13
VV_DN54025_c0_g1_i1	STK-69	453	7,572	52,74	Núcleo	chr13
VV_DN53874_c0_g1_i2	STK-70	517	8,521	46,458	Membrana Celular/ Núcleo	chr14
VV_DN48992_c0_g2_i7	STK-71	384	7,282	44,368	Núcleo	chr11
VV_DN48992_c0_g2_i6	STK-72	386	6,01	66,779	Núcleo	chr11
VV_DN48992_c0_g2_i5	STK-73	384	8,239	47,173	Núcleo	chr11
VV_DN48992_c0_g2_i2	STK-74	386	8,533	36,105	Núcleo	chr11

VV_DN54846_c0_g2_i3	STK-75	443	8,239	47,173	Núcleo	chr6
VV_DN54846_c0_g2_i2	STK-76	443	8,521	46,458	Núcleo	chr6
VV_DN42811_c0_g1_i2	STK-77	361	8,521	46,458	Núcleo	chr1
VV_DN42811_c0_g1_i1	STK-78	361	7,282	44,368	Núcleo	chr1
VV_DN41639_c0_g1_i2	STK-79	306	6,01	66,779	Núcleo	chr11
VV_DN46804_c0_g1_i3	STK-80	362	8,239	47,173	Núcleo	chr5
VV_DN46804_c0_g1_i2	STK-81	401	8,533	36,105	Núcleo	chr5
VV_DN46804_c0_g1_i1	STK-82	362	8,239	47,173	Núcleo	chr5
VV_DN48525_c1_g1_i1	STK-83	470	8,521	46,458	Membrana Celular/ Núcleo	chr9
VV_DN51060_c0_g1_i2	STK-84	315	7,282	44,368	Núcleo	chr11
VV_DN56706_c1_g1_i4	STK-85	582	6,01	66,779	Membrana Celular/ Núcleo	chr14
VV_DN52008_c0_g1_i3	STK-86	331	8,774	39,762	Núcleo	chr14
VV_DN48278_c0_g3_i8	STK-87	340	9,258	43,731	Núcleo	chr7
VV_DN48278_c0_g3_i5	STK-88	341	8,774	39,762	Núcleo	chr7
VV_DN48278_c0_g3_i2	STK-89	342	6,022	84,753	Núcleo	chr7
VV_DN44770_c0_g2_i5	STK-90	415	6,165	84,387	Núcleo	chr3
VV_DN44770_c0_g2_i1	STK-91	415	5,25	28,84	Núcleo	chr3
VV_DN43297_c0_g1_i4	STK-92	360	5,333	48,121	Núcleo	chr5
VV_DN43297_c0_g1_i3	STK-93	398	5,367	30,615	Núcleo	chr5

VV_DN43297_c0_g1_i1	STK-94	360	5,367	30,615	Núcleo	chr5
VV_DN55183_c0_g1_i7	STK-95	419	5,367	30,615	Núcleo	chr10
VV_DN55183_c0_g1_i6	STK-96	418	5,367	30,615	Núcleo	chr10
VV_DN55183_c0_g1_i5	STK-97	422	5,367	30,615	Núcleo	chr10
VV_DN55183_c0_g1_i4	STK-98	419	5,333	48,121	Núcleo	chr10
VV_DN55183_c0_g1_i3	STK-99	423	5,333	48,121	Núcleo	chr10
VV_DN55183_c0_g1_i2	STK-100	418	9,892	51,476	Núcleo	chr10
VV_DN46662_c0_g1_i1	STK-101	427	5,673	52,752	Núcleo	chr3
VV_DN55347_c0_g1_i3	STK-102	359	5,673	52,752	Núcleo	chr1
VV_DN55183_c0_g1_i1	STK-103	318	6,022	84,753	Cloroplasto	chr18
VV_DN55455_c0_g2_i15	STK-104	716	6,165	84,387	Núcleo	chr11
VV_DN56870_c0_g1_i3	STK-105	398	5,25	28,84	Membrana Celular	chr17
VV_DN55455_c0_g2_i14	STK-106	595	5,333	48,121	Núcleo	chr11
VV_DN55455_c0_g2_i13	STK-107	595	5,367	30,615	Núcleo	chr11
VV_DN55455_c0_g2_i10	STK-108	761	5,367	30,615	Núcleo	chr11
VV_DN55455_c0_g2_i9	STK-109	761	5,367	30,615	Núcleo	chr11
VV_DN55455_c0_g2_i5	STK-110	595	5,367	30,615	Núcleo	chr11
VV_DN48061_c1_g1_i3	STK-111	426	5,367	30,615	Núcleo	chr19
VV_DN48061_c1_g1_i2	STK-112	432	5,333	48,121	Núcleo	chr19

