



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

MARIANNE FIRMINO DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE
DEFENSINAS E TLPS (THAUMATIN-LIKE PROTEINS) EM VITIS SPP. SOB
ESTRESSE BIÓTICO**

Recife

2019

MARIANNE FIRMINO DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE
DEFENSINAS E TLPS (THAUMATIN-LIKE PROTEINS) EM VITIS SPP. SOB
ESTRESSE BIÓTICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientadora: Dr^a Ana Maria Benko-Iseppon

Coorientadores: Dr^a Roberta Lane de Oliveira Silva

Dr. Nataniel Franklin de Melo

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Oliveira, Marianne Firmino

Caracterização estrutural e expressão diferencial de defensinas e TLPS (Thaumatococcus-Like Proteins) em *Vitis* spp. sob estresse biótico / Marianne Firmino Oliveira - 2019.

110 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko-Iseppon

Coorientadores: Roberta Lane de Oliveira Silva e Nataniel Franklin de Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2019.

Inclui referências

1. Videira 2. *Xanthomonas citri* pv 3. RNA I. Benko-Iseppon, Ana Maria (orient.) II. Silva, Roberta Lane de Oliveira (coorient.) III. Melo, Nataniel Franklin de (coorient.) IV. Título

583.86

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-208

MARIANNE FIRMINO DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE
DEFENSINAS E TLPS (THAUMATIN-LIKE PROTEINS) EM VITIS SPP. SOB
ESTRESSE BIÓTICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 21/03/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Ana Maria Benko-Iseppon
(Orientadora - Universidade Federal de Pernambuco)

Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto
(Membro interno - Universidade Federal de Pernambuco)

Dr. Nataniel Franklin de Melo
(Membro externo - Embrapa Semiárido)

À minha família, por todo carinho, cuidado e apoio, dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, ao departamento de Genética pela infraestrutura concedida possibilitando realizar todas nossas análises, a Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pelo suporte oferecido neste período e a Embrapa Semiárido pela realização do experimento de videira e pela parceria de longas datas.

Aos órgãos de apoio à pesquisa CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) e ao CNPq pelo suporte financeiro.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Maria Benko-Iseppon, pela oportunidade de orientar-me e por toda ajuda que me foi concebida.

Aos meus coorientadores Dr^a Roberta Lane e Dr. Nataniel Franklin por todo apoio, disponibilidade e paciência ao passar todo conhecimento necessário.

Ao Dr. João Pacífico, por me auxiliar e me acalmar frente aos desafios da bioinformática.

Agradeço ao nosso Pai celestial pela oportunidade de viver, amar e ser amada. Por Ele ter me sustentado nos dias de aflições e por me guiar todos esses anos no caminho dEle.

Aos meus pais, Maria do Carmo e Aurélio que me acompanham desde o início de tudo, sempre me incentivando e auxiliando no que fosse necessário, não mediram esforços para oferecer o melhor a mim e aos meus irmãos, mesmo que tivessem que abdicar algo para eles.

Aos meus irmãos, Juliane, Thiego e Thiago, e a minha cunhada Mariana Sena, pelo companheirismo, amor e risadas, momentos que foram de grande valia, trazendo-me bastante paz no coração.

Aos meus cachorros, Xodó (*in memorian*), Balu, Juca e Sansão por me darem tanto amor, responsáveis pelo meu riso após os dias cansativos.

A todos os membros do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV), aos amigos que formei nessa caminhada: Andreia Cristiny, Bruna Bernardo, Joelson Germano, José Roseno, Vanessa Emanuelle, por todos momentos únicos e prazerosos, por ninguém soltar a mão de ninguém!

A Artemisa Borges, Carolline Pires, Flávia Araújo e LethiciaTavares pelas conversas e por terem me ajudado nesta reta final.

A Jéssica Bárbara e Livia Martins, por todo apoio, conselhos e auxílios, me incentivando e não deixando o desânimo me tomar por completo. Pelas saídas memoráveis e pela certeza de que o que foi construído aqui, perdurará!

A minha amiga de infância Manuela Passos, por se preocupar, me apoiar e torcer por mim.

Aos meus amigos do fundão: Anderson Torres, Beatriz Matos, Breno Luiz, Endrews Cezar, Jonathan Felipe, Marcelo Farias, Pedro Nunes, Rodrigo Fonseca, Taysa Rakabe, Thiego Moura que me acompanham desde a época do colégio.

Agradeço aos encontros prazerosos proporcionados pelos amigos e “agregados” do módulo 2, Diego Amorim, Carolina Rodrigues, Estela Maria, Marina Alves, Nelma Pereira, Kaoana Iannuzzi, Karol Nogueira, Kataryna Fonseca, Romero Miranda, Pedro Victor.

As minhas amigas Angélica Oliveira, Carolina Sette, Laila Valois, Marcela Ralph, Marielle Andrade, Tatyane Melo e Thaís Galvão por me escutarem ao longo desses dois anos e pelos nossos encontros que aliviavam o estresse corriqueiro do cotidiano.

A todos que contribuíram de alguma forma para que eu concluísse essa nova etapa!

Muito Obrigada!

*Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos.
Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que
fazemos de nós!”
(Chico Xavier)*

RESUMO

A videira (*Vitis vinifera*) possui grande representatividade na economia mundial. No entanto, esta espécie vem sofrendo com a influência de condições ambientais adversas, especialmente pelo ataque de patógenos, impactando sobre a produtividade da cultura. Dessa forma, estudos baseados nos mecanismos de defesa têm sido propostos visando o estabelecimento de estratégias aplicáveis ao melhoramento e à biotecnologia, para minimizar os danos causados por patógenos. O presente trabalho objetivou analisar a estrutura de genes codificantes de peptídeos antimicrobianos (AMPs) do tipo defensina e TLP (*Thaumatin Like Protein*) em *Vitis* spp., inferindo sobre seus padrões de expressão, características estruturais e funcionais. Para tanto, foram geradas bibliotecas de RNA-Seq (Illumina HiSeq2500) usando clones da cultivar 'Red Globe' (considerada susceptível ao cancro bacteriano) e do híbrido IAC-572, resultante do cruzamento entre o porta-enxerto 101-14 MGT (*V. riparia* X *V. rupestris*) com *V. caribaea*. O híbrido resultante é considerado apenas moderadamente resistente ao cancro bacteriano. As coletas foram realizadas em quatro tempos distintos: 90 minutos, 6 horas, 24 horas e 48 horas após a inoculação com a bactéria *Xanthomonas citri* pv. *anacardi* (Xca). Para as análises *in silico*, sequências-sonda das duas classes de AMPs foram retiradas do banco de dados CAMP e submetidas à ferramenta HMMER, utilizada para identificar padrões de AMPs de interesse. As análises via HMMER permitiram a identificação de duas defensinas e de 32 TLPs. A predição da atividade antimicrobiana *in silico* indicou que as sequências possuem alto potencial antimicrobiano. A modelagem molecular por homologia possibilitou o desenho de modelos tridimensionais para cada AMP avaliado, com os candidatos apresentando 90 % dos resíduos de aminoácidos em regiões energeticamente favoráveis. Após caracterização e modelagem comparativa, foram desenhados 11 pares de *primers*, sendo cinco para transcritos que codificaram genes de defensina e seis para TLPs. Desse total, quatro pares de *primers* (VvDef2, VvTLP1, VvTLP3 e VvTLP4) demonstraram-se eficientes nas amostras de cDNA das duas cultivares de *Vitis* e foram selecionados para validação da expressão usando PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). As análises de expressão relativa realizadas para VvDef2 e VvTLP3 confirmaram os resultados da expressão diferencial da RNA-Seq. Por sua vez, VvTLP1 e VvTLP4 apresentaram, na cultivar resistente, uma indução de 5,36 e 9,19 após 48 horas de inoculação com Xca em relação aos

seus controles sob condições normais, enquanto na cultivar susceptível a sua expressão não foi alterada, ressaltando a resistência moderada do híbrido IAC 572 e a susceptibilidade acentuada da cultivar Red Globe. Os resultados permitiram obter dados relevantes quanto aos efeitos da interação patogênica entre a videira e *Xca*, além de caracterizar e validar AMPs promissores para uso em programas de melhoramento da cultura.

Palavras-chave: Videira. *Xanthomonas citri* pv. *anacardi*. RNA-Seq. RT-qPCR.

ABSTRACT

The vine (*Vitis vinifera*) has a great representation in the worldwide economy. However, this species has been suffering from the influence of adverse environmental conditions, especially by the attack of pathogens, impacting on the crop productivity. Thus, studies based on defense mechanisms have been proposed aiming to establish strategies for the biotechnological improvement to minimize the damage caused by pathogens. The present project aimed to analyze the structure of genes encoding antimicrobial peptides (AMPs) of the defensin type and TLP (Thaumatin Like Protein) in *Vitis* spp., Inferring on their expression patterns, structural and functional characteristics. To that end, RNA-Seq (Illumina HiSeq2500) libraries were generated using clones of the 'Red Globe' cultivar (susceptible to bacterial canker) and of the hybrid IAC-572, resulting from the crossing between the rootstock 101-14 MGT (*V. riparia* X *V. rupestris*) with *V. caribaea*. The hybrid is considered only moderately resistant to bacterial canker. The samples were collected in four different times: 90 minutes, 6 hours, 24 hours and 48 hours after inoculation with the bacterium *Xanthomonas citri* pv. *anacardi* (Xca). For the in silico analyzes, seed sequences of two classes of AMPs were retrieved from the CAMP database and submitted to the HMMER tool, used to identify the sequence pattern of the AMPs. The HMMER analysis allowed the identification of two defensins and 32 TLPs. The prediction of the in silico antimicrobial activity indicated that the sequences have a high antimicrobial potential. Homology molecular modeling enabled the elucidation of the protein structures, with candidates presenting 90% of the amino acid residues in energetically favorable regions. After the characterization and comparative modeling, 11 pairs of primers were designed, five for transcripts encoding defensin genes and six for TLPs. From this total, four pairs of primers (VvDef2, VvTLP1, VvTLP3 and VvTLP4) were efficient in the cDNA samples of the two *Vitis* cultivars and were selected for validation of expression using real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The relative expression analysis performed for VvDef2 and VvTLP3 confirmed the differential expression of RNA-Seq. On the other hand, VvTLP1 and VvTLP4 presented an induction of 5.36 and 9.19 respectively in the resistant cultivar after 48 hours of inoculation with Xca in compared to their controls under normal conditions, whereas in the susceptible cultivar its expression it was not altered, emphasizing the moderate resistance of the hybrid IAC 572 and the high susceptibility of the cultivar Red Globe. The results allowed to obtain

relevant data regarding the effects of the pathogen interaction between the grape and Xca, besides characterizing and validating promising AMPs for use in crop breeding programs.

Keywords: Vine. *Xanthomonas citri* pv. *anacardi*. RNA-Seq. RT-qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 –	Morfologia da folha e de um ramo aéreo e vegetativo de <i>Vitis vinifera</i>	23
Figura 2 –	Percentual da produção mundial de videira e sua distribuição por continente.....	24
Figura 3 –	Principais sintomas causados pela bactéria <i>X. citri</i> em videira. À esquerda órgãos vegetativos, à direita bagas.....	27
Figura 4 –	Principais categorias de peptídeos antimicrobianos considerando sua estrutura. I) folhas β ; II) α -hélice; III) peptídeos estendidos; IV) loop.....	30
Figura 5 –	Modelos propostos para o modo de ação AMPs: (A) Canal transmembrana, (B) Modelo tapete e (C) Poro toroidal.....	31

Artigo I

Figura 1 –	Alinhamento das defensinas com presença de resíduos de cisteína, respectivamente representado pela (★).....	45
Figura 2 –	Pontes dissulfeto considerando sequência consenso das defensinas candidatas em <i>Vitis</i> spp.....	46
Figura 3 –	Modelo esquemático das estruturas secundárias das defensinas em <i>Vitis</i> spp.....	46
Figura 4 –	Estrutura 3D modelada por homologia para duas defensinas de <i>Vitis</i> spp.....	47
Figura 5 –	Fenograma das candidatas à defensina de <i>Vitis</i> spp. utilizando sequências de defensinas disponíveis no banco de dados PhytAMP. As proteínas são representadas por seus códigos de acesso seguido da espécie vegetal.....	48
Figura 6 –	Perfil de expressão in silico das defensinas em dois genótipos de <i>Vitis</i> contrastantes quanto à resistência contra <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardi</i> , com base em dados de RNA-Seq. A escala de cores representa os níveis de expressão relativa com vermelho indicando indução e verde repressão dos transcritos	49

Figura 7 –	Expressão relativa do transcrito candidato a Defensina (DEF 2 - Vit_DN40930_c0_g1_i1) após 90 minutos, 24 horas e 48 horas da inoculação da bactéria <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardi</i> , comparativamente aos controles não inoculado.....	51
Figura S1 –	Alinhamento individual das sequências de cada grupamento.....	63
Figura S2 –	Curvas de eficiência de DEF 2 (Vit_DN40930_c0_g1_i1) obtidas via RT-qPCR	64
Figura S3 –	Curvas de <i>Melting</i> de (DEF 2 Vit_DN40930_c0_g1_i1) obtidas via RT-qPCR.....	64

Artigo II

Figura 1 –	Alinhamento das TLPs com presença de resíduos de cisteína e pelo motivo REDDD respectivamente representado pela (■) e (★)	72
Figura 2 –	Ligações dissulfeto das candidatas à TLPs em <i>Vitis</i> spp.....	75
Figura 3 –	Modelo esquemático das estruturas secundárias das TLPs em <i>Vitis</i> spp.....	75
Figura 4 –	A) Estrutura 3D modelada por homologia para TLPs de <i>Vitis</i> spp. B) Exemplo da localização dos domínios.....	76
Figura 5 –	Fenogramas das TLPs identificadas pelo grupo, comparativamente com sequências do banco de dados <i>Uniprot</i> . As proteínas são representadas por seus códigos de acesso seguido da espécie vegetal.....	79
Figura 6 –	Perfis de expressão <i>in silico</i> das TLPs contendo dois genótipos de <i>Vitis</i> contrastantes quanto à resistência contra <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardi</i> , mediante aos dados de RNA-Seq. A escala de cores representa os níveis de expressão relativa com vermelho indicando indução e em verde repressão dos transcritos.....	80

Figura 7 –	Expressão relativa do transcrito candidato a TLP 1 (Vit_DN49641_c0_g1_i1) após 90 minutos, 24 horas e 48 horas da inoculação da bactéria <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardi</i> , comparativamente aos controles não inoculados.....	83
Figura 8 –	Expressão relativa do transcrito candidato a TLP 3 (Vit_DN31917_c0_g1_i1) e TLP 4 (Vit_DN41703_c0_g1_i1) após 90 minutos, 24 horas e 48 horas da inoculação da bactéria <i>X. citri</i> pv. <i>anacardi</i> , comparativamente aos controles não inoculados.....	84
Figura S1.A. –	Alinhamento das sequências de cada grupo na análise fenética.....	93
Figura S1.B. –	Alinhamento das sequências de cada grupo na análise fenética.....	94
Figura S2 –	Curvas de eficiência de TLP 1 (Vit_DN49641_c0_g1_i1), TLP 3 (Vit_DN31917_c0_g1_i1) e TLP 4 (Vit_DN41703_c0_g1_i1) obtidas via RT-qPCR.....	95
Figura S3 –	Curvas de <i>Melting</i> de TLP 1 (Vit_DN49641_c0_g1_i1), TLP 3 (Vit_DN31917_c0_g1_i1) e TLP 4 (Vit_DN41703_c0_g1_i1) obtidas via RT-qPCR.....	96

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 –	Principais estados produtores de uva no Brasil, área cultivada em hectares e total da produção, em toneladas por hectares.....	25
Tabela 2 –	Produção de uvas, vinhos e derivados no Rio Grande do Sul no ano de 2018.....	25
Tabela 3 –	Levantamento bibliográfico e classificação das proteínas PR analisadas em <i>Vitis</i> spp.....	28

Artigo I

Tabela 1 –	Genes de referência e genes alvos e seus números de acesso, anotações e sequências dos <i>primers</i>	44
Tabela 2 –	Localização subcelular, ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (pM) das defensinas.....	45
Tabela 3 –	Localização subcelular, ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (pM) das defensinas.....	46
Tabela 4 –	Valores obtidos no Swiss-Model e Procheck para a avaliação de qualidade dos modelos tridimensionais gerados para as defensinas <i>Vitis</i> spp.....	47
Tabela 5 –	Expressão gênica relativa de DEF 2 (Vit_DN40930_c0_g1_i1) por RT-qPCR em 90 minutos, 24 horas e 48 horas em duas cultivares de videira infectadas com <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardi</i> e sua regulação na biblioteca de RNA-Seq (90 minutos).....	52

Artigo II

Tabela 1 –	Genes de referência e genes alvos de TLP com seus números de acesso, anotações e sequências dos <i>primers</i>	71
Tabela 2 –	Domínios conservados previamente reconhecidos para TLPs (Thaumatococcus Like Proteins) bem como o respectivo número de candidatos identificados em <i>Vitis</i> spp.....	73
Tabela 3 –	Localização subcelular, ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (pM) das TLPs.....	73

Tabela 4 –	Potencial antimicrobiano das TLPs obtidas no CAMP _{R3}	74
Tabela 5 –	Valores obtidos no Swiss-Model e Procheck para a avaliação de qualidade dos modelos tridimensionais gerados para as TLPs <i>Vitis</i> spp.....	77
Tabela 6 –	Expressão gênica relativa do gene e dos alvos por RT-qPCR em 90 minutos, 24 horas e 48 horas em duas cultivares de videira infectadas com <i>X. citri</i> e sua regulação na biblioteca de RNA-Seq (90 minutos).....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácidos
AMP	<i>AntiMicrobial Peptides</i> (Peptídeo antimicrobiano)
ANN	<i>Artificial Neural Network</i>
APG IV	<i>Angiosperm Phylogeny Group</i>
CAMP	<i>Collection of Anti-Microbial Peptides</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DAC	<i>Discriminant Analysis classifier</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ET	<i>Ethylene</i> (Etileno)
FC	<i>Fold Change</i>
GMQE	<i>Global Model Quality Estimation</i> (Estimativa Global de Qualidade do Modelo)
HR	<i>Hypersensitive Response</i> (Resposta hipersensitiva)
JA	<i>Jasmonic acid</i> (Ácido jasmônico)
KDa	Kilodalton
MHA	Milhões de hectares
MIQE	<i>The Minimum Information for Publication of Quantitative RealTime PCR Experiments</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional para Informação Biotecnológica)

OIV	<i>International Organisation of Vine and Wine</i>
PHYTAMP	<i>Plant Antimicrobial Peptides database</i>
PI	Ponto Isoelétrico
PM	Peso Molecular
PR	<i>Pathogenesis-related</i> (Proteínas relacionadas à patogênese)
QMEAN	<i>Qualitative Model Energy ANalysis</i> (Análise de Energia Modelo Qualitativa)
RFC	<i>Random Forest Classifier</i>
RGP	Região Generosamente Permitida
RMF	Região Mais Favorável
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
RNA-Seq	<i>RNA Sequencing</i> (Sequenciamento de RNA)
RNP	Região Não Permitida
RPA	Região Permitida Adicional
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription Quantitative Real Time PCR</i> (PCR quantitativa em Tempo Real por Transcrição Reversa)
AS	<i>Salicylic Acid</i> (Ácido Salicílico)
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i>
SVM	<i>Support Vector Machine</i>
SVSF	Submédio do Vale do São Francisco
TLPs	<i>Thaumatococcus-like proteins</i>
WTSS	<i>Whole transcriptome shotgun sequencing</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	OBJETIVOS.....	21
1.1.1	Objetivo Geral.....	21
1.1.2	Objetivos Específicos.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>Vitis vinifera</i> L.....	22
2.2	IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DE <i>V. vinifera</i>	23
2.3	CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA: ORIGEM NO BRASIL, DISSEMINAÇÃO, SINTOMAS E FONTES DE RESISTÊNCIA.....	26
2.4	PROTEÍNAS RELACIONADAS À PATOGÊNESE.....	28
2.5	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM VEGETAIS.....	29
2.5.1	Defensinas.....	31
2.5.2	Tlp.....	33
2.6	BIOINFORMÁTICA APLICADA ÀS ÔMICAS.....	34
2.7	TRANSCRIPTÔMICA E RNA-SEQ.....	35
3	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE DEFENSINAS EM <i>Vitis</i> SPP. SOB ESTRESSE BIÓTICO.....	37
4	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE AMPS DA CLASSE TLP EM <i>Vitis</i> SPP. SOB ESTRESSE BIÓTICO.....	65
5	CONCLUSÕES GERAIS.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98

1 INTRODUÇÃO

A *Vitis vinifera* L. é uma espécie frutífera de grande importância econômica mundial. Seu fruto serve de insumo para a produção de vinho, uvas de mesa, sucos, licores destilados, passas secas, entre outros (LI *et al.*, 2017). As espécies de *Vitis* são conhecidas por possuir quantidades significativas de compostos fitoquímicos benéficos, incluindo antocianinas, flavonoides e resveratrol, os quais propiciam diversos benefícios para a saúde devido às suas atividades antioxidantes e antiproliferativas (PEZZUTO, 2008; YANG *et al.*, 2009).

Segundo dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) a produção mundial de uvas em 2017 superou 74 milhões de toneladas, distribuídas em uma área de cultivo de aproximadamente sete milhões de hectares. Os continentes Europeu e Asiático contribuem com mais de 70 % dessa produção, sendo a China e a Itália os principais países produtores (FAO, 2018). O Brasil atingiu uma produção de 1,4 milhões de toneladas de uvas em 2017, a maior da história vitícola do país, com o estado do Rio Grande do Sul (maior produtor do país) apresentando safra recorde de aproximadamente um milhão de quilos (IBGE, 2017; MELLO, 2018). No Nordeste, a região semiárida do Submédio do Vale do São Francisco (SVSF) possui um importante papel no cenário da viticultura brasileira, sendo capaz de produzir cerca de duas safras e meia de uvas por ano (MELLO, 2018). No entanto, esta região vem sofrendo perdas severas em suas plantações devido à incidência do cancro bacteriano, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, que figura como umas das mais impactantes doenças da videira e um dos principais fatores de risco para a produção da cultura na região (GAMA *et al.*, 2018).

Devido ao hábito sésstil e à impossibilidade de evadir-se de situações de estresses ao longo de sua evolução as plantas desenvolveram uma intrincada rede de respostas moleculares relacionadas a diversos mecanismos de defesa vegetal, entre os quais está incluída a síntese de peptídeos antimicrobianos (*AntiMicrobial Peptides* - AMPs) (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010). Os AMPs compreendem moléculas evolutivamente ancestrais que desempenharam um papel fundamental no sucesso evolutivo de organismos multicelulares, estando presentes em todos os grupos de organismos, incluindo microrganismos (ASADUZZAMAN e SONOMOTO, 2009), fungos (MARX, 2004), artrópodes (BULET e STOCKLIN, 2005), vertebrados (BULET, 2004) e vegetais (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010).

Em plantas, os AMPs classificam-se entre as proteínas PR, tradicionalmente nas categorias PR-11, PR-12 e PR-13. As defensinas estão incluídas na categoria PR-12 (BENKO-ISEPPON et al., 2010) e compreendem peptídeos de carga catiônica, com baixo peso molecular, contendo de 45 a 54 aminoácidos e duas a quatro ligações dissulfeto, sendo altamente básicas e ricas em cisteínas (BROEKAERT et al., 1995; PELEGRINI e FRANCO, 2005). As defensinas são conhecidas por sua atividade antimicrobiana contra bactérias (KRASZEWSKA et al., 2016), fungos (ODDEPALLY e GURUPRASAD, 2015), vírus e protozoários (BROGDEN, 2005).

Por sua vez, as TLPs pertencem à Classe PR-5, compreendendo proteínas com aproximadamente 200 aminoácidos, massa molecular de 21 a 26 KDa e presença de oito pontes dissulfeto, relatadas por possuírem propriedades antifúngicas (VELAZHAHAN, 1999). Tais proteínas ganharam notoriedade devido ao seu sabor imensamente doce, cerca de 100 mil vezes mais doce do que a sacarose (VAN DER WEL e LOEVE, 1972), o que contribuiu para que a maioria das abordagens biotecnológicas envolvendo TLPs fossem aplicadas na indústria alimentícia e farmacêutica (FAUS, 2000; MASUDA e KITABATAKE, 2006). Diversos estudos recentes (RAJAM, et al., 2007; MUNIS et al., 2010; WARD, 2102; MISRA et al., 2016; SRIPRIYA et al., 2017) abordam a regulação dessas proteínas em situações de estresse biótico e abiótico em espécies de interesse agrônomo.

Não existem relatos na literatura envolvendo os efeitos da interação patogênica entre a videira e *X. citri* pv. *anacardi*, especialmente quanto à expressão de defensinas e TLPs em cultivares contrastantes em diferentes tempos pós-inoculação. Dessa forma, o presente estudo objetivou analisar a estrutura de genes codificantes de AMPs do tipo defensina e TLPs em *Vitis* spp., inferindo sobre seus padrões de expressão, características estruturais e funcionais, validando candidatos selecionados através de RT-qPCR visando sua aplicação em inferências biotecnológicas e no melhoramento da videira.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Caracterizar genes codificantes de peptídeos antimicrobianos em *V. vinifera*, em especial defensinas e TLP's, inferindo sobre seus padrões de expressão, características estruturais e funcionais, suas propriedades e potenciais aplicações.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Selecionar genes codificantes de AMPs diferencialmente expressos em videira, acessando a diversidade e inferindo sobre seu papel na defesa do vegetal.
- Definir a estrutura da forma gênica de AMPs em videira e em espécies relacionadas, classificando-as conforme sua similaridade.
- Validar a expressão de sequências selecionadas através de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), de modo a confirmar os perfis de expressão identificados.
- Identificar regiões e padrões estruturais conservados nos níveis primário, secundário e terciário da forma proteica, esclarecendo aspectos associados à estabilidade e função dos produtos proteicos conceituais.

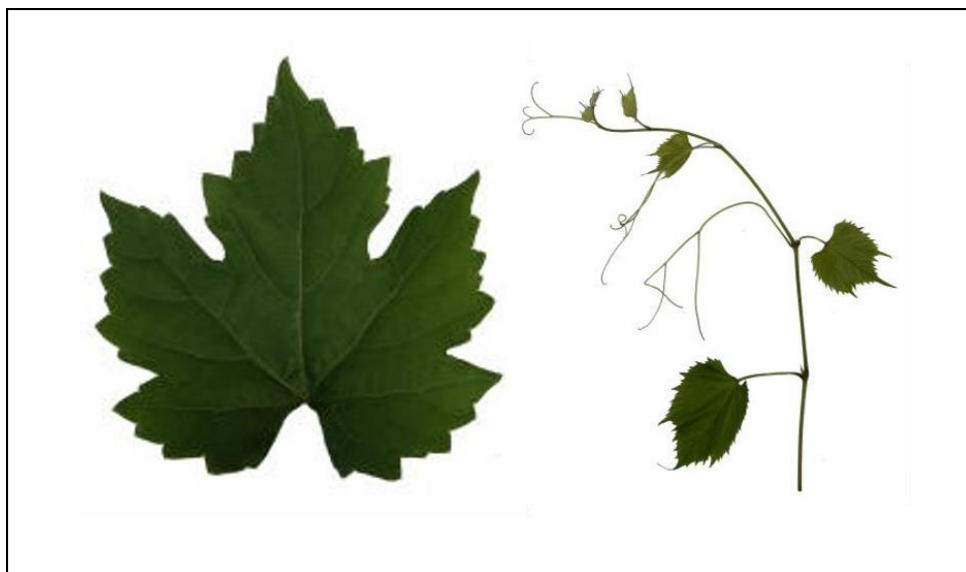
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Vitis vinifera* L.

Conforme o sistema de classificação mundial APG IV (*Angiosperm Phylogeny Group*), a família Vitaceae compreende cerca de 850 espécies de distribuição pantropical, agrupadas em 14 gêneros, com destaque para *Cissus* L. e *Vitis*. O gênero *Vitis*, por sua vez, é composto aproximadamente 70 espécies de importância econômica, distribuídas nos trópicos e subtropicais dos continentes americano, asiático e europeu (APG IV, 2016).

A *V. vinifera*, popularmente conhecida como videira europeia, é amplamente difundida e mundialmente cultivada para produção em larga escala de vinhos, espumantes e uvas de mesa, entre outros (LI *et al.*, 2017). A videira é uma trepadeira, possuindo geralmente caule lenhoso e ramos flexíveis. Suas folhas são simples, grandes, alternadas, com presença de pecíolos e cinco lóbulos pontiagudos (Figura 1). As flores são pequenas, pediceladas e actinomorfas, com disco floral intraestaminal em forma de anel e inflorescência do tipo racemo (APG IV, 2016).

Figura 1. Morfologia da folha e de um ramo aéreo vegetativo de *Vitis vinifera*



Fonte: EMBRAPA (2016)

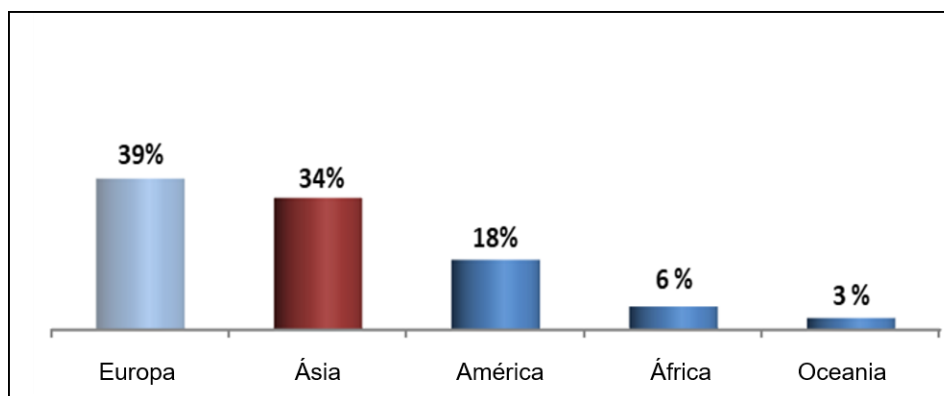
Seus frutos são carnosos do tipo baga, ricos em carboidratos e sais minerais, como ferro e cálcio, além de ser uma fonte importante de vitaminas C, K e do complexo B. Além disso, apresenta em sua composição carotenoides e compostos fenólicos, dentre os quais se destacam as antocianinas, flavonoides e flavan-3-ol (APG IV, 2016; HERNÁNDEZ, 2017). Estes compostos fenólicos estão presentes majoritariamente nas sementes e na pele da uva, desempenhando importante papel na qualidade dos frutos e conferindo uma série de benefícios nutricionais e terapêuticos, além de propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticarcinogênicas (PINNA et al., 2017; COSTA et al., 2017; MESTRE et al., 2017; NIRMALA et al., 2017).

2.2 IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DE *V. vinifera*

A videira é uma das frutíferas mais comercializadas, apresentando grande representatividade na economia mundial. De acordo com dados disponibilizados pela *International Organisation of Vine and Wine* (OIV), a área destinada para o seu cultivo no mundo é superior a sete milhões de hectares, tendo como principais países produtores a China e a Itália. A produção mundial da cultura atinge atualmente cerca de 75 milhões de toneladas, distribuída pelo continente Europeu, Americano, Asiático, Africano e Oceania. Dentre esses, os continentes Europeu e Asiático são os mais representativos, sendo responsáveis por 39 % e 34 % dessa produção, respectivamente (Figura 2) (OIV, 2016).

A videira foi introduzida em território brasileiro no século XVI, na região Sudeste, devido às condições climáticas distintas do seu centro de origem, região onde passou por diversos processos adaptativos. No entanto, esta espécie obteve sucesso em seu cultivo e desenvolvimento, permitindo assim, as primeiras iniciativas no sentido de fabricar vinhos (ROSA e SIMÕES, 2004; DEBASTIANI, 2016). A viticultura brasileira apresenta características distintas das tradicionais regiões vitícolas do mundo, as quais estão associadas essencialmente a fatores ambientais e territoriais. O ciclo vegetativo e época de colheita da videira ocorrem em períodos distintos no Brasil, com regiões de colheitas anuais tradicionais, mas também com possibilidade de colheita diária durante o ano todo na região do Vale do São Francisco (MELLO, 2018).

Figura 2. Percentual da produção mundial de videira e sua distribuição por continente



Fonte: OIV (2016)

O Brasil vem progredindo e se destacando em programas de melhoramento da videira (especialmente envolvendo cultivares de uvas sem sementes), bem como na produção de uvas de mesa, vinhos e espumantes, exportando para diversas potências mundiais, como Estados Unidos e Alemanha (FAO, 2016; MELLO, 2018). Os estados de Rio Grande de Sul, Pernambuco e São Paulo representam os principais produtores e exportadores de uvas produzidas no país (Tabela 1), contribuindo para a produção de vinhos, espumantes e sucos, entre outros (MELLO, 2018; IBRAVIN, 2019). De acordo com dados do Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN), o setor vitivinícola comercializou aproximadamente 417 milhões de litros de vinhos, espumantes, sucos e outros derivados em 2018, apenas no Rio Grande de Sul (Tabela 2) (IBRAVIN, 2019).