VV_DN40610_c0_g2_i1	STK-113	353	5,333	48,121	Núcleo	chr1
VV_DN42364_c0_g1_i1	STK-114	483	9,892	51,476	Núcleo	chr18
VV_DN46773_c0_g1_i4	STK-115	639	5,673	52,752	Núcleo	chr3
VV_DN46773_c0_g1_i2	STK-116	314	5,673	52,752	Núcleo	chr3
VV_DN46773_c0_g1_i1	STK-117	395	6,653	34,284	Núcleo	chr3
VV_DN44568_c0_g1_i11	STK-118	430	6,784	41,744	Núcleo	chr7
VV_DN44568_c0_g1_i6	STK-119	430	7,479	45,179	Núcleo	chr7
VV_DN44568_c0_g1_i5	STK-120	430	7,479	45,179	Núcleo	chr7
VV_DN44568_c0_g1_i2	STK-121	430	8,089	34,02	Núcleo	chr7
VV_DN44568_c0_g1_i1	STK-122	430	8,906	37,061	Núcleo	chr7
VV_DN44905_c0_g1_i3	STK-123	408	8,466	31,58	Membrana Celular/ Citoplasma/ Núcleo	chr14
VV_DN50898_c0_g1_i7	STK-124	424	8,906	38,766	Núcleo	chr14
VV_DN50898_c0_g1_i6	STK-125	424	5,367	30,615	Núcleo	chr14
VV_DN50036_c0_g1_i2	STK-126	300	5,333	48,121	Núcleo	chr4
VV_DN39209_c0_g1_i1	STK-127	438	5,333	48,121	Núcleo	chr9
VV_DN21934_c0_g2_i1	STK-128	348	6,022	84,753	Núcleo	chr8
VV_DN21934_c0_g1_i1	STK-129	348	6,165	84,387	Núcleo	chr8
VV_DN56451_c1_g2_i4	STK-130	430	5,25	28,84	Núcleo	chr8
VV_DN56451_c1_g2_i1	STK-131	444	5,333	48,121	Núcleo	chr12

VV_DN55455_c0_g2_i7	STK-132	747	5,367	30,615	Núcleo	chr9
VV_DN55455_c0_g2_i6	STK-133	747	5,367	30,615	Núcleo	chr9
VV_DN55455_c0_g2_i2	STK-134	747	5,367	30,615	Núcleo	chr9
VV_DN51972_c0_g1_i1	STK-135	650	5,367	30,615	Núcleo	chr11
VV_DN50036_c0_g1_i1	STK-136	598	5,367	30,615	Núcleo	chr18
VV_DN51950_c0_g1_i1	STK-137	743	5,333	48,121	Núcleo	chr7
VV_DN51983_c1_g2_i2	STK-138	326	5,333	48,121	Núcleo	chr1
VV_DN47301_c0_g1_i1	STK-139	390	9,892	51,476	Núcleo	chr1
VV_DN47419_c2_g1_i5	STK-140	513	5,673	52,752	Núcleo	chr5
VV_DN47419_c2_g1_i4	STK-141	361	5,673	52,752	Núcleo	chr18
VV_DN47419_c2_g1_i1	STK-142	513	6,653	34,284	Núcleo	chr5
VV_DN53582_c2_g1_i5	STK-143	383	6,784	41,744	Núcleo	chr8
VV_DN53582_c2_g1_i4	STK-144	370	7,479	45,179	Núcleo	chr8
VV_DN49795_c0_g1_i6	STK-145	432	7,479	45,179	Núcleo	chr8
VV_DN46591_c2_g1_i1	STK-146	457	8,089	34,02	Núcleo	chr11
VV_DN44492_c0_g1_i1	STK-147	503	6,022	84,753	Núcleo	chr12
VV_DN50821_c2_g1_i1	STK-148	341	6,165	84,387	Núcleo	chr10
VV_DN43020_c1_g1_i1	STK-149	364	5,25	28,84	Núcleo	chr18
VV_DN37532_c0_g2_i4	STK-150	393	5,333	48,121	Núcleo	chr19