Tabela 1. Principais estados produtores de uva no Brasil, área cultivada em hectares e total da produção, em toneladas por hectares

Estados	Hectares	Produção (tonelada/ano)
Rio Grande do Sul	48.830	956.913
Pernambuco	9.054	390.300
São Paulo	7.431	133.118
Santa Catarina	4.700	65.800
Paraná	4.170	56.295
Bahia	2.229	51.090
BRASIL	78.028	1.680.020

Fonte: MELLO (2018)

Tabela 2. Produção de uvas, vinhos e derivados no Rio Grande do Sul no ano de 2018

Produto	Produção (tonelada/ano)
Uvas Viníferas	65.5
Americanas híbridas	597.7
Vinhos Viníferas	38.71
Vinhos Comuns	218.38
Outros derivados	160.67

Fonte: IBRAVIN (2019)

No Nordeste, a região semiárida do Submédio do Vale do São Francisco (SVSF) possui um importante papel no cenário da viticultura, apresentando uma das maiores plantações de uva do Brasil, com cerca de nove mil hectares destinados para o seu cultivo e uma produção anual de 390.300 mil toneladas por hectare (MELLO, 2018). Esta região, além de favorecida pelos recursos naturais, é impulsionada por investimentos públicos e privados que resultam no crescimento da área cultivada e na alta produtividade da cultura, obtendo cerca de duas safras e meia por ano, possibilitadas pelo uso de manejo da irrigação (ALBUQUERQUE, 2013).

A cultura da videira possui grande importância socioeconômica no SVSF devido à fabricação de produtos *in natura* ou processados, além de ser fonte geradora de

emprego e renda para pequenas famílias rurais (SILVA e CORREIA, 2010; PROTAS *et al.*, 2014). No entanto, apesar da sua reconhecida importância, a produtividade da videira vem sofrendo com a influência de condições ambientais adversas na região SVSF. Além disso, o ataque de microrganismos patogênicos também desempenha um papel expressivo na produtividade da cultura, acarretando perdas significativas. A produtividade e a qualidade da uva sofrem especialmente nos estados da Bahia e de Pernambuco, com a ocorrência do cancro bacteriano, considerada a principal doença dessas regiões, com incidência expressiva (BARBOSA *et al.*, 2016; MALAVOLTA JR. *et al.*, 2003).

2.3 CANCRO BACTERIANO DA VIDEIRA: ORIGEM NO BRASIL, DISSEMINAÇÃO, SINTOMAS E FONTES DE RESISTÊNCIA

O agente causador do cancro bacteriano da videira foi inicialmente proposto como sendo a espécie *Xanthomonas citri* pv. *viticola*. No entanto, estudos recentes de sequenciamento genômico dessa bactéria realizados por nosso grupo (Gama *et al.*, 2018; Silva-Júnior *et al.*, 2018), resultaram em reposicionamento taxonômico desse patógeno atualmente reconhecido como *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* (doravante designado como *Xca*).

Os sintomas do cancro bacteriano da videira foram identificados pela primeira vez Brasil em 1998, em parreirais do município de Petrolina no SVSF. Acredita-se que a bactéria tenha sido introduzida no país por meio de material vegetativo contaminado proveniente da Índia ou de outros hospedeiros potenciais, sendo responsável por causar a eliminação de diversos parreirais (LIMA, 2003; TRINDADE *et al.*, 2005).

A *X. citri* é um bastonete Gram-negativo, com dimensões de 0,6 x 1,2 a 2,5 µm, possui um flagelo polar e metabolismo aeróbico, com colônias arredondadas e brilhantes com bordas lisas (NASCIMENTO e MARIANO, 2004). Essa bactéria sobrevive de um ciclo para outro em plantas infectadas ou epifiticamente em órgãos da parte aérea, na presença de condições favoráveis ao seu desenvolvimento (alta umidade e temperatura). Sua disseminação se dá por meio do uso de ferramentas e materiais infectados rotineiramente utilizados nas operações de campo, bem como através de mudas e/ou bacelos infectados, que irão originar plantas doentes (ARAUJO, 2001; LOPES e NASCIMENTO, 2004). Após a infecção, as folhas apresentam pequenas manchas escuras, podendo ou não ser circundadas por um

halo amarelado. Nas nervuras e pecíolos aparecem manchas escuras, alongadas e irregulares. Nos ramos, presencia-se a formação de cancrios e rachaduras longitudinais, apresentando fissuras, fendas necróticas e lesões escuras nos cachos (Figura 3) (EMBRAPA, 2003).

Figura 3. Principais sintomas causados pela bactéria *X. citri* em videira. À esquerda órgãos vegetativos, à direita bagas



Fonte: EMBRAPA (2016)

Não existem até o momento fontes definidas de resistência contra o cancro da videira. Todas as cultivares testadas apresentaram alta sensibilidade, diferindo apenas no nível de severidade da doença (Lopes e Nascimento, 2004). Fontes de resistência moderada conhecidas compreendem apenas outras espécies não comerciais de *Vitis* ou seus híbridos, como no caso do IAC-572 resultante do cruzamento dos porta-enxertos 101-14 MGT (também híbrido; *V. riparia* X *V. rupestris*) e *V. caribaea*. Apesar de se tratar de uma das poucas fontes de resistência, o uso do IAC-572 como porta-enxerto não tem impedido a ocorrência do cancro da videira, considerado um problema ainda insolúvel (Nascimento et al., 2006). Dessa forma, um melhor entendimento dos efeitos da interação patogênica entre a uva e a bactéria *X. citri* torna-se de grande interesse, principalmente para auxiliar na melhoria das práticas de manejo agrícola e garantir sucesso em programas de melhoramento genético vegetal.

2.4 PROTEÍNAS RELACIONADAS À PATOGÊNESE

As proteínas PR representam componentes adicionais do arsenal de defesa das plantas e têm sido rotineiramente utilizadas como marcadores da Resistência Sistêmica Adquirida (SAR; *Systemic Acquired Resistance*), a qual é responsável por proteger a planta contra uma ampla gama de patógenos após o contato com organismos patogênicos (MÉTRAUX, 2001; VALLAD *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2010). Tais proteínas formam um grupo heterogêneo e são codificadas por genes que geralmente são induzidos por infecções patogênicas, pelo acúmulo de como ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET), bem como em situações de estresses abióticos ou em associação com determinado estágio de desenvolvimento (NARUSAKA *et al.*, 2009; BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010; WANDERLEY-NOGUEIRA *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2016; MUTAWILA *et al.*, 2017).

As PR classificam-se tradicionalmente em 17 famílias gênicas, formadas por subfamílias ácidas e básicas, localizadas no vacúolo ou nos espaços extracelulares (CUTT e KLESSIG, 1992). A similaridade entre sequências, as relações serológicas ou imunológicas e as propriedades enzimáticas são a base para essa classificação (VAN LOON *et al.*, 2006). Funcionalmente, algumas proteínas PR possuem atividade antifúngica, como as quitinases (PR-3) e as β -glucanases (PR-2) (ZHU *et al.*, 1994), algumas já foram bem caracterizadas e estudadas, como as PR-5 (TLP) e PR-8 (quitinases tipo III), mas outras ainda têm sua função bioquímica desconhecida, como é o caso da PR-1. Em videira, diversos estudos foram desenvolvidos envolvendo proteínas PR (Tabela 3); no entanto, pouco ainda se conhece sobre a participação dessas proteínas na resposta de defesa de cultivares infectadas com patógenos bacterianos, especialmente com *X. citri*.

Tabela 3. Levantamento bibliográfico e classificação das proteínas PR analisadas em *Vitis* spp

Família	Tipo	Função	Referências
PR-1	Desconhecido	Atividade antifúngica	Bertsch <i>et al.</i> , 2003; Li <i>et al.</i> , 2011
PR-2	β -1,3-glucanase	Degradação da calose	Derckel <i>et al.</i> , 1998; Fujimori <i>et al.</i> , 2016
PR-3	Quitinase (tipos I, II, IV, V, VI e VII)	Regulação da síntese de quitina	Busam <i>et al.</i> 1997; Ano <i>et al.</i> , 2003

PR-5	TLP	Atividade antifúngica	Jayasankar <i>et al.</i> , 2003; He <i>et al.</i> , 2017; Yan <i>et al.</i> , 2017
PR-10	Ribonuclease	Catalisa a degradação do RNA	Lebel <i>et al.</i> , 2010; He <i>et al.</i> , 2013
PR-12	Defensina	Atividade antifúngica	Giacomelli <i>et al.</i> , 2012; Nanni <i>et al.</i> , 2013
PR-14	Proteína transportadora de lipídios	Envolvimento na via de sinalização de defesa	Gomès <i>et al.</i> , 2003; Sels <i>et al.</i> , 2008

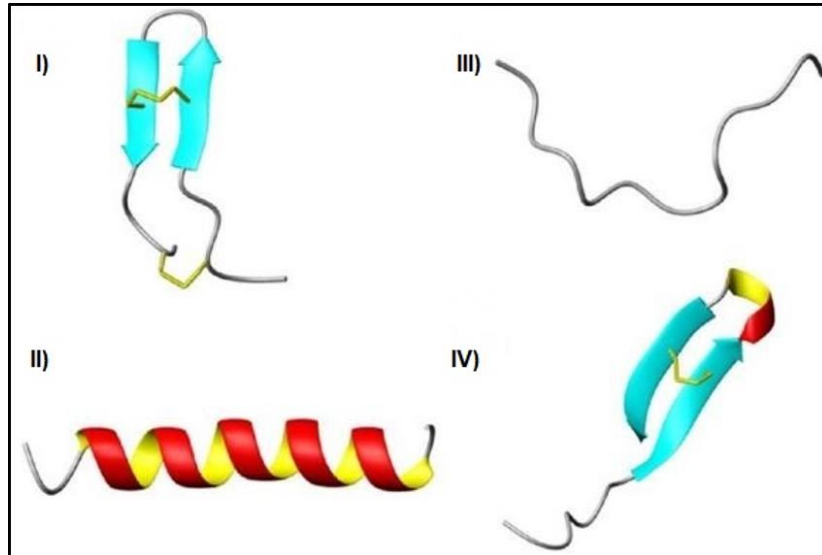
Fonte: A autora

2.5 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM VEGETAIS

As plantas desenvolveram, durante seu processo evolutivo, respostas eficientes de reprogramação da expressão gênica em nível transcricional, pós-transcricional e pós-traducional para diferentes condições de estresses abióticos (seca, salinidade, temperatura, entre outros) e bióticos (causados por bactérias, fungos, vírus e nematoides) (SHUKLA *et al.*, 2008; BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010). Com ampla atividade inibitória a diversos patógenos e considerados elementos da imunidade inata das plantas, os peptídeos antimicrobianos são moléculas de baixo peso molecular, anfipáticas, de carga catiônica, possuindo de 12 a 50 aminoácidos. Geralmente AMPs são ricos em resíduos de cisteína, formando pontes dissulfeto que lhes conferem alta estabilidade (HIGGINS e PAYNE, 1982; REDDY *et al.*, 2004). Tais características proporcionam aos AMPs a habilidade de se inserir às membranas lipídicas dos microrganismos ocasionando a morte do patógeno alvo (BROGDEN, 2005; IZADPHANAH e GALLO, 2005).

Os AMPs são organizados em quatro grupos de acordo com a sua estrutura, sendo portadores de: 1) Folhas β , estabilizadas por pontes dissulfeto; 2) α -hélice, que possui hélices anfipáticas; 3) Peptídeos estendidos, que possuem uma estrutura não convencional devido às hélices estendidas; 4) Peptídeos com estrutura em *loop* (Figura 4) (POWER e HANCOCK, 2003; SEO, 2012).

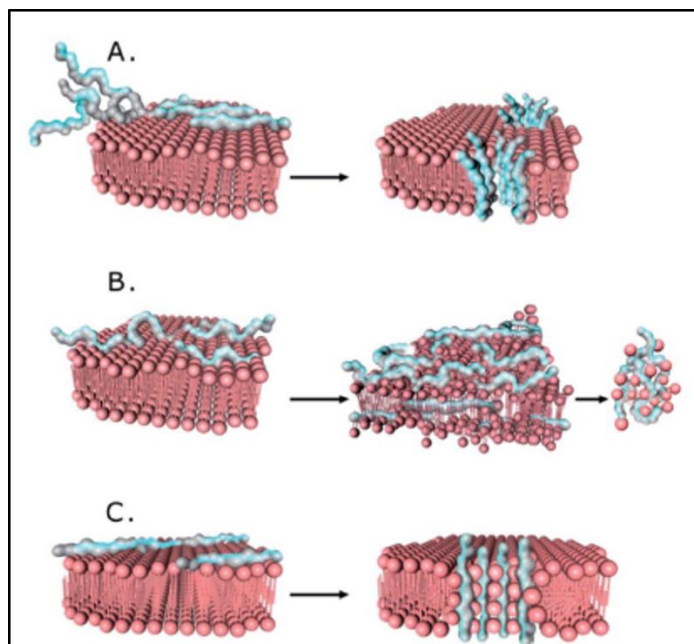
Figura 4. Principais categorias de peptídeos antimicrobianos considerando sua estrutura. I) folhas β ; II) α -hélice; III) peptídeos estendidos; IV) loop



Fonte: POWER e HANCOCK (2003)

De acordo com Brodgen (2005), existem três modelos de mecanismos de ação que justifiquem a ação antimicrobiana destes peptídeos. Todos envolvem interação com a membrana do patógeno, a saber: A) *Canal transmembrana* - canais transmembranares se associam à membrana do patógeno através de feixes anfipáticos de alfa hélice; B) *Modelo tapete* - se baseia na atração eletrostática entre a região catiônica dos peptídeos e a região aniônica dos fosfolipídios, formando assim uma estrutura de tapete sob a membrana do microrganismo; C) *Poro toroidal* - caracterizado pelo dobramento nas monocamadas lipídicas por indução das hélices dos AMP's introduzidos na membrana do microrganismo, com a consequente formação de poros (Figura 5). Para o último modelo, a estrutura específica destes peptídeos é a atração eletrostática inespecífica com elementos aniônicos da membrana lipídica do microrganismo de interesse são os fatores responsáveis pela sua entrada nas células vegetais (BRODGEN 2005; IZADPHANAH e GALLO, 2005). De forma geral, os AMP's geram pequenos poros na membrana que, por meio da permeabilização, irão ocasionar a morte do microrganismo patogênico. Esta interação entre peptídeos e a membrana celular hospedeira promove a inibição da síntese de DNA ou RNA, como também de proteínas (BROGDEN, 2005; IZADPHANAH e GALLO, 2005; AUVYNET e ROSENSTEIN, 2009).

Figura 5. Modelos propostos para o modo de ação AMPs: (A) Canal transmembrana, (B) Modelo tapete e (C) Poro toroidal



Fonte: HERZOG e FRIDMAN (2014)

Peptídeos antimicrobianos têm sido isolados e caracterizados em praticamente todos os reinos e filos. No entanto, sua estrutura e função, bem como seus mecanismos de ação ainda permanecem pouco conhecidos. Além disso, muitos AMPs empregam mecanismos sofisticados e dinâmicos de ação para realizar sua atividade na defesa frente aos patógenos, considera-se que um melhor entendimento de sua ação na defesa de vegetal auxiliará no melhoramento de culturas importantes (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2019). A disponibilidade significativa de sequências de AMPs vegetais em bancos de dados biológicos e o uso de ferramentas computacionais têm contribuído para a identificação destes peptídeos em diversas culturas de importância agrônômica como arroz (ZHU *et al.*, 2006), cana-de-açúcar (SUNDAR *et al.*, 2008; WANDERLEY-NOGUEIRA *et al.*, 2012b), soja (WANDERLEY *et al.*, 2012a; MA *et al.*, 2016), feijão-caupi (WANDERLEY-NOGUEIRA *et al.*, 2010), milho (NOOAN *et al.*, 2017) e videira (BEER *et al.*, 2008).

2.5.1 Defensinas

As defensinas (classificadas entre as PR-12) são peptídeos catiônicos de tamanho pequeno (45 a 54 aminoácidos), massa molecular de 5 KDa, ricos em cisteínas, contendo de duas a quatro pontes dissulfeto e bastante estáveis a variações de temperatura e pH (PELEGRINI e FRANCO, 2005; BROEKAERT *et al.*, 1995). Estas moléculas foram anteriormente denominadas de γ -hortotioninas (MENDEZ *et al.*,

1990) devido à sua semelhança estrutural com as y-tioninas. No entanto, posteriormente foram renomeadas para defensinas levando em consideração o número de estruturas primárias e terciárias bem como as atividades antifúngicas, mais relacionadas às defensinas de insetos e mamíferos do que com as tioninas vegetais. As PR-12 se destacam por possuir uma ampla atividade biológica e participar de diversos processos vegetais, tais como atividade antimicrobiana (antifúngica e antibacteriana), bloqueio de atividades metabólicas, inibição de enzimas hidrolíticas e síntese de proteínas (BROEKAERT *et al.*, 1995; PELEGRINI e FRANCO, 2005; PELEGRINI *et al.*, 2008; CARVALHO e GOMES, 2009).

Assim como diversas outras proteínas relacionadas à defesa de plantas, as defensinas são consideradas peptídeos antimicrobianos com regiões altamente conservadas, presume-se que estas proteínas façam parte de pequenas famílias gênicas, sendo relatadas em plantas, humanos e camundongos (SCHUTTE *et al.*, 2002; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

As PR-12 foram isoladas pela primeira vez em sementes de trigo e cevada (COLILLA *et al.*, 1990; MENDEZ *et al.*, 1990). No entanto, atualmente são encontradas em diversas espécies e tecidos de plantas, como sementes, tubérculos, raízes, inflorescência, flores e folhas, podendo ser também encontradas no parênquima, xilema e estômatos, os quais são considerados porta de entrada para fitopatógenos (LACERDA *et al.*, 2014). Inúmeras defensinas são expressas de modo constitutivo, enquanto outras são reguladas após a infecção ou inoculação por um determinado patógeno. Deste modo, a maioria dos tecidos vegetais pode expressar dois ou mais genes de defensina, de maneira individual ou em circunstâncias e locais específicos (THOMMA e BROEKAERT, 1998; THOMMA *et al.*, 1998).

As defensinas se mantêm conservadas em diferentes organismos, como plantas, vertebrados e invertebrados (LACERDA, 2014). Análises filogenéticas confirmaram a ancestralidade comum destas proteínas em diferentes organismos, desde procariotos a eucariotos, incluindo animais e vegetais. Além disso, já se tem conhecimento sobre a conservação das estruturas primárias, secundárias e terciárias dessas moléculas em diferentes organismos, excluindo a possibilidade de sua possível origem polifilética (ZHU, 2008; CARVALHO e GOMES, 2009).

Sagaram *et al.*, (2011) analisaram o modo de ação e a atividade antifúngica de duas defensinas (MsDef1 e MsDef2) contra *Fusarium graminearum* e verificaram que tais proteínas apresentaram modo de ação e propriedades antifúngicas bastante

diferentes, com MsDef1 induzindo o hiperbranqueamento prolífico das hifas fúngicas enquanto MsDef2 não o faz. Além disso, os autores demonstraram que os motivos do núcleo-y das duas defensinas também diferem significativamente em suas sequências primárias de aminoácidos e em suas cargas negativas, sendo tais motivos os principais determinantes da atividade antifúngica e da morfogenicidade dessas defensinas.

Em *Vitis*.spp, Giacomelli *et al.*, (2012) identificaram e caracterizaram no genoma de videira cerca de 79 sequências semelhantes a defensinas em *V. vinifera*, que correspondem a 46 genes e variantes alélicas, além de 33 pseudogenes e fragmentos de genes. A maioria dos genes foi predominantemente ou exclusivamente expressa em tecidos relacionados com o desenvolvimento da planta. Adicionalmente, cinco defensinas foram induzidas em tecidos infectados com o fungo *Botrytis cinerea*, sugerindo o papel desses genes no processo de defesa contra o patógeno. Resultados semelhantes foram verificados por Nanni *et al.*, (2013) avaliando a expressão da defensina VvAMP2 em diferentes tecidos da cultivar “Pinot noir” de videira inoculada com *B. cinerea*. A validação por RT-qPCR demonstrou que a defensina foi expressa especificamente na inflorescência, com um nível de expressão mais alto no pólen/estame e menor na caliptra e carpelos. Além disso, não foi detectada nenhuma alteração na expressão da VvAMP2 em tecidos vegetativos (folhas, gavinhas, entrenós e raízes).

2.5.2 Tlp

As TLPs (*Thaumatococcus-like protein*) pertencem à família PR-5 e foram isoladas inicialmente do fruto da *Thaumatococcus daniellii*, um arbusto nativo do Oeste Africano (LIU *et al.*, 2010). São polipeptídeos de aproximadamente 207 aminoácidos, com massa molecular de 21 a 26 KDa e com 16 resíduos de cisteína e oito pontes dissulfeto (VELAZHAHAN *et al.*, 1999; BREITENEDER, 2004; LIU *et al.*, 2010). Essas proteínas podem ser ácidas, básicas ou neutras e possuem um peptídeo sinal na região N-terminal, responsável por direcionar a proteína madura para uma via secretora particular (LIU *et al.*, 2010). Tratam-se de proteínas relativamente maiores do que os AMPs (tradicionalmente possuindo de 12 a 50 aminoácidos). Portanto, normalmente não são classificadas nesse grupo, embora se destaquem pela alta conservação de seus resíduos de cisteína (SILVA *et al.*, 2019).

As PR-5 são abundantes no reino vegetal, sendo encontradas em angiospermas, gimnospermas e briófitas (LIU *et al.*, 2010), como também em fungos (GRENIER *et al.*, 2000; SAKAMOTO *et al.*, 2006), insetos (BRANDAZZA *et al.*, 2004) e nematoides (KITAJIMA *et al.*, 1999). TLPs são conhecidas por sua atividade antifúngica, atuando na degradação da parede celular de fungos (BATALIA *et al.*, 1996; SINHA *et al.*, 2014). Estudos recentes reportam que a expressão de TLPs tem sido regulada em condições de estresses abióticos e bióticos (MUNIS *et al.*, 2010; ACHARYA *et al.*, 2013; MISRA *et al.*, 2016; SRIPRIYA *et al.*, 2017), ressaltando seu potencial biotecnológico.

Recentemente, 33 taumatinas foram avaliadas em cultivares de videira (*V. pseudoreticulata*, *V. amurensis* e *V. vinifera*) contrastantes quanto à resistência aos fungos causadores do oídio (*Erysiphe necator*), da antracnose (*Elsinoe ampelina*) e da podridão cinzenta (*Botrytis cinerea*). Os resultados obtidos apontaram para um aumento da expressão destas proteínas após a inoculação com os três patógenos. Além disso, foi verificado que algumas taumatinas também foram superexpressas em plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. DC3000, confirmando sua participação no processo de defesa da videira frente ao ataque de diferentes patógenos (YAN *et al.*, 2017).

He *et al.*, (2017) isolaram e superexpressaram uma taumatina de *Vitis amurensis* (VaTLP) em *Vitis vinifera* visando resistência a doença Downy mildew (DM) causada pelo oomiceto *Plasmopara viticola*. Os autores identificaram uma redução da área de lesão e da quantidade de esporos em folhas infectadas com o patógeno. Análises histológicas também confirmaram a resistência à doença, demonstrando inibição e má formação no desenvolvimento de hifas em tecidos foliares das plantas transgênicas.

2.6 BIOINFORMÁTICA APLICADA ÀS ÔMICAS

A bioinformática compreende um campo interdisciplinar da ciência que trata do desenvolvimento de novas abordagens e ferramentas computacionais visando facilitar a análise, interpretação e processamento de dados biológicos de forma integrada (LESK, 2008). Esta área de estudo pode ser dividida essencialmente em duas grandes vertentes: (1) *Bioinformática clássica* – aborda diversas questões relacionadas a sequências de nucleotídeos e aminoácidos; (2) *Bioinformática estrutural* – abrange

questões biológicas do ponto de vista tridimensional e utiliza técnicas apoiadas pela química computacional ou modelagem molecular (VERLI *et al.*, 2014).

A integração de várias áreas do conhecimento associada a ferramentas computacionais robustas tem possibilitado avanços significativos em estudos relacionados à construção de programas analíticos e sistemas direcionados para a predição de propriedades e comportamentos biológicos, bem como para a manipulação e armazenamento de dados biológicos gerados a partir de grandes quantidades de dados brutos (CATTLEY e ARTHUR, 2007; ARAÚJO *et al.*, 2008; LESK, 2008). O aumento exponencial do emprego de estratégias computacionais no estudo de sistemas biológicos se deu principalmente com o desenvolvimento dos projetos de sequenciamento de genomas e transcriptomas de diferentes organismos, que geraram um volume gigantesco de sequências cujas relações evolutivas e funcionais precisariam ser elucidadas (ARAÚJO *et al.*, 2008; VERLI *et al.*, 2014). Com isso, o uso da bioinformática se tornou fundamental para ordenar os resultados gerados por essas iniciativas, além de abrir novas fronteiras para a aplicação de suas inúmeras ferramentas na era pós-genômica, caracterizada pelo surgimento das ômicas.

As ômicas compreendem uma área recente da Biologia Molecular que integra dados de genes (genômica), transcritos (transcriptômica), proteínas (proteômica), metabólitos celulares (metabolômica) e quinases (quinômica), entre outros, possibilitando entender um organismo em nível sistêmico (SOUZA *et al.*, 2014; BENKO-ISEPPON *et al.*, 2017). Cada uma dessas áreas, com suas características e aplicações específicas, acumulam um volume de dados extremamente elevado e ainda têm muito a agregar ao conhecimento do funcionamento de sistemas biológicos, potencializando tanto aplicações terapêuticas quanto biotecnológicas (VERLI *et al.*, 2014; FACHIN 2017).

2.7 TRANSCRIPTÔMICA E RNA-SEQ

Estudos de transcriptômica visam analisar o conjunto completo de transcritos (mRNAs) de um determinado organismo em situações de análise específicas (células e tecidos em diferentes estágios de desenvolvimento ou em condições de estresse comparativamente a um controle não estressado), revelando genes ativamente expressos. Tal abordagem é fundamental para a identificação de elementos funcionais do genoma, permitindo inferências sobre seu papel nos processos biológicos, a

determinação de padrões de *splicing* e de outras modificações pós-traducionais. Além disso, a partir de transcriptomas com cobertura e réplicas adequadas, é possível quantificar os níveis de expressão de cada transcrito sob as condições analisadas (WANG *et al.*, 2009).

A tecnologia de RNA-Seq (sequenciamento direto de RNA de alta performance) é uma abordagem relativamente recente e que se destaca como uma das ferramentas transcriptômicas mais promissoras. Nesta técnica, cada molécula, com ou sem amplificação, é sequenciada a partir de um método de alto rendimento de forma a obter sequências curtas de uma extremidade (*single-end*) ou em ambas as extremidades (*paired-end*). As sequências obtidas poderão ser alinhadas e montadas utilizando diferentes estratégias, tais como a estratégia baseada em referência (utilizando um genoma de referência), a estratégia *de novo* (que visa encontrar sobreposições entre as leituras) ou uma combinação de ambas as estratégias (KUKURBA, 2015).

O RNA-Seq tem conseguido superar as limitações de outras tecnologias existentes, principalmente por necessitar de quantidades menores de RNA, possibilitar a localização de exons, íntrons e sítios de *splicing alternativo*, permitir a identificação das extremidades 5' e 3' dos genes e detectar genes com baixos níveis de expressão, possuindo uma maior acurácia na quantificação da expressão (MARGUERAT *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009), entre outras vantagens. Por esse motivo, essa técnica vem sendo amplamente empregada em estudos de expressão gênica em diversas culturas agronomicamente importantes, como soja (ZENG *et al.*, 2018), arroz (TONI *et al.*, 2017), milho (LI *et al.*, 2017), cana-de-açúcar (PEREIRA-SANTANA *et al.*, 2017), feijão (O'ROURKE *et al.*, 2014) e *V. vinifera* (SHANGGUAN *et al.*, 2017).

Dados de RNA-Seq associados a ferramentas da bioinformática são atualmente uma das estratégias mais utilizadas para fundamentar modelos de genes, identificar genes diferencialmente expressos e transcritos raros. Além disso, tais dados têm ampliado a compreensão dos mecanismos de interação planta-patógeno, permitindo avanços significativos no desenvolvimento de estratégias moleculares para o aumento da resistência das plantas (MOCHIDA e SHINOZAKI, 2010).

3 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE DEFENSINAS EM *Vitis* SPP. SOB ESTRESSE BIÓTICO

Marianne Firmino de Oliveira¹, Roberta Lane de Oliveira Silva¹, Lethicia Souza Tavares^{1,2}; João Pacífico Bezerra-Neto¹, Flávia Figueira Aburjaile¹, Carlos André dos Santos Silva¹, Nataniel Franklin de Melo³, Ana Maria Benko-Iseppon^{1#}

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

²Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Depto. De Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, Brasil.

#Autor para correspondência:

Ana Maria Benko-Iseppon, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento 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: A videira (*Vitis vinifera*) possui grande representatividade na economia mundial. No entanto, esta espécie vem sofrendo com a influência de condições ambientais adversas, especialmente pelo ataque de patógenos, impactando sobre a produtividade da cultura. Este estudo objetivou analisar a estrutura de genes codificantes de defensinas em *Vitis* spp., inferindo sobre seus padrões de expressão, características estruturais e funcionais. Para tanto, foram geradas bibliotecas de RNA-Seq (Illumina HiSeq2500) usando clones da cultivar 'Red Globe' (considerada susceptível ao cancro bacteriano) e do híbrido IAC-572, resultante do cruzamento entre o porta-enxerto 101-14 MGT (*V. riparia* X *V. rupestris*) com *V. caribaea*. O híbrido resultante é considerado apenas moderadamente resistente ao cancro bacteriano. As coletas foram realizadas em quatro tempos distintos: 90 minutos, 6 horas, 24 horas e 48 horas após a inoculação com a bactéria *Xanthomonas citri* pv. *anacardi* (Xca). Para as análises *in silico*, sequências-sonda de defensinas foram retiradas do banco de dados CAMP e submetidas à ferramenta HMMER visando identificar o AMP de interesse. A análise via HMMER permitiu identificar duas sequências de defensinas, as quais foram posteriormente avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana *in silico*, que indicou que tais sequências possuíam alto potencial antimicrobiano. A modelagem por homologia possibilitou o desenho de modelos tridimensionais para cada defensina avaliada, com as sequências candidatas apresentando 90 % dos resíduos de aminoácidos em regiões energeticamente favoráveis. Foram desenhados cinco pares de *primers* para os transcritos que

codificaram genes de defensina. Desse total, apenas a VvDef2 demonstrou-se eficiente nas amostras de cDNA das duas cultivares de *Vitis*. As análises via PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) confirmaram os resultados da expressão diferencial da RNA-Seq, com VvDef2 mostrando-se reprimida ($\log_2FC=0,49$) no acesso resistente e não significativa no acesso suscetível. Os resultados permitiram obter dados relevantes quanto aos efeitos da interação patogênica entre a videira e *Xca*, além de caracterizar e validar um AMP promissor para uso em programas de melhoramento da cultura.

INTRODUÇÃO

Por serem sésseis, as plantas, necessitam de uma resposta de defesa rápida recorrendo aos peptídeos antimicrobianos (AMPs) (Castro & Fontes et al., 2005; Marcos et al., 2008), entre outras respostas moleculares. Diversos peptídeos antimicrobianos têm sido isolados e caracterizados em praticamente todos os reinos e filos, dentre os principais peptídeos estudados podemos destacar a classe correspondente as defensinas. Tais proteínas possuem cerca de 50 resíduos de aminoácidos, baixo peso molecular e ponto isoelétrico altamente básicos, geralmente ricos em resíduos de cisteína formando pontes dissulfeto que lhes conferem alta estabilidade. Apresentam uma alta atividade inibitória contra bactérias (Andersson et al., 2016), fungos (Ng et al., 2004) e vírus (Jordan et al., 2017), sendo considerados elementos da imunidade inata das plantas. No entanto, sua estrutura e função, bem como mecanismos de ação permanecem em boa parte desconhecidos. Além disso, muitos AMPs empregam mecanismos sofisticados e dinâmicos de ação para realizar sua atividade na defesa frente aos patógenos, considerando-se que um melhor entendimento de sua ação na defesa de vegetal, auxiliando no melhoramento de culturas importantes (Benko-Iseppon et al., 2010; Silva et al., 2019).

A videira (*Vitis* spp.) figura entre as mais importantes espécies frutíferas cultivadas mundialmente. Embora apresente boa produtividade, a cultura da videira tem sofrido com o ataque de agentes patogênicos, demandando esforços de melhoristas e pesquisadores visando minimizar impactos negativos e a necessidade de aplicação de defensivos agrícolas. A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* foi reconhecida como agente causador do cancro bacteriano da videira, doença que ainda ocorre apenas no Brasil e na Índia, a qual é considerada um fator limitante para a produção de uvas de

mesa e vinho no Submédio do Vale do São Francisco. Estudos recentes de sequenciamento genômico dessa bactéria realizados por nosso grupo (Gama et al., 2018; Júnior et al., 2018), resultaram em reposicionamento taxonômico desse patógeno atualmente reconhecido como *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* (doravante designado como *Xca*). Não existem até o momento fontes definidas de resistência contra o cancro da videira. Todas as cultivares testadas apresentaram alta sensibilidade, diferindo apenas no nível de severidade da doença (Lopes e Nascimento, 2004). Fontes de resistência moderada conhecidas compreendem apenas outras espécies não comerciais de *Vitis* ou seus híbridos, como no caso do IAC-572 resultante do cruzamento dos porta-enxertos 101-14 MGT (também híbrido; *V. riparia* e *V. rupestris*) e *V. caribaea*. Apesar de se tratar de uma das poucas fontes de resistência, o uso do IAC-572 como porta-enxerto não tem impedido a ocorrência do cancro da videira, considerado um problema ainda insolúvel (Nascimento et al., 2006).

Dessa forma, o presente estudo visou analisar características estruturais, funcionais e padrões de expressão de defensinas no transcriptoma (RNA-Seq) de acessos de *Vitis* spp. inoculados com *X. citri* pv. *anacardii*, comparativamente a controles-negativos, avaliando o seu papel nessa interação.

METODOLOGIA

Desenho experimental e obtenção do material vegetal

O experimento foi conduzido nos telados da Embrapa Semiárido (Petrolina - Brasil) usando clones das cultivares 'Red Globe' e do híbrido IAC 572 [resultante de um cruzamento entre o porta-enxerto 101-14 MGT (*V. riparia* X *V. rupestris*) e *V. caribaea*]. Enquanto 'Red Globe' é susceptível ao cancro bacteriano da videira (*Xca*), o híbrido porta-enxerto IAC-572 é considerando moderadamente resistente, conforme reportado por Nascimento et al. (2006).