VV_DN37532_c0_g2_i3	STK-151	402	5,367	30,615	Núcleo	chr19
VV_DN31715_c0_g1_i1	STK-152	395	5,367	30,615	Citoplasma/ Núcleo	chr6
VV_DN52954_c0_g2_i2	STK-153	303	5,367	30,615	Cloroplasto	chr1
VV_DN52954_c0_g2_i1	STK-154	420	5,367	30,615	Núcleo	chr1
VV_DN53768_c0_g1_i1	STK-155	286	5,367	30,615	Núcleo	chr15
VV_DN45613_c1_g2_i12	STK-156	628	5,333	48,121	Núcleo	chr9
VV_DN53497_c0_g4_i5	STK-157	392	5,333	48,121	Núcleo	chr8
VV_DN45613_c1_g2_i7	STK-158	633	9,892	51,476	Núcleo	chr9
VV_DN53497_c0_g4_i2	STK-159	392	5,673	52,752	Núcleo	chr8
VV_DN52069_c0_g1_i1	STK-160	308	5,673	52,752	Núcleo	chr14
VV_DN45549_c0_g1_i4	STK-161	295	6,653	34,284	Núcleo	chr18
VV_DN45549_c0_g1_i1	STK-162	368	6,784	41,744	Núcleo	chr18
VV_DN52995_c0_g1_i2	STK-163	434	7,479	45,179	Núcleo	chr12
VV_DN51924_c0_g4_i1	STK-164	442	7,479	45,179	Cloroplasto	chr9
VV_DN51234_c0_g1_i1	STK-165	434	8,089	34,02	Núcleo	chr18
VV_DN46128_c0_g1_i2	STK-166	446	8,906	37,061	Núcleo	chr19
VV_DN46128_c0_g1_i1	STK-167	446	8,466	31,58	Núcleo	chr19
VV_DN54635_c0_g1_i3	STK-168	723	8,906	38,766	Núcleo	chr18
VV_DN54635_c0_g1_i2	STK-169	576	5,333	48,121	Núcleo	chr18

VV_DN56011_c0_g3_i8	STK-170	340	5,333	48,121	Membrana Celular/ Citoplasma/ Núcleo	chr15
VV_DN54650_c1_g1_i4	STK-171	317	9,892	51,476	Núcleo	chr12
VV_DN49825_c0_g1_i1	STK-172	528	5,673	52,752	Núcleo	chr5
VV_DN44971_c0_g1_i2	STK-173	385	5,673	52,752	Núcleo	chr19
VV_DN44971_c0_g1_i1	STK-174	385	6,653	34,284	Núcleo	chr19
VV_DN56011_c0_g3_i7	STK-175	340	6,784	41,744	Citoplasma/ Núcleo	chr15
VV_DN49734_c0_g1_i2	STK-176	319	7,479	45,179	Núcleo	chr8
VV_DN49686_c0_g1_i4	STK-177	464	7,479	45,179	Núcleo	chr1
VV_DN50314_c0_g2_i7	STK-178	359	8,089	34,02	Cloroplasto	chr13
VV_DN50314_c0_g2_i5	STK-179	397	8,906	37,061	Cloroplasto	chr13
VV_DN50314_c0_g2_i2	STK-180	404	8,466	31,58	Cloroplasto	chr13
VV_DN50314_c0_g2_i1	STK-181	362	8,906	38,766	Cloroplasto	chr13
VV_DN48934_c0_g3_i4	STK-182	380	6,022	84,753	Núcleo	chr7
VV_DN44636_c0_g1_i2	STK-183	375	6,165	84,387	Núcleo	chr9
VV_DN54650_c1_g1_i13	STK-184	317	5,25	28,84	Núcleo	chr12
VV_DN37532_c0_g2_i2	STK-185	397	5,333	48,121	Núcleo	chr19
VV_DN37532_c0_g2_i1	STK-186	406	5,367	30,615	Núcleo	chr19
VV_DN49903_c0_g1_i20	STK-187	290	5,367	30,615	Núcleo	chrUn
VV_DN49903_c0_g1_i14	STK-188	322	5,367	30,615	Núcleo	chrUn