As plantas foram propagadas via estaquia, 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) = 1.5×10^3 μmoles)]. Após 30 dias de cultivo, 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 plantas do grupo controle passaram pelo mesmo tratamento, porém com solução sem presença do inóculo bacteriano. 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 (caso/controle).

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. Amostras de RNA do tempo de 90 minutos foram purificadas e enviadas 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 kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) seguindo instruções do fabricante. A montagem do transcriptoma foi feita pelo programa Trinity (Grabherr *et al.*, 2011) e a análise estatística dos genes diferencialmente expressos através do programa Edge-R (Robinson *et al.*, 2010).

Identificação de sequências de defensinas

Peptídeos disponíveis no banco de dados público CAMP (*Collection of Anti-Microbial Peptides*; www.camp.bicnirrh.res.in/) foram utilizados como sequências-sonda (*seed-sequences*) de defensinas. Os padrões HMM deste banco, juntamente com perfis HMM construídos a partir de alinhamentos de sequências de AMPs obtidas em bancos públicos (GenBank e Uniprot), foram utilizados com o auxílio da ferramenta HMMER, atribuindo um *cut-off* de 0.01, para identificação de possíveis homólogos da

família em questão no transcriptoma de videira por meio dos alinhamentos baseados em modelos probabilísticos. De posse das sequências candidatas, utilizou-se a ferramenta Transdecoder para tradução das sequências, as proteínas geradas foram submetidas ao Batch CD-Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) visando identificar domínios conservados considerados padrão para a classe de defensinas, como o *Gamma-thionin*.

Caracterização dos candidatos à defensinas

O alinhamento das sequências candidatas foi realizado no Jalview (Clamp et al., 2004) visando à identificação de padrões conservados, seguindo-se com a predição do peso molecular e do ponto isoelétrico das sequências pelo JVirGel 2.0 (Hiller et al., 2006). A localização subcelular foi feita com o auxílio do programa Cell-PLoc 2.0 (Chou e Shen et al., 2010). O programa Dianna (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) foi usado para identificar a formação das pontes dissulfeto entre os resíduos de cisteína. A análise da estrutura secundária das defensinas candidatas foi feita através do programa PSIPRED visando identificar estruturas características de defensinas, como a presença de folhas- β e uma α -hélice (McGuffin et al., 2000). Por fim, a predição da atividade antimicrobiana foi realizada por meio do CAMP_{R3}, que utiliza classificadores estatísticos gerados por: *Support Vector Machine* (SVM), *Random Forest Classifier* (RFC) e *Discriminant Analysis Classifier* (DAC) (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php>).

Modelagem de proteínas e análise fenética

A análise tridimensional foi realizada através do programa SWISS-MODEL (Arnold et al., 2006) cujo método compreende modelagem comparativa contra uma estrutura proteica já identificada, gerando modelos para a proteína submetida, de acordo com a sua similaridade. De posse do melhor modelo tridimensional gerado, é possível analisar a qualidade do mesmo, via gráfico de Ramachandran, o qual indica as regiões dos resíduos localizados em regiões energeticamente favoráveis através da ferramenta PROCHECK (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK>). A ferramenta ProSA-Web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) foi utilizada para identificar a qualidade geral do modelo das sequências. Para a análise da relação de similaridade entre as sequências dos genes codificantes de AMPs, sequências de

defensinas foram retiradas do banco de dados *PhytAMP* (<http://phytamp.hammamilab.org/main.php>) e submetidas ao alinhamento do ClustalW. Posteriormente, foram geradas árvores fenéticas utilizando o método de Neighbor-Joining com auxílio do programa MEGA v.7 (Kumar et al., 2016).

Perfil de expressão *in silico* (RNA-Seq)

A expressão diferencial dos dados de RNA-Seq foi baseada na análise dos valores de *Fold Change* (FC) dos transcritos isolados de cada biblioteca/tratamento a partir das análises via EdgeR, sendo considerados diferencialmente expressos aqueles com FC $>+1$ ou <-1 ($p\text{-value} \leq 0.05$). Os transcritos foram submetidos a uma análise de agrupamento hierárquico (*Hierarchical Clustering Analysis*) (Eisen et al., 1998) com o auxílio do programa CLUSTER 3.0 (Read et al., 2001). Para visualização do perfil de expressão gênica, o resultado do CLUSTER foi submetido ao programa Treeview, que permite a visualização do perfil de expressão em forma de *heatmap*.

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

O desenho dos *primers* para RT-qPCR foi realizado utilizando os programas *Primer 3 Plus* (Rozen e Skaletsky, 2000) e *Primer-BLAST* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), seguindo os seguintes parâmetros: conteúdo de GC 50%, tamanho do fragmento entre 70 e 150 pb, temperatura de *Melting* entre 40 e 60° e junção exon-exon. 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. Os genes de interesse (diferencialmente expressos nas condições estudadas) foram validados via RT-qPCR e analisados pelo programa REST (*Relative Expression Software Tool*, v.2.0.13; Pfaffl et al., 2002), utilizando os genes de referência TRU5, TCBP e 60 SRP para a normalização dos resultados de expressão relativa (Tabela 1).

RESULTADOS

Seleção de candidatos e predição de domínios conservados

Os perfis HMM gerados para a busca via HMMER, utilizando a ferramenta *AMP-identifier*, retornaram dados para 89 famílias de AMPs. No entanto, 51 famílias não possuíam transcritos com similaridade relacionada com as sequências de interesse. Das 38 famílias que apresentaram sequências candidatas, a classe defensina foi escolhida, sendo selecionadas apenas sequências que continham *e-value* significativo ($e\text{-value} \leq 0.01$).

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

Gene (Número de acesso)	Fonte*	Função predita	Descrição	Sequência dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Eficiência		
Sus - Res							
Genes-alvo							
VvDef1 (Vit_DN34321_c0_g1)	BrGoc	Atividade antimicrobiana	Defensina 1	(F) CCTTCATTCTGCAGACCAG (R) CCAAGTGAGGCAAGAGTCTG	N/A 196,0%	-	
VvDef2 (Vit_DN40930_c0_g1_i1)	BrGoc	Atividade antimicrobiana	Defensina 2	(F) AGTTGCTCTGCCTGACACAC (R) GCAAAAGATGAAGGGCTCTC	90,3% 104,4%	-	
Genes de referência							
TCBP (XM_002285876)	González-Agüero <i>et al.</i> (2013)	-	Proteína 1 subunidade β do complexo	(F) AGACAGTGATTGACAGCCGAGTT (R) ATCCCTGCGTGGCTTTCTTCC	90,2%	-	91,6%
TRU5 (XM_002283586)	Tashiro <i>et al.</i> (2016)	<i>Splicing</i> , transcrição	Tiorredoxina U5 snRNP	(F) CAATGTACGAGCTTTATGACCCATC (R) CAGTTGATCTTGTTGTTGTTTCCAG	88,9%	-	95,3%
60SRP (XM_002270599.1)	Moteiro <i>et al.</i> (2016)	Componente estrutural do ribossomo, tradução	Proteína L18 do RNA ribossomal 60 S	(F) ATCTACCTCAAGCTCCTAGTC (R) CAATCTTGTCCTCCTTTCCT	90,7%	-	91,0%

*Database BrGOC (*Brazilian Grape Omics Consortium*). Fonte: Autor (2019).

O grupo das defensinas apresentou duas candidatas com domínio *Gamma-thionin* conservado. No alinhamento realizado, foi possível visualizar as regiões conservadas, como por exemplo, na presença dos resíduos de cisteína conservados, característicos do grupo, observando-se grande conservação, como destacado pelas barras amarelas (Figura 1).

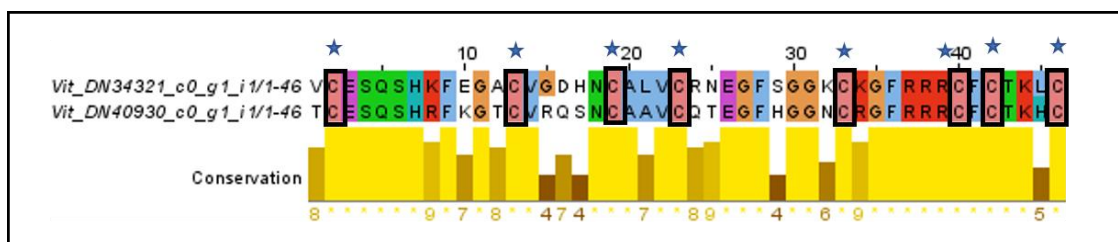


Figura 1. Alinhamento das defensinas com presença de resíduos de cisteína, respectivamente representado pela (★). Fonte: Autor (2019).

Propriedades físico-químicas

Com relação à localização subcelular, as defensinas localizaram-se no meio extracelular e no vacúolo, como representado na Tabela 2. No que se refere ao peso molecular (pM) e ao ponto isoelétrico (pI) as candidatas apresentaram-se básicas, com pI em torno de oito e pM próximo de 5.

Tabela 2. Localização subcelular, ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (pM) das defensinas

Gene	ID dos transcritos	Localização Subcelular	pI/pM
VvDef1	Vit_DN34321_c0_g1_i1	Extracelular	8,35 – 5,07
VvDef2	Vit_DN40930_c0_g1_i1	Vacúolo	8,75 – 5,19

Fonte: Autor (2019).

Predição da Atividade Antimicrobiana

Com o CAMP_{R3} foi possível prever a atividade antimicrobiana das defensinas a partir de três parâmetros estatísticos (SVM, RFC e DAC). As defensinas analisadas apresentaram valores variando de 0.8165 até 0.999, com 100 % das predições ≥ 0.9 , indicando significativa atividade antimicrobiana (Tabela 3).

Tabela 3. Potencial antimicrobiano de defensinas obtidas no CAMP_{R3}

Gene	SVM	RFC	DAC
VvDef1	0.971	0.833	0.999
VvDef2	0.906	0.8165	0.993

SVM: *Support Vector Machine*; RFC: *Random Forest Classifier*; DAC: *Discriminant Analysis Classifier*. Fonte: Autor (2019).

Predição de ligações dissulfeto, estrutura secundária e terciária

Quanto à estabilidade por meio de pontes dissulfeto a partir de resíduos de cisteínas, as duas sequências candidatas a defensinas apresentaram quatro ligações dissulfeto (Figura 2).

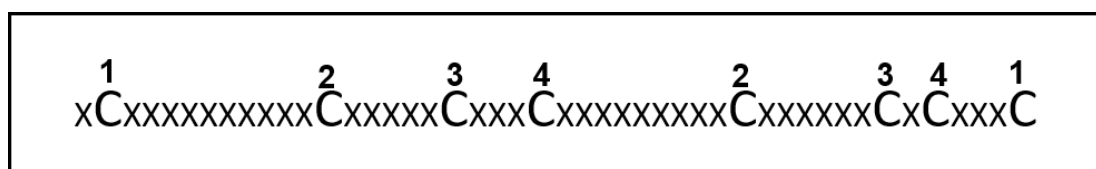


Figura 2. Pontes dissulfeto considerando sequência consenso das defensinas candidatas em *Vitis* spp. Fonte: Autor (2019).

A conformação secundária predita pelo software PSIPRED, mostrou que a estrutura das sequências compõe-se de três folhas- β e uma α -hélice (Figura 3).

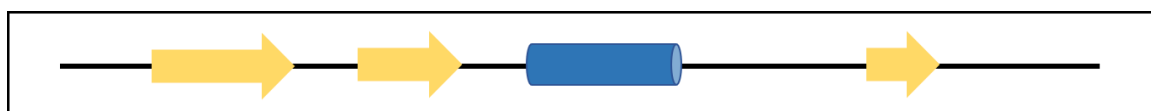


Figura 3. Modelo esquemático das estruturas secundárias das defensinas em *Vitis* spp. Fonte: Autor (2019).

Para modelagem por homologia, foram gerados três modelos tridimensionais para cada sequência candidata visando obter o melhor modelo de cada sequência (Figura 4).

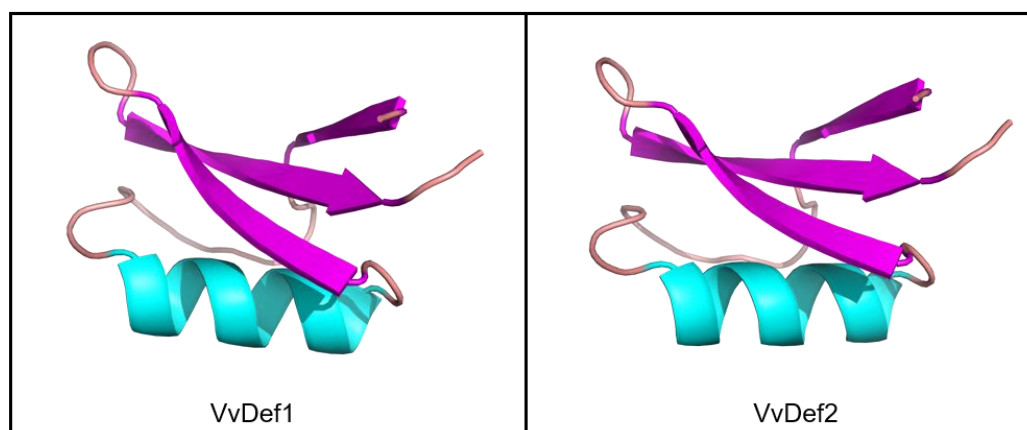


Figura 4. Estrutura 3D modelada por homologia para duas defensinas de *Vitis* spp; Fonte: Autor (2019).

Foram considerados como critério de escolha, a análise da identidade e a cobertura e similaridade dos modelos gerados. Quanto ao gráfico de Ramachandran, levou-se em consideração a maior porcentagem dos resíduos de aminoácidos presentes na região mais favorável e na região permitida. O transcrito VvDef1 apresentou 97 % dos seus resíduos nas regiões favoráveis, enquanto o transcrito VvDef2 obteve 95 %, conforme representado na Tabela 4.

Tabela 4. Valores obtidos no Swiss-Model e Procheck para a avaliação de qualidade dos modelos tridimensionais gerados para as defensinas de *Vitis* spp.

Família	Gene	(aa)	Identidade	GMQE	QMEAN	Zscore	Ramachandran*			
							RMF	RPA	RGP	RNP
Defensina	VvDef1	46	39,13%	0,77	-0,65	-7,3	97,4%	2,6%	0,0%	0,0%
	VvDef2	46	39,13%	0,75	-0,46	-7,5	94,9%	5,1%	0,0%	0,0%

GMQE: Estimativa Global de Qualidade do Modelo; QMEAN: Análise de Energia Modelo Qualitativa; Zscore: Qualidade geral do modelo; (*) RMF: Região Mais Favorável; RPA: Região Permitida Adicional; RGP: Região Generosamente Permitida; RNP: Região Não Permitida. Fonte: Autor (2019).

Análise de fenogramas

O dendrograma gerado pela análise de Neighbor Joining (NJ) para as defensinas de *Vitis* spp. (Figura 5) incluiu todas as defensinas previamente descritas no banco de dados *PhytAMP*. A árvore de NJ apresentou três grupamentos. As sequências do grupo I correspondem às famílias Poaceae e Brassicaceae. O segundo grupamento compreendeu além da família Poaceae, as famílias Solanaceae, Brassicaceae, Asteraceae, Fabaceae e Vitaceae, incluindo as duas defensinas aqui

identificadas. O gene VvDef1 mostrou-se similar com a espécie *Petunia integrifolia*, emergindo um *bootstrap* de 81 %. Por sua vez, o gene VvDef2, apresentou um *bootstrap* de 96 % com a espécie *Vigna unguiculata*, indicando alta similaridade.

As sequências alocadas no grupo III foram compostas pelas famílias Amaranthaceae, Brassicaceae, Fabaceae, Solanaceae, Sapindaceae e Poaceae, estando esta última família presente em todos os grupamentos. Cada grupo identificado compartilha um grau de similaridade e consequentemente o mesmo padrão de conservação.

Visando avaliar o padrão de conservação e compreender as diferenças de cada grupo, os ramos foram alinhados separadamente (Figura S1). No grupo I, as monocotiledôneas compartilham de vários aminoácidos como: cisteína (C), arginina (R), serina (S), fenilalanina (F), lisina (K), glicina (G), asparagina (N), alanina (A), valina (V), ácido glutâmico (E) e ácido aspártico (D). Por sua vez o grupamento II compõe seis tipos de aminoácidos diferentes, entre eles a cisteína (C), serina (S), fenilalanina (F), glicina (G), valina (V) e ácido glutâmico (E). Já o grupo III, apenas dois resíduos apresentaram-se conservados, sendo eles, cisteína (C) e glicina (G).