VV_DN49903_c0_g1_i11	STK-189	290	5,367	30,615	Núcleo	chrUn
VV_DN42679_c0_g1_i4	STK-190	612	5,367	30,615	Membrana Celular	chr18
VV_DN56014_c0_g2_i1	STK-191	340	5,333	48,121	Núcleo	chr12
VV_DN47906_c0_g1_i2	STK-192	403	5,333	48,121	Núcleo	chr6
VV_DN44087_c0_g1_i1	STK-193	378	9,892	51,476	Núcleo	chr14
VV_DN69202_c0_g1_i1	STK-194	393	5,673	52,752	Núcleo	chr4
VV_DN49903_c0_g1_i12	STK-195	290	5,673	52,752	Núcleo	chrUn
VV_DN49903_c0_g1_i9	STK-196	367	6,653	34,284	Núcleo	chrUn
VV_DN49903_c0_g1_i3	STK-197	322	6,784	41,744	Núcleo	chrUn
VV_DN34104_c0_g1_i1	STK-198	398	7,479	45,179	Núcleo	chr8
VV_DN48278_c0_g3_i7	STK-199	465	7,479	45,179	Núcleo	chr7
VV_DN49430_c0_g1_i4	STK-200	393	8,089	34,02	Núcleo	chrUn
VV_DN49222_c1_g1_i5	STK-201	438	6,022	84,753	Núcleo	chr14
VV_DN49222_c1_g1_i4	STK-202	438	6,165	84,387	Núcleo	chr14
VV_DN49222_c1_g1_i3	STK-203	319	5,25	28,84	Núcleo	chr14
VV_DN49222_c1_g1_i2	STK-204	319	5,333	48,121	Núcleo	chr14
VV_DN55751_c2_g1_i5	STK-205	459	5,367	30,615	Núcleo	chr18
VV_DN50575_c0_g1_i1	STK-206	476	5,367	30,615	Núcleo	chr14
VV_DN48278_c0_g3_i6	STK-207	352	5,367	30,615	Núcleo	chr7

	VV_DN47325_c0_g1_i19	STK-208	399	5,367	30,615	Núcleo	chr3
	VV_DN34309_c0_g1_i1	STK-209	325	5,367	30,615	Núcleo	chr17
	VV_DN53934_c0_g1_i4	STK-210	346	5,333	48,121	Núcleo	chr12
	VV_DN53934_c0_g1_i3	STK-211	346	5,333	48,121	Núcleo	chr12
	VV_DN52025_c0_g1_i1	STK-212	402	9,892	51,476	Núcleo	chr12
	VV_DN47325_c0_g1_i9	STK-213	399	5,673	52,752	Núcleo	chr3
	VV_DN47325_c0_g1_i3	STK-214	399	5,673	52,752	Núcleo	chr3
	VV_DN50479_c0_g1_i2	STK-215	777	6,653	34,284	Núcleo	chr18
	VV_DN50479_c0_g1_i1	STK-216	773	6,784	41,744	Núcleo	chr18
LKB1_CaMKK	VV_DN53020_c0_g1_i4	STK-217	255	7,479	45,179	Núcleo	
	VV_DN51849_c0_g2_i17	STK-218	424	7,479	45,179	Núcleo	chr13
	VV_DN51849_c0_g2_i16	STK-219	265	8,089	34,02	Núcleo	chr13
	VV_DN51849_c0_g2_i15	STK-220	265	8,906	37,061	Núcleo	chr13
	VV_DN51849_c0_g2_i12	STK-221	265	8,466	31,58	Núcleo	chr13
MAK_like	VV_DN51849_c0_g2_i8	STK-222	265	8,906	38,766	Núcleo	chr13
	VV_DN51849_c0_g2_i7	STK-223	265	5,367	30,615	Núcleo	chr13
	VV_DN51849_c0_g2_i5	STK-224	424	5,333	48,121	Núcleo	chr13
	VV_DN51849_c0_g2_i1	STK-225	424	5,333	48,121	Núcleo	chr13
	VV_DN54357_c0_g1_i8	STK-226	452	9,892	51,476	Núcleo	chr13

MAP3K-like	VV_DN55066_c2_g4_i6	STK-227	470	5,673	52,752	Núcleo	chr4
	VV_DN55066_c2_g4_i4	STK-228	470	5,673	52,752	Núcleo	chr4
	VV_DN54408_c1_g2_i4	STK-229	301	6,653	34,284	Núcleo	chr8
	VV_DN51789_c1_g1_i1	STK-230	367	6,784	41,744	Núcleo	chr5
	VV_DN48734_c0_g3_i5	STK-231	406	7,479	45,179	Núcleo	chr7
	VV_DN48734_c0_g3_i2	STK-232	406	7,479	45,179	Núcleo	chr7
	VV_DN48734_c0_g3_i1	STK-233	306	8,089	34,02	Núcleo	chr7
	VV_DN51789_c1_g2_i12	STK-234	324	8,906	37,061	Núcleo	chr5
	VV_DN51283_c0_g1_i1	STK-235	278	8,466	31,58	Núcleo	chr17
	VV_DN51789_c1_g2_i11	STK-236	338	8,906	38,766	Núcleo	chr5
	VV_DN43436_c0_g1_i6	STK-237	373	9,102	42,458	Núcleo	chr17
	VV_DN43436_c0_g1_i3	STK-238	373	9,102	42,458	Núcleo	chr17
	VV_DN43436_c0_g1_i2	STK-239	373	9,102	42,458	Núcleo	chr17
	VV_DN43436_c0_g1_i1	STK-240	373	9,102	42,458	Núcleo	chr17
	VV_DN51079_c0_g1_i7	STK-241	212	9,439	24,657	Núcleo	chr8
	VV_DN51079_c0_g1_i5	STK-242	230	10,056	26,698	Núcleo	chr8
	VV_DN51540_c0_g2_i3	STK-243	489	9,708	55,888	Núcleo	chr17
	VV_DN51540_c0_g2_i1	STK-244	489	9,708	55,888	Núcleo	chr17
	VV_DN51283_c0_g1_i3	STK-245	358	7,965	40,538	Núcleo	chr17