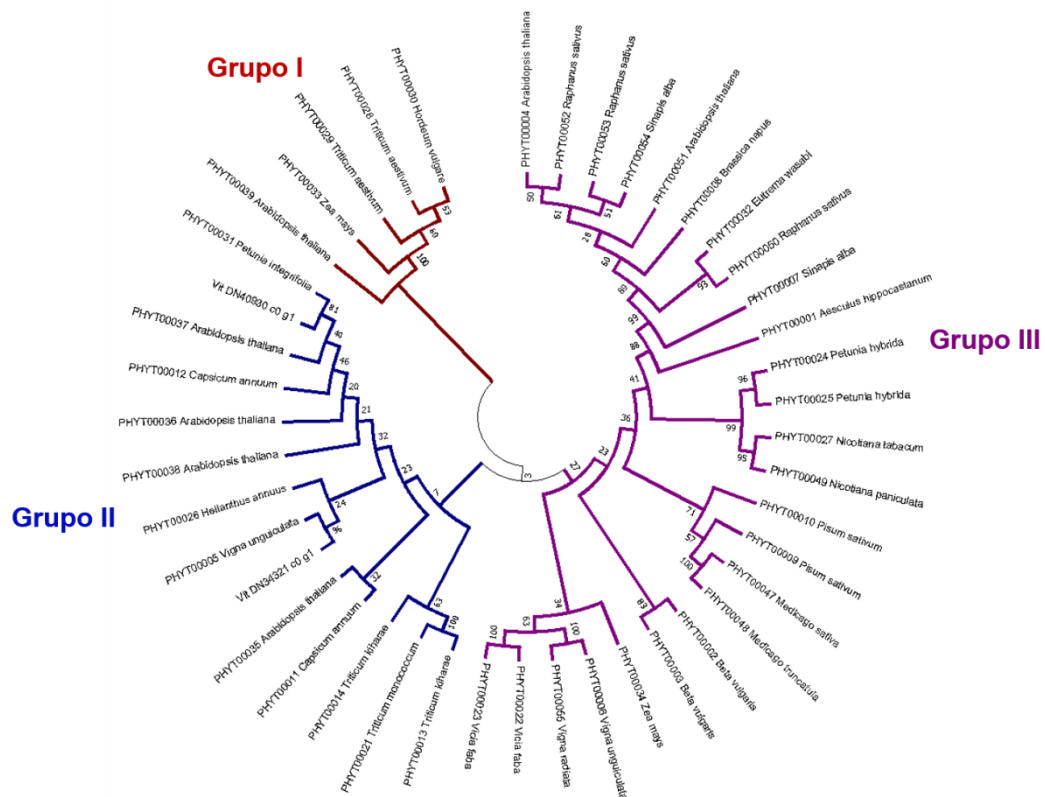


Figura 5. Fenograma das duas candidatas à defensina de *Vitis* spp. utilizando sequências de defensinas disponíveis no banco de dados *PhytAMP*. As proteínas são representadas por seus códigos de acesso seguido da espécie vegetal. Fonte: Autor (2019).

Perfil de expressão *in silico*

Para construção dos *heatmaps* foram considerados os valores de expressão diferencial das bibliotecas de RNA-Seq. O transcrito VvDef1 foi identificado como induzido ($\log_2FC=8.06$) na cultivar susceptível e não significativo na resistente. Por sua vez, o transcrito VvDef2 apresentou-se não significativo na cultivar susceptível e reprimido ($\log_2FC=0.90$) na cultivar resistente (Figura 6).

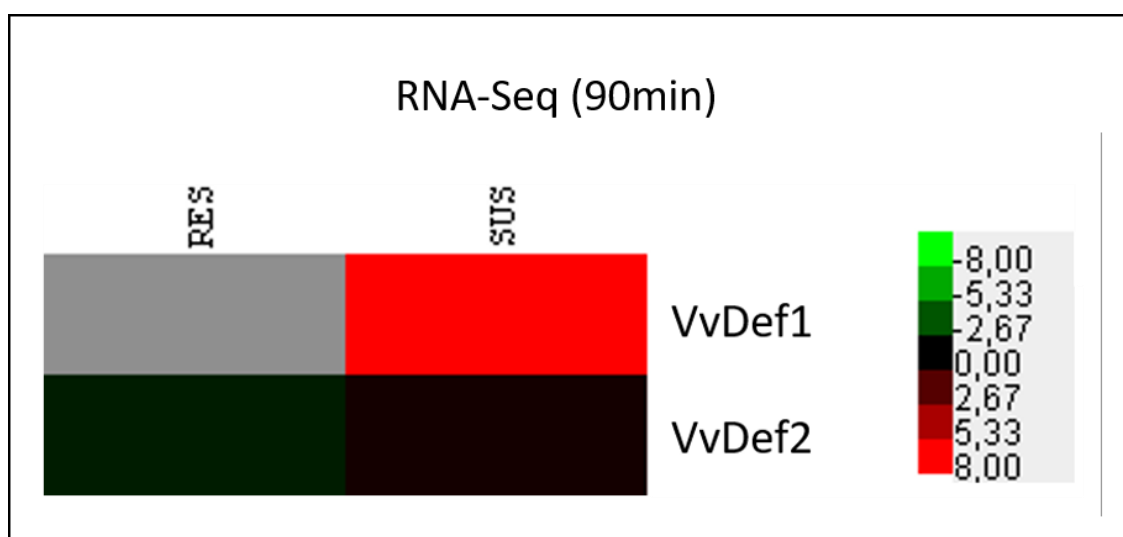


Figura 6. Perfil de expressão *in silico* das defensinas em dois genótipos de *Vitis* contrastantes quanto à resistência contra *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, com base em dados de RNA-Seq. A escala de cores representa os níveis de expressão relativa, com vermelho indicando indução e verde repressão dos transcritos. Fonte: Autor (2019).

Validação dos genes através da RT-qPCR

Foram desenhados cinco pares de *primers* para cada transcrito que codificaram genes de defensinas tendo como base os contigs de RNA-Seq e os dados de expressão diferencial. Desses, um par de *primer* (DEF 2) mostrou-se eficiente nas amostras de cDNA das duas cultivares de *Vitis* inoculadas com *Xca* em diferentes tempos de estresse (90 minutos, 24 horas e 48 horas) ou em seus controles (sem inoculação). Os genes de referência TRU5, TCBP e 60 SRP foram utilizados para a normalização dos dados de expressão relativa.

Considerando-se os dados de expressão diferencial por RNA-Seq, o gene VvDef2 (Vit_DN40930_c0_g1_i1) apresentou-se reprimido ($\log_2FC=0.90$) na cultivar IAC-572 (resistente) e não significativo na cultivar Red Globe (susceptível) com 90 minutos de estresse, em relação aos seus controles (Figura7; Tabela 5). A análise de

expressão relativa via RT-qPCR validou os dados do RNA-Seq para as duas cultivares avaliadas, uma vez que esse transcrito apresentou repressão ($\log_2FC=0,49$) no acesso resistente e foi não significativo no susceptível, quando comparado aos seus controles não inoculados (Figura 7; Tabela 5), indicando que a cultivar resistente responde à situação de estresse precocemente. Após 24 horas de estresse, o mesmo padrão foi observado em ambas as cultivares, com o acesso resistente se mantendo reprimido ($\log_2FC=0,10$) enquanto que o acesso susceptível continuou sem alterar a sua expressão. Com 48 horas de inoculação, os níveis de expressão não foram significativos nos dois acessos.

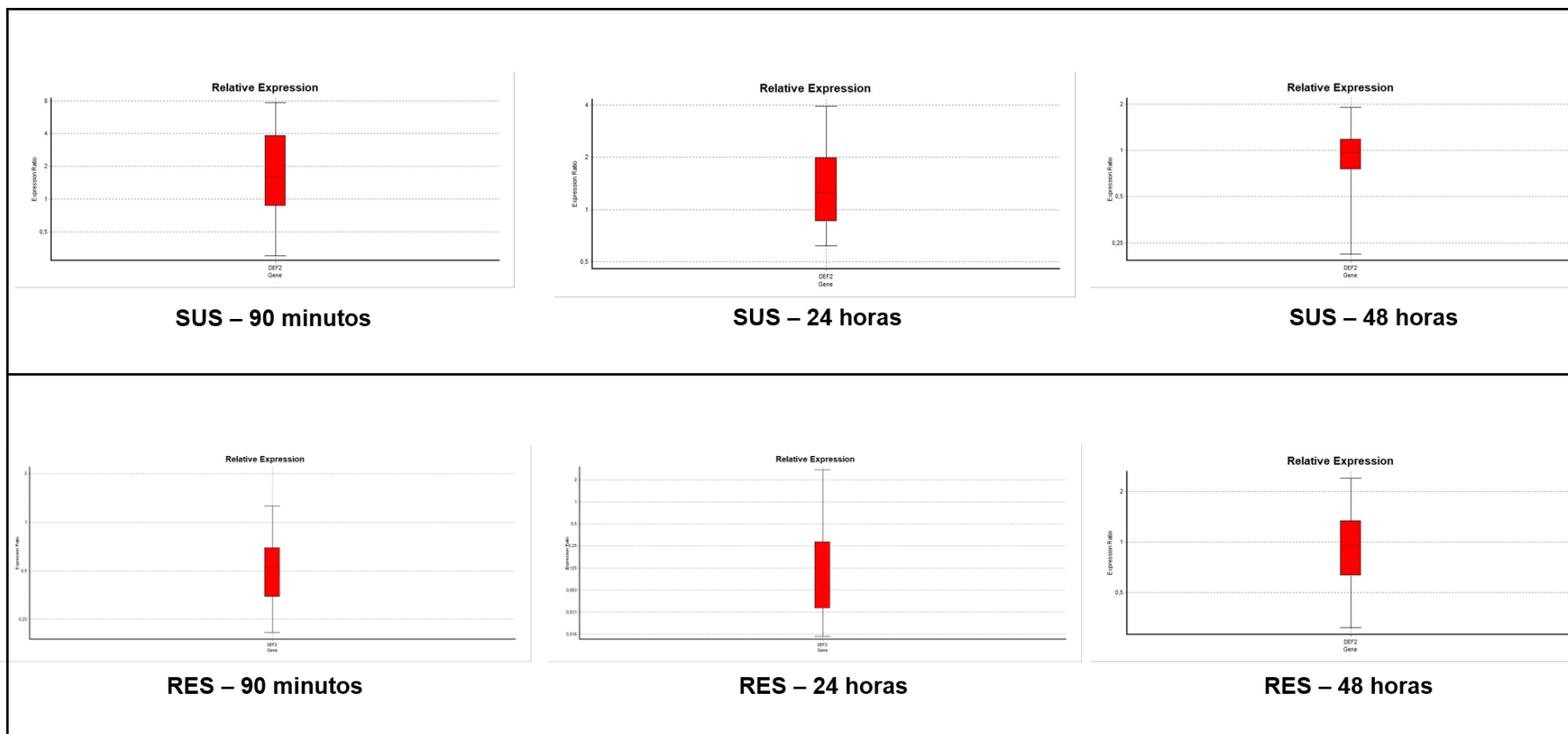


Figura 7. Expressão relativa do transcrito candidato a Defensina (DEF 2 - Vit_DN40930_c0_g1_i1) após 90 minutos, 24 horas e 48 horas de inoculação com a bactéria *X. citri* pv. *anacardi*, comparativamente aos controles não inoculados. Fonte: Autor (2019).

Tabela 5. Expressão relativa via RT-qPCR de VvDef2 (Vit_DN40930_c0_g1_i1) em duas cultivares de videira após 90 minutos, 24 horas e 48 horas de inoculação 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
Vit_DN40930_c0_g1_i1	VvDef2	0,90/DR	N.S.	0,49/DR	N.S.	0,10/DR	N.S.	N.S.	N.S.

Fonte: Autor (2019).

DISCUSSÃO

Seleção de candidatos e predição de domínios conservados

Os peptídeos antimicrobianos têm papel importante no sistema imune inato, desempenhando proteção contra infecções bacterianas e fúngicas (Kumar et al., 2018). Anteriormente conhecidas como γ -tioninas, as defensinas possuem em seu domínio grande importância para determinação da atividade funcional, bem como a presença de aminoácidos básicos específicos como lisina e arginina, como previamente reportado por Pelegrini et al. (2005). Os peptídeos antimicrobianos possuem características específicas que são comuns a estas proteínas, como, por exemplo, a presença de cisteínas em números pares, em geral compondo oito resíduos altamente conservados, no qual formam quatro pontes dissulfeto, com a presença dessas regiões a identificação por meio do alinhamento torna-se mais fácil. Liu et al. (2017) utilizaram em suas análises um método semelhante para a identificação de defensinas em peptídeos ricos em cisteína e obtiveram um total de 4210 sequências de diferentes espécies como *Fragaria vesca*, *Populus trichocarpa*, *Glycine max*, *Prunus persica* e *Vitis vinifera*. Por sua vez, Rigano et al. (2012) identificando defensinas no genoma de *Solanum lycopersicum* conseguiram recuperar 57 peptídeos da classe defensina vegetal.

No presente trabalho, foram identificadas duas defensinas contendo o domínio *Gamma-thionin*, as quais apresentaram características semelhantes às documentadas em peptídeos que dispõem de atividade antimicrobiana (De Oliveira et al., 2009). No entanto, esse número não corresponde ao encontrado em outras espécies. Isso pode ser justificado pelo modelo utilizado como sonda no HMMER, o qual necessita ser incrementado para caracterizar de forma mais abrangente este grupo de AMP visando à identificação e caracterização de novas defensinas no transcriptoma de videira.

Localização subcelular e propriedades físico-químicas

Segundo Terras et al. (1995), as defensinas vegetais têm função de proteger os tecidos da planta durante os primeiros estágios emergenciais de ataques patogênicos. Em plantas, os AMPs são altamente expressos em sementes e tecidos reprodutivos (Lay et al., 2003). Tal fato pôde ser identificado por Games et al. (2008) utilizando sementes de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com patógenos fúngicos, visando o isolamento, caracterização e obtenção de cDNA codificante para defensina

em *P. vulgaris*, onde o grupo identificou o gene denominado PvD1, o qual apresentou atividade antifúngica na situação de análise.

Diversos estudos foram realizados com defensinas utilizando diferentes tecidos e espécies. Cui et al. (2018), por exemplo, avaliaram a expressão das defensinas SlyDF1 e SlyDF2 em raízes, caules, folhas, flores e frutos de *Solanum lycopersicum* infectado por *Phytophthora infestans* e verificaram a indução das duas defensinas em todos os tecidos analisados.

Quanto a sua localização subcelular, os AMPs já foram identificados tanto no vacúolo, como verificado por Lay et al. (2003) utilizando defensina isolada das espécies *Nicotiana glauca* e *Petunia hybrid*, como no meio extracelular, conforme relatado por Jha et al. (2009) ao isolar defensinas em folhas e raízes de *Oryza sativa*. Em nossa análise, as duas defensinas apresentaram-se nas duas regiões reportadas anteriormente na literatura.

Referente ao PI e ao PM, os AMPs são proteínas com características altamente básicas, catiônicas, de massa molecular pequena, variando de 5 a 80 Kda (Stangarlin et al., 2011; Niu et al., 2018). Os dados obtidos para as defensinas avaliadas em nosso estudo assemelham-se ao relatado em outros estudos envolvendo essa família de AMPs, o que garante confiabilidade aos nossos resultados.

Predição da atividade antimicrobiana e modelagem estrutural

A partir da predição da atividade dos AMPs, por meio do CAMP_{R3}, foi possível inferir sobre a atividade antimicrobiana com base em três testes estatísticos SVM, RFC e DAC. Atualmente, o banco de dados conta com cerca de 10.247 sequências de peptídeos, sendo 4857 validados experimentalmente e 5390 previstos, além de cerca de 114 assinaturas de sequências específicas de AMPs. Devido a robustez de dados, o CAMP_{R3} possibilita informações abrangentes acerca desses peptídeos confiabilizando os dados submetidos a esta ferramenta (Waghu et al., 2015).

Os testes estatísticos utilizados por essa ferramenta apresentam um método de precisão de 87 a 93 % como observado em estudo realizado por Thomas et al (2009), que identificaram sequências de peptídeos envolvidas em processos de atividade antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, antiparasitária, antivirais e antitumorais coletadas do banco de dados NCBI, demonstrando a sensibilidade e especificidade dos algoritmos utilizados nas análises. No tocante a estrutura secundária, as duas candidatas a defensinas apresentaram três folhas- β e

uma α -hélice em sua conformação, similarmente ao observado por Ermakova et al. (2016) e Parisi et al. (2018) em *Pinus sylvestris* e *Nicotina alata*, respectivamente.

A qualidade dos modelos estruturais gerados para as duas defensinas do nosso estudo apresentou mais de 90 % dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis ou permitidas. O PROCHECK viabiliza o gráfico de Ramachandran, que fornece de maneira detalhada a estereoquímica da estrutura proteica e avalia a qualidade do arranjo estrutural, considerando-se como um bom resultado estruturas que apresentem 90 % dos seus resíduos em regiões favoráveis ou permitidas (Laskowski et al., 1993).

Almeida et al. (2002) obtiveram resultado semelhante ao avaliar 100 estruturas de defensinas isoladas de sementes de *Pisum sativum* através de dinâmica molecular. Os autores verificaram que do total de estruturas analisadas, apenas 20 apresentaram baixo rendimento, sendo submetidas a uma etapa de rendimento por meio do PROCHECK que identificou que tais estruturas apresentaram 99 % dos seus resíduos em regiões permitidas, semelhantemente ao verificado em nosso estudo.