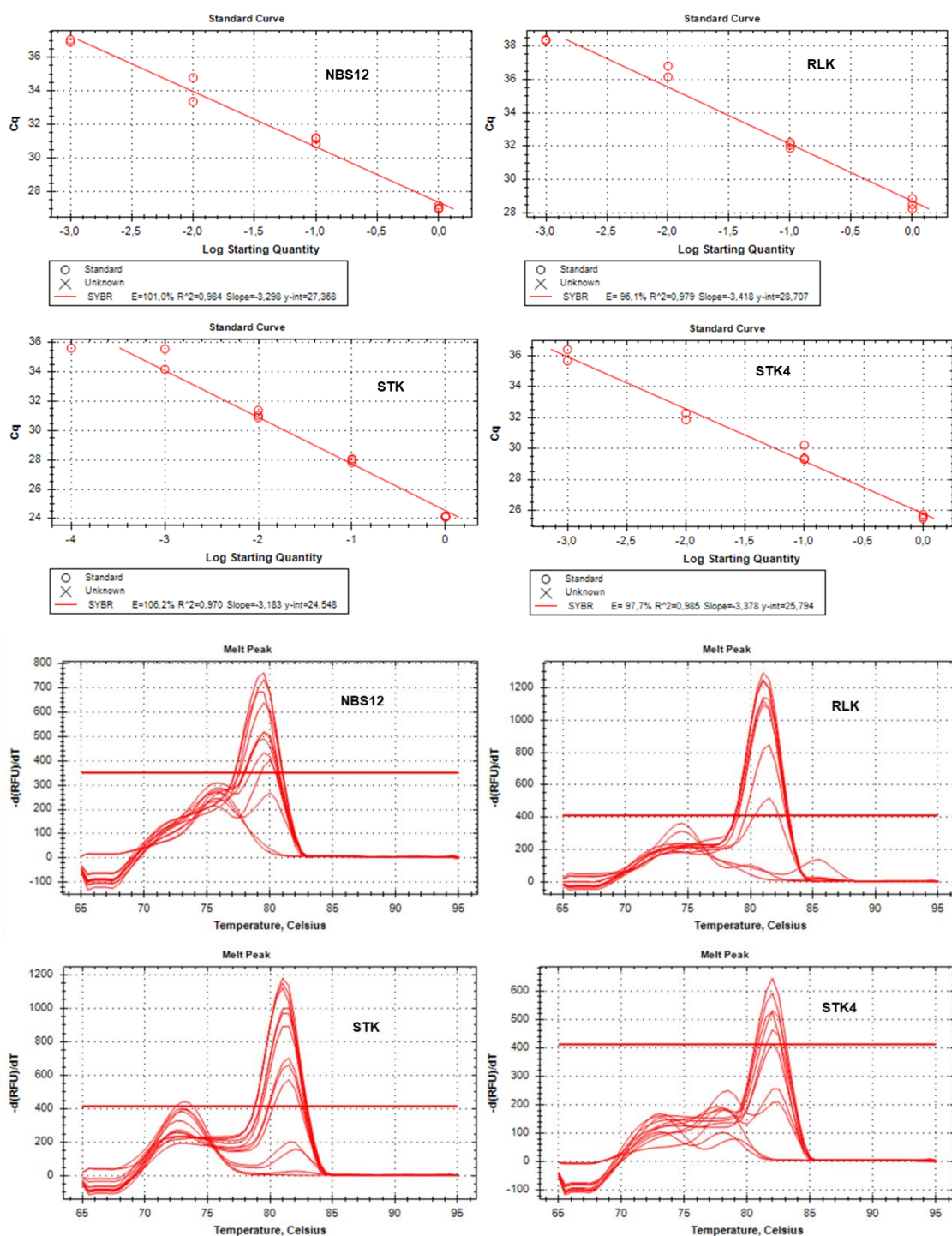
	VV_DN44437_c0_g2_i6	STK-246	325	5,58	36,4	Núcleo	chr4
	VV_DN55325_c0_g1_i3	STK-247	283	9,221	32,276	Núcleo	chr5
	VV_DN55636_c1_g1_i6	STK-248	222	10,257	25,06	Núcleo	chr18
	VV_DN55636_c1_g1_i5	STK-249	222	10,257	25,06	Núcleo	chr18
	VV_DN55636_c1_g1_i4	STK-250	423	8,876	47,404	Núcleo	chr18
	VV_DN55636_c1_g1_i1	STK-251	222	10,257	25,06	Núcleo	chr18
	VV_DN56620_c0_g1_i3	STK-252	477	7,224	54,467	Núcleo	chr12
	VV_DN43281_c2_g1_i1	STK-253	686	6,783	75,92	Núcleo	chr5
MAST_like	VV_DN56207_c0_g3_i11	STK-254	235	4,944	26,578	Núcleo	chr17
	VV_DN56207_c0_g3_i10	STK-255	1298	6,06	142,909	Núcleo	chr17
	VV_DN56207_c0_g3_i9	STK-256	1095	5,304	122,031	Núcleo	chr17
	VV_DN56207_c0_g3_i8	STK-257	1307	6,036	143,704	Núcleo	chr17
	VV_DN56207_c0_g3_i6	STK-258	355	5,037	40,271	Núcleo	chr17
	VV_DN56207_c0_g3_i5	STK-259	1093	5,31	121,881	Núcleo	chr17
	VV_DN56207_c0_g3_i4	STK-260	1305	6,06	143,508	Núcleo	chr17
	VV_DN56207_c0_g3_i1	STK-261	1300	6,036	143,059	Núcleo	chr17
	VV_DN46663_c0_g1_i3	STK-262	356	4,184	39,625	Núcleo	chr18
MEKK1_plant	VV_DN53945_c0_g5_i2	STK-263	623	9,1	67,7	Núcleo	chr4
	VV_DN56274_c3_g4_i5	STK-264	430	9,04	46,61	Núcleo	chr12

	VV_DN56274_c3_g4_i2	STK-265	503	8,78	54,84	Núcleo	chr12
MST3_like	VV_DN52765_c0_g2_i4	STK-266	706	6,33	78	Núcleo	chr19
	VV_DN52765_c0_g2_i2	STK-267	706	6,33	78	Núcleo	chr19
	VV_DN44918_c0_g2_i4	STK-268	446	5,935	51,803	Núcleo	chr4
NDR_like	VV_DN44918_c0_g2_i1	STK-269	503	5,748	57,968	Núcleo	chr4
	VV_DN47898_c0_g1_i1	STK-270	564	8,525	65,577	Núcleo	chr7
	VV_DN51871_c0_g1_i4	STK-271	525	5,619	60,285	Núcleo	chr7
	VV_DN51871_c0_g1_i3	STK-272	530	6,046	61,044	Núcleo	chr7
	VV_DN48502_c0_g1_i5	STK-273	550	5,808	63,445	Núcleo	chr7
	VV_DN48502_c0_g1_i4	STK-274	550	5,808	63,445	Núcleo	chr7
	VV_DN48502_c0_g1_i3	STK-275	550	5,808	63,445	Núcleo	chr7
	VV_DN48502_c0_g1_i2	STK-276	551	5,906	63,573	Núcleo	chr7
	VV_DN48502_c0_g1_i1	STK-277	551	5,906	63,573	Núcleo	chr7
	VV_DN54750_c0_g1_i5	STK-278	608	6,139	67,94	Núcleo	chr6
	VV_DN54750_c0_g1_i2	STK-279	608	6,139	67,94	Núcleo	chr6
Nek	VV_DN52384_c0_g1_i9	STK-280	692	4,849	75,931	Núcleo	chr8
	VV_DN52384_c0_g1_i8	STK-281	659	4,814	72,237	Núcleo	chr8
	VV_DN52384_c0_g1_i2	STK-282	702	4,922	77,162	Núcleo	chr8
	VV_DN51865_c1_g1_i5	STK-283	235	8,326	26,644	Núcleo	chr14