Análise fenética

Em nosso estudo, o dendograma gerado dividiu-se em três grupos, com as duas defensinas presentes no grupo II, próximo a *Petunia integrifolia* e *Vigna unguiculata*. De acordo com Carvalho & Gomes et al. (2009), é improvável que esta família apresente diversos subgrupos devido a conservação de suas estruturas primárias, secundárias e terciárias. Em análise realizada por Gachomo et al. (2012) envolvendo a conservação evolutiva de defensinas em *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Gymnadenia conopsea* e *Raphanus sativus* foi observado que a topologia da árvore abrange três clados distintos e forma grupos subdivididos, nos quais tal divisão ocorre devido às características da sequência das proteínas que compartilham de alguns resíduos de aminoácidos, como também por possíveis diversificações.

Em geral, sequências de defensinas são compostas por um pequeno número de aminoácidos, cisteína (C), glicina (G), serina (S) e um resíduo aromático de fenilalanina (F). Em nosso trabalho, a topologia analisada possui semelhança com a verificada por Gachomo et al. (2012), sendo possível identificar três grupos distintos. O entendimento de características estruturais e funcionais é crucial para compreender a relação da classe defensina em diferentes espécies. Carvalho et al. (2006) isolaram uma defensina de *Vigna unguiculata*, que agrupou com *P. sativum* e *V. unguiculata*,

indicando que tais defensinas podem compartilhar de uma origem evolutiva comum, sendo observado características estruturais conservadas entre as sequências analisadas, bem como homologia de aminoácidos. Deste modo, sugere-se que o agrupamento está intimamente ligado ao padrão de conservação de cada sequência, na qual cada aminoácido apresenta uma função específica, possuindo, portanto, importância direta na diversificação de cada família.

Validação dos genes de interesse via RT-qPCR

O papel das defensinas na proteção de tecidos vegetais em situações de estresse biótico tem sido descrito em diversos estudos (Terras et al., 1995; Thomma e Broekaert et al., 1998; Beer e Vivier et al., 2008; Stotz et al., 2009; Weerawanich et al., 2018). No entanto, tais genes podem apresentar padrões de expressão distintos a depender do material vegetal ou do estágio de desenvolvimento utilizado no ensaio experimental. Beer e Vivier et al. (2008) demonstraram que a expressão do peptídeo *Vv-AMP1* (homólogo à defensinas vegetais) não foi alterada em tecidos foliares de *Vitis vinifera* sob condições de estresse abiótico (osmótico e hormonal) e biótico (infecção com *Botrytis cinerea*), sendo induzida especificamente em estádios de maturação das bagas em plantas sob condições normais. Por sua vez, Weerawanich et al. (2018) relataram a indução de duas defensinas (*DEF7* e *DEF8*) em resposta à infecção por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* em tecidos foliares de arroz (*Oryza sativa*). Em contraste, Thomma e Broekaert (1998) verificaram que as defensinas PDF1.2 e PDF2.2 exibiram regulação distinta em folhas de *Arabidopsis thaliana* após 72 horas de inoculação com o fungo *Alternaria brassicicola*. Os resultados das análises de RT-PCR indicaram que a defensina PDF1.2 foi fortemente induzida após infecção com o patógeno ao passo que a PDF2.2 teve sua expressão reprimida na mesma condição. Os autores sugeriram que a repressão da PDF2.2 pode estar associada a supressores específicos secretados pelo patógeno para quebrar barreiras constitutivamente expressas da defensina, a primeira linha de defesa da planta. Em nosso estudo, a expressão do gene *VvDef2* foi regulado negativamente na cultivar resistente, com 90 minutos e 24 horas após a inoculação com *X. citri*, sendo não significativa na cultivar susceptível, o que sugere a percepção e possível atuação da cultivar resistente na resposta de defesa da planta frente ao patógeno.

CONCLUSÃO

O presente trabalho forneceu resultados importantes para o entendimento da interação de *Vitis* spp. e a bactéria *X. citri* e a participação de peptídeos antimicrobianos da classe defensina nesse processo, sendo possível caracterizar e validar uma defensina (VvDef2) que posteriormente poderá ser aplicada em abordagens biotecnológicas ou no melhoramento genético da videira.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de apoio à pesquisa, CNPq e CAPES, a rede InterSys e ao programa Biologia Computacional pelas bolsas concedidas e auxílio pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Almeida, M.S., Cabral, K.M.S., Kurtenbach, E., Almeida, F.C.L. and Valente, A.P. (2002). Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *J Mol Biol*, 315: 749-757.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2), 195-201.
- Benko-Iseppon, Ana. Maria., Lins Galdino, Suely., Calsa Junior, Tercilio., Akio Kido, Ederson., Tossi, Alessandro., Carlos Belarmino, Luis., and Crovella, Sergio. (2010). Overview on plant antimicrobial peptides. *Current protein & peptide science*, v.11, n.3, p. 1-8, Jan,2010.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., and Vandesompele, J. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622.
- Carlos André dos Santos Silva; Marx Oliveira de Lima; Lívia Maria Batista Vilela; João Pacifico Bezerra-Neto; José Ribamar Ferreira-Neto; José Diogo Cavalcanti Ferreira; Roberta Lane de Oliveira-Silva; Carolline de Jesús Pires; Flávia Figueira Aburjaile; Marianne Firmino de Oliveira; Ederson Akio Kido; Ana Maria Benko-Iseppon (2019). Plant antimicrobial peptides: state of art and perspectives in the omics era. *Curr. Prot. Pept. Sci.* In Press.

- Carvalho, A. O., Ferreira, B. S., Branco, A. T., Okorokova-Facanha, A. L., and Gomes, V. M. (2006). Cloning and characterization of a cDNA encoding a cowpea seed defensin and analysis of its expression. *Protein and peptide letters*, 13(10), 1029-1036.
- Carvalho, A., and Gomes, V. M. (2009). Plant defensins - prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30(5), 1007-1020.
- Castro, M.S. and Fontes, W. (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett*, 12(1): 13-18.
- Cui, J., Jiang, N., Meng, J., Hou, X., Yang, G., and Luan, Y. (2018). Identification and characterization of defensin genes conferring *Phytophthora infestans* resistance in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103, 28-35.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M., and Barton, G. J. (2004). The jalview java alignment editor. *Bioinformatics*, 20(3), 426-427.
- Chou, K. C., and Shen, H. B. (2010). Cell-PLoc 2.0: An improved package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *development*, 109, 1091.
- De Beer, A., and Vivier, M. A. (2008). Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity. *BMC plant biology*, 8(1), 75.
- De Oliveira Carvalho, A., and Gomes, V. M. (2009). Plant defensins—prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30(5), 1007-1020.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(25), 14863-14868.
- Ermakova, E. A., Faizullin, D. A., Idiyatullin, B. Z., Khairutdinov, B. I., Mukhamedova, L. N., Tarasova, N. B., and Zuev, Y. F. (2016). Structure of Scots pine defensin 1 by spectroscopic methods and computational modeling. *International journal of biological macromolecules*, 84, 142-152.
- Gachomo, E. W., Jimenez-Lopez, J. C., Kayodé, A. P. P., Baba-Moussa, L., & Kotchoni, S. O. (2012). Structural characterization of plant defensin protein superfamily. *Molecular biology reports*, 39(4), 4461-4469.

- Gama, M. A., Mariano, R. L., Viana, F. M., Ferreira, M. A., and Souza, E. B. (2011). Polyphasic characterization of pigmented strains of *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. *Plant disease*, 95(7), 793-802.
- Gama, M. A. S. *et al.* Taxonomic Repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and Emendation of the Description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to Include Pigmented Isolates Pathogenic to Cashew Plant. *Phytopathology* (2018).
- Games, P. D., dos Santos, I. S., Mello, É. O., Diz, M. S., Carvalho, A. O., de Souza-Filho, G. A., and Gomes, V. M. (2008). Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. *Peptides*, 29(12), 2090-2100.
- González-Agüero, M., García-Rojas, M., Di Genova, A., Correa, J., Maass, A., Orellana, A., and Hinrichsen, P. (2013). 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*, 14(1), 878.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., and Chen, Z. (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology*, 29(7), 644.
- Hiller, K., Grote, A., Maneck, M., Münch, R., and Jahn, D. (2006). JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. *Bioinformatics*, 22(19), 2441-2443.
- Jordan, T. X., and Randall, G. (2017). Dengue virus activates the AMP kinase-mTOR axis to stimulate a proviral lipophagy. *Journal of virology*, JVI-02020.
- Junior, W. J. S., Farias, A. R. G., Lima, N. B., Benko-Iseppon, A. M., Aburjaile, F., Balbino, V. Q., and Souza, E. B. (2018). Complete Genome Sequence of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* Strain IBSBF2579 from Brazil. *Genome announcements*, 6(5), e01574-17.

- Jha, S., Tank, H. G., Prasad, B. D., and Chattoo, B. B. (2009). Expression of Dm-AMP1 in rice confers resistance to *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. *Transgenic research*, 18(1), 59-69.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. and Straus, S. (2018). Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8 (1), 4
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26(2), 283-291.
- Lay, F. T., Brugliera, F., and Anderson, M. A. (2003). Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant physiology*, 131(3), 1283-1293.
- Liu, X., Zhang, H., Jiao, H., Li, L., Qiao, X., Fabrice, M. R., and Zhang, S. (2017). Expansion and evolutionary patterns of cysteine-rich peptides in plants. *BMC genomics*, 18(1), 610.
- Lopes, D.B. and Nascimento, A.R.P. Uva: Risco duplo. Cultivar HF 27:26-27. 2004.
- Marcos, J. F., Muñoz, A., Pérez-Payá, E., Misra, S., and López-García, B. (2008). Identification and rational design of novel antimicrobial peptides for plant protection. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 273-301.
- McGuffin, L. J., Bryson, K., and Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16(4), 404-405.
- Monteiro, F., Sebastiana, M., Pais, M. S., and Figueiredo, A. (2013). Reference gene selection and validation for the early responses to downy mildew infection in susceptible and resistant *Vitis vinifera* cultivars. *PloS one*, 8(9), e72998.
- Nascimento, A. R. P., Michereff, S. J., Mariano, R. D. L. R., and Viana, I. D. O. (2006). Reaction of grapevine clones to *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, based on epidemiological components of bacterial canker. *Ciência Rural*, 36(1), 1-7.

Ng, T. B. (2004). Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 25(6), 1055-1073.

Niu, X., Xu, Q., Wang, W., Yu, Z., Liu, Z., Qu, C., and Song, L. (2018). The antifungal activity of a thaumatin-like protein from oyster *Crassostrea gigas*. *ISJ-INVERTEBRATE SURVIVAL JOURNAL*, 15, 210-222.

Parisi, K., Shafee, T. M., Quimbar, P., van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., and Anderson, M. A. (2018, February). The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. In *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press.

Pelegrini, P. B., and Franco, O. L. (2005). Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(11), 2239-2253.

Penninckx, I.A.M.A., Eggermont, K., Terras, F.R.G., Thomma, B.P.H.J., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J.P., Manners J.M. and Broekaert, W.F. (1996). Ribeiro, S.F.F. 93 Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, 8: 2309-2323.

Pfaffl, Michael W., Graham W. Horgan, and Leo Dempfle. "Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." *Nucleic acids research* 30.9 (2002): e36-e36.

Read, T., Vance, D., and BluePrints, S. (2001). Robust Clustering: A Comparison of Sun™ Cluster 3.0 versus Sun Cluster 2.2 Software. *Sun BluePrints™ OnLine*, 2001, 1-23.

Rigano, M. M., Romanelli, A., Fulgione, A., Nocerino, N., D'Agostino, N., Avitabile, C., and Capparelli, R. (2012). A novel synthetic peptide from a tomato defensin exhibits antibacterial activities against *Helicobacter pylori*. *Journal of Peptide Science*, 18(12), 755-762.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.

- Rozen, S., and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 365-386). Humana Press, Totowa, NJ.
- Stangarlin, J. R., Kuhn, O. J., Toledo, M. V., Portz, R. L., and Pascholati, S. F. (2011). A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*, 10(1), 18.
- Stotz, H. U., Spence, B., and Wang, Y. (2009). A defensin from tomato with dual function in defense and development. *Plant molecular biology*, 71(1-2), 131-143.
- Tashiro, R. M., Philips, J. G., & Winefield, C. S. (2016). Identification of suitable grapevine reference genes for qRT-PCR derived from heterologous species. *Molecular genetics and genomics*, 291(1), 483-492.
- Terras, F. R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., and Vanderleyden, J. (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *The Plant Cell*, 7(5), 573-588.
- Thomma, Bart; Broekaert, Willem. Tissue-specific expression of plant defensin genes PDF2.1 and PDF2.2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 36, n.7, p. 533-537, Jul, 1998.
- Thomas, S., Karnik, S., Barai, R. S., Jayaraman, V. K., and Idicula-Thomas, S. (2009). CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic acids research*, 38(suppl_1), D774-D780.
- Waghu, F. H., Barai, R. S., Gurung, P., and Idicula-Thomas, S. (2015). CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1094-D1097.
- Weerawanich, K., Webster, G., Ma, J. K., Phoolcharoen, W., and Sirikantaramas, S. (2018). Gene expression analysis, subcellular localization, and in planta antimicrobial activity of rice (*Oryza sativa* L.) defensin 7 and 8. *Plant Physiology and Biochemistry*, 124, 160-166.
- Zhao, L., Ding, Q., Zeng, J., Wang, F. R., Zhang, J., Fan, S. J., and He, X. Q. (2012). An improved CTAB–ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochemical analysis*, 23(6), 647-650.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

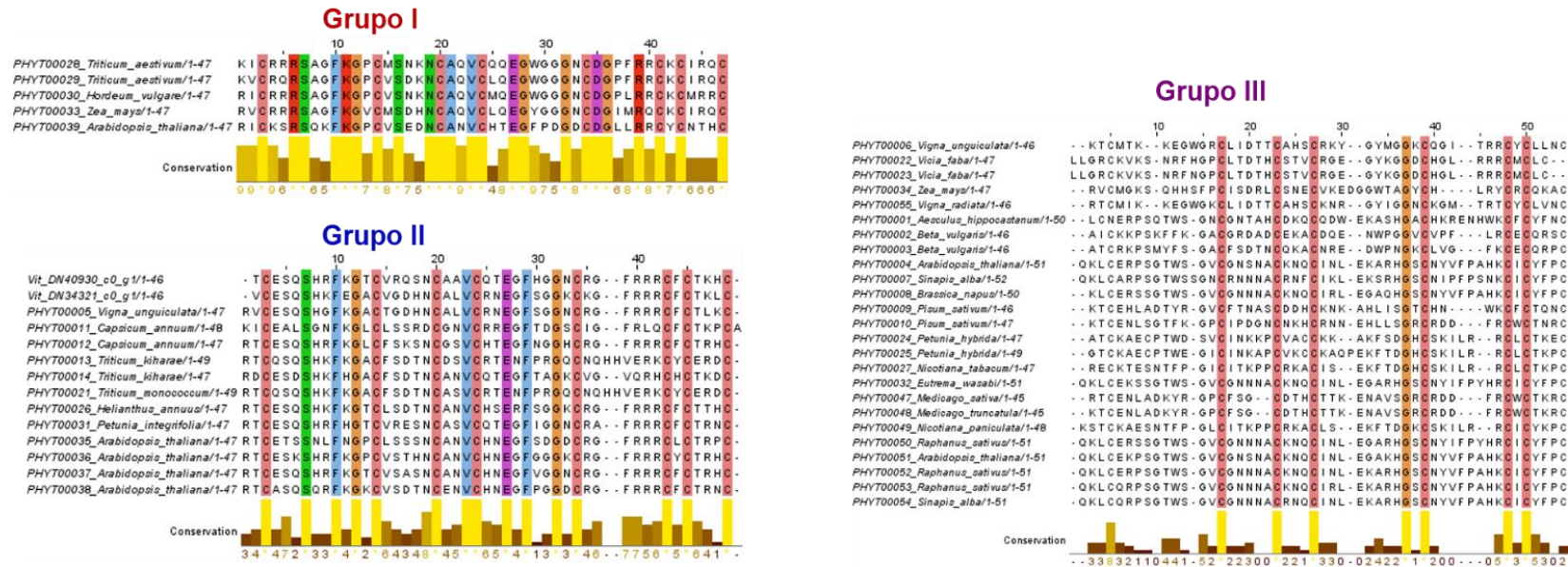


Figura S1. Alinhamento individual das sequências de cada grupamento. Fonte: Autor (2019).