	VV_DN51865_c1_g1_i2	STK-284	235	8,326	26,644	Núcleo	chr14
	VV_DN51865_c0_g1_i3	STK-285	614	9,404	69,045	Núcleo	chr7
OSR1_SPAK	VV_DN54927_c0_g2_i3	STK-286	732	6,94	81,46	Núcleo	chr5
	VV_DN54927_c0_g2_i2	STK-287	732	6,94	81,46	Núcleo	chr5
PDK1	VV_DN48783_c0_g2_i2	STK-288	312	6,61	35,13	Núcleo	chr8
	VV_DN48783_c0_g2_i1	STK-289	383	5,18	42,64	Núcleo	chr8
SnRK2	VV_DN51492_c0_g2_i3	STK-290	355	6,024	40,648	Núcleo	chr7
	VV_DN53385_c1_g1_i2	STK-291	340	5,539	38,554	Núcleo	chr7
	VV_DN53385_c2_g2_i9	STK-292	335	6,071	38,004	Núcleo	chr7
	VV_DN53385_c2_g2_i8	STK-293	335	6,071	38,004	Núcleo	chr7
	VV_DN53385_c2_g2_i7	STK-294	335	6,071	38,004	Núcleo	chr7
SnRK3	VV_DN46902_c1_g1_i10	STK-295	346	7,12	39,13	Núcleo	chr8
	VV_DN46902_c1_g1_i6	STK-296	346	7,12	39,13	Núcleo	chr8
TDY_MAPK	VV_DN51634_c0_g1_i9	STK-297	610	8,424	69,908	Núcleo	chr2
	VV_DN51634_c0_g1_i5	STK-298	515	7,554	59,091	Núcleo	chr2
	VV_DN51634_c0_g1_i3	STK-299	515	7,554	59,091	Núcleo	chr2
	VV_DN49523_c0_g2_i6	STK-300	532	9,481	61,205	Núcleo	chr2
	VV_DN49523_c0_g2_i5	STK-301	610	9,23	68,94	Núcleo	chr2
	VV_DN49523_c0_g2_i2	STK-302	520	9,492	59,875	Núcleo	chr2

	VV_DN49523_c0_g2_i1	STK-303	622	9,223	70,251	Núcleo	chr2
	VV_DN55008_c2_g1_i10	STK-304	563	8,271	63,867	Núcleo	chr2
	VV_DN55008_c2_g1_i7	STK-305	563	8,272	63,895	Núcleo	chr2
	VV_DN55008_c2_g1_i6	STK-306	573	7,884	64,821	Núcleo	chr2
	VV_DN55008_c2_g1_i2	STK-307	567	8,233	64,256	Núcleo	chr2
	VV_DN55008_c2_g1_i1	STK-308	567	8,233	64,256	Núcleo	chr2
TEY_MAPK	VV_DN49741_c1_g2_i1	STK-309	375	5,58	43,11	Núcleo	chr2
	VV_DN49741_c0_g1_i1	STK-310	371	4,69	42,56	Núcleo	chr2
	VV_DN54736_c0_g1_i1	STK-311	368	7,86	42,63	Núcleo	chr4
ULK4	VV_DN43872_c0_g1_i1	STK-312	785	6,53	87,65	Núcleo	

ANEXO F. EFICIÊNCIAS E CURVAS DE MELTING DOS GENES NBS12, RLK, STK E STK4 EM AMOSTRAS DE CDNA DE TECIDOS FOLIARES DA CULTIVAR IAC 572.



ANEXO G. EFICIÊNCIAS E CURVAS DE MELTING DOS GENES NBS12, RLK, STK E STK4 EM AMOSTRAS DE CDNA DE TECIDOS FOLIARES DA CULTIVAR RED GLOBE.