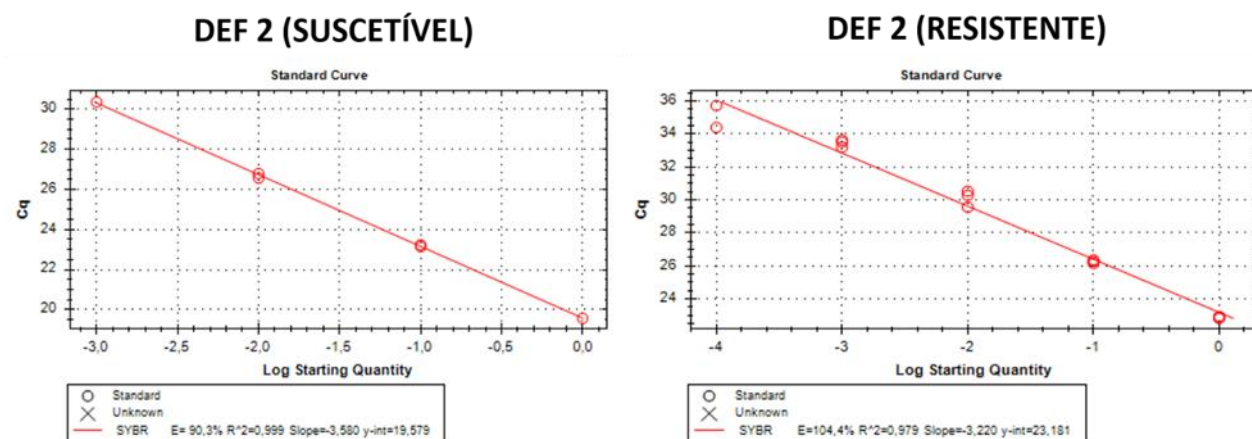


Figura S2. Curvas de eficiência de DEF 2 obtidas via RT-qPCR. Fonte: Autor (2019).

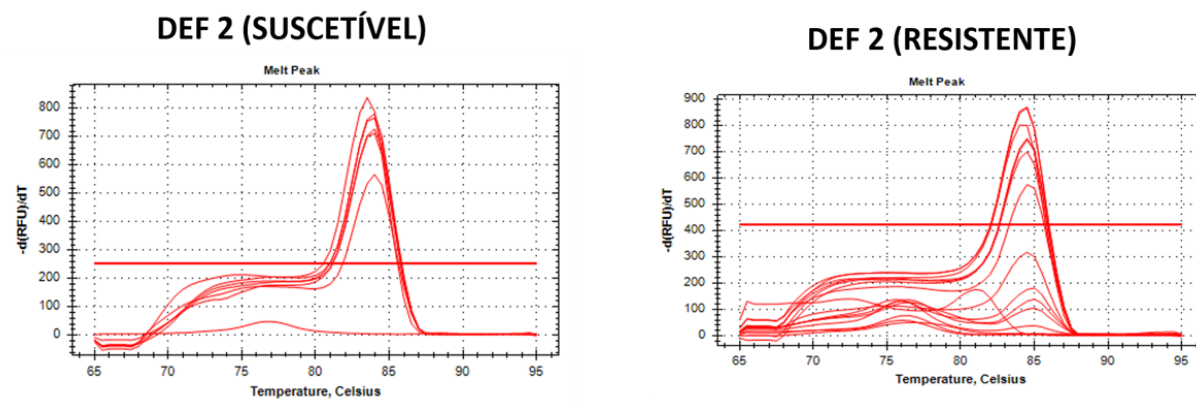


Figura S3. Curvas de *Melting* de DEF 2 obtidos via RT-qPCR. Fonte: Autor (2019).

4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE AMPS DA CLASSE TLP EM *Vitis* SPP. SOB ESTRESSE BIÓTICO

Marianne Firmino de Oliveira¹, Roberta Lane de Oliveira Silva¹, João Pacífico Bezerra-Neto¹, Flávia Figueira Aburjaile¹, Jéssica Barboza da Silva¹, Andreia Cristiny Cezarino de Araújo¹, Nataniel Franklin de Melo², Ana Maria Benko-Iseppon^{1#}

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

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

#Autor para correspondência:

Ana Maria Benko-Iseppon, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento 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: As proteínas relacionadas à patogênese (PR) desempenham papel fundamental na resposta de defesa dos vegetais. Dentre as diversas classes de PRs, destacam-se as PR-5, que englobam as TLPs. Este trabalho visou identificar, caracterizar e validar TLPs diferencialmente expressas no transcriptoma de dois acessos de *Vitis* spp. inoculados com bactéria *Xanthomonas citri* pv. *anacardi* (Xca). Bibliotecas de RNA-Seq (Illumina HiSeq2500) foram geradas a partir de clones das cultivares 'Red Globe' e do híbrido IAC-572, consideradas susceptível e moderadamente resistente ao cancro bacteriano, respectivamente. Amostras de tecidos foliares foram coletadas nos tempos de 90 minutos, 6 horas, 24 horas e 48 horas após a inoculação com o patógeno. Sequências sondas de TLPs foram selecionadas no banco de dados CAMP e submetidas à ferramenta HMMER objetivando identificar AMPs correspondentes as TLPs. As sequências candidatas foram anotadas, traduzidas e tiveram seus domínios identificados com o auxílio do Batch CD-search. A predição do ponto isoelétrico e do peso molecular foi realizada utilizando o JVirGel 2.0, a localização subcelular através do Cell-PLoc 2.0, as pontes dissulfeto por meio do Dianna e a predição da atividade antimicrobiana pelo CAMP R3. Foram identificadas 32 TLPs após análise via HMMER, que demonstraram alto potencial antimicrobiano. Foram gerados modelos tridimensionais para cada sequência candidata, os quais apresentaram 90 % dos seus resíduos distribuídos em regiões favoráveis ou permitidas. Por fim, foram selecionados cinco TLPs para o desenho de *primers*, das quais três apresentaram-se funcionais e foram validadas via

PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). As diferentes TLPs avaliadas (VvTLP1, VvTLP3 e VvTLP4) via RT-qPCR apresentaram perfis de expressão distintos, porém contrastantes quanto as cultivares resistente e susceptível, indicando que as mesmas fazem uso de diferentes estratégias de defesa ao agente bacteriano em videira.

INTRODUÇÃO

As TLPs (*Thaumatin-like protein*) pertencem à família PR-5 e foram isoladas inicialmente do fruto da *Thaumatococcus daniellii*, um arbusto nativo do Oeste Africano (Liu et al., 2010). São polipeptídeos de aproximadamente 207 aminoácidos, com massa molecular de 21 a 26 KDa e com 16 resíduos de cisteína e oito pontes dissulfeto (Velazhahan et al., 1999; Breiteneder, 2004; Liu et al., 2010). Essas proteínas podem ser ácidas, básicas ou neutras e possuem um peptídeo sinal na região N-terminal, responsável por direcionar a proteína madura para uma via secretora particular (Liu et al., 2010). Tratam-se de proteínas relativamente maiores do que os AMPs (tradicionalmente possuindo de 12 a 50 aminoácidos). Portanto, normalmente não são classificadas nesse grupo, embora se destaquem pela alta conservação de seus resíduos de cisteína (Silva et al., 2019). TLPs são conhecidas por sua atividade antifúngica, atuando na degradação da parede celular de fungos (Batalia et al., 1996; Sinha et al., 2014). Estudos recentes reportam que a expressão de TLPs tem sido regulada em condições tanto de estresses abióticos como bióticos (Munis et al., 2010; Acharya et al., 2013; Misra et al., 2016; Sripriya et al., 2017), ressaltando seu potencial biotecnológico.

A *Vitis vinifera* L. é uma espécie frutífera de grande importância econômica mundial. Seu fruto serve de insumo para a produção de vinho, uvas de mesa, sucos, licores destilados, passas secas, entre outros (Li et al., 2017). As espécies de *Vitis* são conhecidas por possuir quantidades significativas de compostos fitoquímicos benéficos, incluindo antocianinas, flavonoides e resveratrol, os quais propiciam diversos benefícios para a saúde devido às suas atividades antioxidantes e antiproliferativas (Pezzuto, 2008; Yang et al., 2009).

O cancro bacteriano, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, figura como uma das mais impactantes doenças da videira e um dos principais fatores de risco para a produção da cultura (Gama et al., 2018). Não existem relatos na literatura envolvendo os efeitos da interação patogênica entre a videira e *X. citri* pv.

anacardi, especialmente quanto à expressão de TLPs em cultivares contrastantes em diferentes tempos pós-inoculação. Dessa forma, o presente estudo objetivou analisar a estrutura de genes codificantes de TLPs em *Vitis* spp., inferindo sobre seus padrões de expressão, características estruturais e funcionais, validando candidatos selecionados através de RT-qPCR.

METODOLOGIA

Desenho experimental e obtenção do material vegetal

O experimento visando à geração de bibliotecas de RNA-Seq de *Vitis* sob infecção da bactéria *X. citri* foi conduzido na Embrapa Semiárido (Petrolina - Brasil) utilizando clones das cultivares 'Red Globe' e do híbrido IAC 572 [resultante de um cruzamento entre o porta-enxerto 101-14 MGT (*V. riparia* X *V. rupestris*) e *V. caribaea*], considerados susceptível e moderadamente resistente a *Xca*, respectivamente (Nascimento et al., 2006). As plantas foram 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) = $1.5 \times 10^3 \mu\text{moles}$)], sendo separadas em quatro casas de vegetação distintas de acordo com os tempos estabelecidos para as coletas. Após 30 dias de cultivo, as plantas sadias dos dois 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), conforme metodologia sugerida por Gama et al. (2011). As coletas foram feitas 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 para a extração do RNA total e posterior confecção das bibliotecas de RNA-seq via sequenciamento HiSeq2500 (Illumina).

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

O RNA total foi extraído segundo protocolo associado entre o método CTAB-Acetato (Zhao et al., 2012) e o Kit SV Total RNA Isolation System (Promega), utilizando 200 mg de tecido foliar e tratamento com DNase. A concentração, pureza e integridade

das amostras foram verificadas via fluorímetro Qubit® (Life Technologies), espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific) e Bioanalyser (Agilent Technologies), respectivamente. A construção das bibliotecas de RNA-Seq e sequenciamento foram realizadas no Centro de Genômica Funcional ESALQ/USP a partir da plataforma V4 2 X 100 HiSeq2500 (Illumina), *paired end*, utilizando amostras de RNA do tempo de 90 minutos. A síntese de cDNA foi realizada com o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. A montagem do transcriptoma foi feita pelo programa Trinity (Grabherr *et al.*, 2011) e a análise estatística dos genes diferencialmente expressos através do programa Edge-R (Robinson *et al.*, 2010).

Identificação e caracterização de sequências de TLPs

O banco de dados CAMP (*Collection of Anti-Microbial Peptides*; www.camp.bicnirrh.res.in/) foi utilizado para selecionar as sequências sondas de TLPs. A identificação de homólogos de TLPs no transcriptoma de videira foi realizada por meio de alinhamentos baseados em modelos probabilísticos com o auxílio do HMMER, utilizando um *cut-off* de 0.01. As sequências candidatas foram traduzidas por meio da ferramenta Transdecoder e os domínios conservados foram confirmados utilizando o Batch CD-Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>). O Jalview foi utilizado para alinhar as sequências candidatas à TLP visando analisar padrões de conservação (Clamp *et al.*, 2004). No JVirGel foi feita a predição do ponto isoelétrico e do peso molecular (Hiller *et al.*, 2006). A localização subcelular foi realizada no Cell-Ploc (Chou e Shen *et al.*, 2010). A formação de pontes dissulfeto foi verificada no programa Dianna (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) e a análise de estruturas secundárias por meio do PSIPRED (McGuffin, *et al.*, 2000). No CAMP_{R3} (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/index.php>) foi feita a predição da atividade antimicrobiana a partir dos classificadores estatísticos *Support Vector Machine* (SVM), *Random Forest Classifier* (RFC) e *Discriminant Analysis Classifier* (DAC).

Modelagem de proteínas e análise fenética

O SWISS-MODEL foi utilizado para a análise de modelagem tridimensional, o qual emprega um método que gera modelos comparativos mediante uma estrutura proteica já identificada e cria modelos para a proteína de interesse a partir de sua similaridade (Arnold *et al.*, 2006). A qualidade dos modelos gerados foi analisada pelo

PROCHECK (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK>) via gráfico de Ramachandran (que indica a localização dos resíduos de aminoácidos), bem como pela ferramenta ProSA-Web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>). Sequências de TLPs retiradas do banco de dados *Uniprot* foram submetidas ao alinhamento do ClustalW. A árvore fenética foi gerada com auxílio do programa MEGA v.7 utilizando o método de Neighbor-Joining (Kumar et al., 2016).

Perfil de expressão *in silico* (RNA-Seq)

A expressão diferencial dos dados de RNA-Seq foi baseada na análise dos valores de *Fold Change* (FC) dos transcritos isolados de cada biblioteca/tratamento a partir das análises via EdgeR, sendo considerados diferencialmente expressos aqueles com FC >+1 ou <-1 ($p\text{-value} \leq 0.05$). Os transcritos foram submetidos a uma análise de agrupamento hierárquico (*Hierarchical clustering analysis*), considerando os dados normalizados e aplicando um filtro de dados de 80 % no programa CLUSTER 3.0 (Read et al., 2001). O resultado do CLUSTER 3.0 foi submetido ao programa Treeview para a visualização do perfil de expressão em forma de *heatmap*.

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

O *Primer 3 Plus* foi utilizado para desenhar os *primers* utilizados na RT-qPCR (Rozen & Skaletsky et al., 2000), seguindo os seguintes parâmetros: conteúdo de GC 50%, tamanho do fragmento entre 70 e 150 pb, temperatura de *Melting* entre 40 e 60° e junção exon-exon). 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), usando 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. Os genes de interesse (diferencialmente expressos nas condições estudadas) foram validados via RT-qPCR e analisados pelo programa REST (*Relative Expression Software Tool*, v.2.0.13; Pfaffl et al., 2002), utilizando três genes de referência (TRU5, TCBP e 60 SRP) para a normalização dos resultados de expressão relativa (Tabela 1).

RESULTADOS

Seleção de candidatos e predição de domínios conservados

Os perfis HMM gerados possibilitaram selecionar 32 sequências que apresentaram similaridade com TLPs. Apenas as sequências candidatas que apresentaram *e-value* significativo ($e\text{-value} \leq 0.01$), foram selecionadas para as análises posteriores.

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

Gene (Número de acesso)	Fonte*	Função predita	Descrição	Sequência dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Eficiência		
					Sus	-	Res
Genes-alvo							
VvTLP1 (Vit_DN49641_c0_g1_i1)	BrGoc	Atividade antifúngica	Atua principalmente na degradação da parede celular de fungos	(F) AGCCTCTAGGGCAGAACACA (R) AGGGTGCAATAACCCGTGTA	98,6%	-	106,5%
VvTLP14 (Vit_DN40037_c0_g1_i1)	BrGoc	Atividade antifúngica	Atua principalmente na degradação da parede celular de fungos	(F) TGGCAGAAGATGACCTTGAG (R) GGTACCGATGAGCTGTGTTG	N/A	-	N/A
VvTLP15 (Vit_DN40037_c0_g1_i2)	BrGoc	Atividade antifúngica	Atua principalmente na degradação da parede celular de fungos	(F) GACCTTTACCACTGCGCATA (R) TTCCGGAGAAGAGAAGGAGA	N/A	-	N/A
VvTLP17 (Vit_DN55951_c0_g1_i5)	BrGoc	Atividade antifúngica	Atua principalmente na degradação da parede celular de fungos	(F) CGGCGCTACAGAGTGTTCCTA (R) CAAGTGCAGCTACCCAGTGT	N/A	-	N/A
VvTLP29 (Vit_DN41703_c0_g1_i1)	BrGoc	Atividade antifúngica	Atua principalmente na degradação da parede celular de fungos	(F) GGGCAGTGAGTAACGCAGTA (R) CTTGCACTGGTGGCAACTAT	108,0%	-	94,2%
VvTLP30 (Vit_DN31917_c0_g1_i1)	BrGoc	Atividade antifúngica	Atua principalmente na degradação da parede celular de fungos	(F) GTGACCGAAACAGGGAGATT (R) GCCAAACTGGTGACTGTGAT	103,9%	-	105,9%
Genes de referência							
TCBP (XM_002285876)	González-Agüero <i>et al.</i> (2013)	-	Proteína 1 subunidade β do complexo	(F) AGACAGTGATTGACAGCCGAGTT (R) ATCCCTGCGTGGCTTTCTTCC	90,2%	-	91,6%
TRU5 (XM_002283586)	Tashiro <i>et al.</i> (2016)	<i>Splicing</i> , transcrição	Tiorredoxina U5 snRNP	(F) CAATGTACGAGCTTTATGACCCATC (R) CAGTTGATCTTGTTGTTGTTTCCAG	88,9%	-	95,3%
60SRP (XM_002270599.1)	Moteiro <i>et al.</i> (2016)	Componente estrutural do ribossomo, tradução	Proteína L18 do RNA ribossomal 60 S	(F) ATCTACCTCAAGCTCCTAGTC (R) CAATCTTGTCCTCCTTCCT	90,7%	-	91,0%

*Database BrGOC (Brazilian Grape Omics Consortium). Fonte: Autor (2019).

O alinhamento das TLPs revelou uma diversificação com *indels* e regiões variáveis, quanto a preservação dos resíduos de cisteína, compartilhando um total de 13 regiões conservadas de cisteínas (Figura 1).

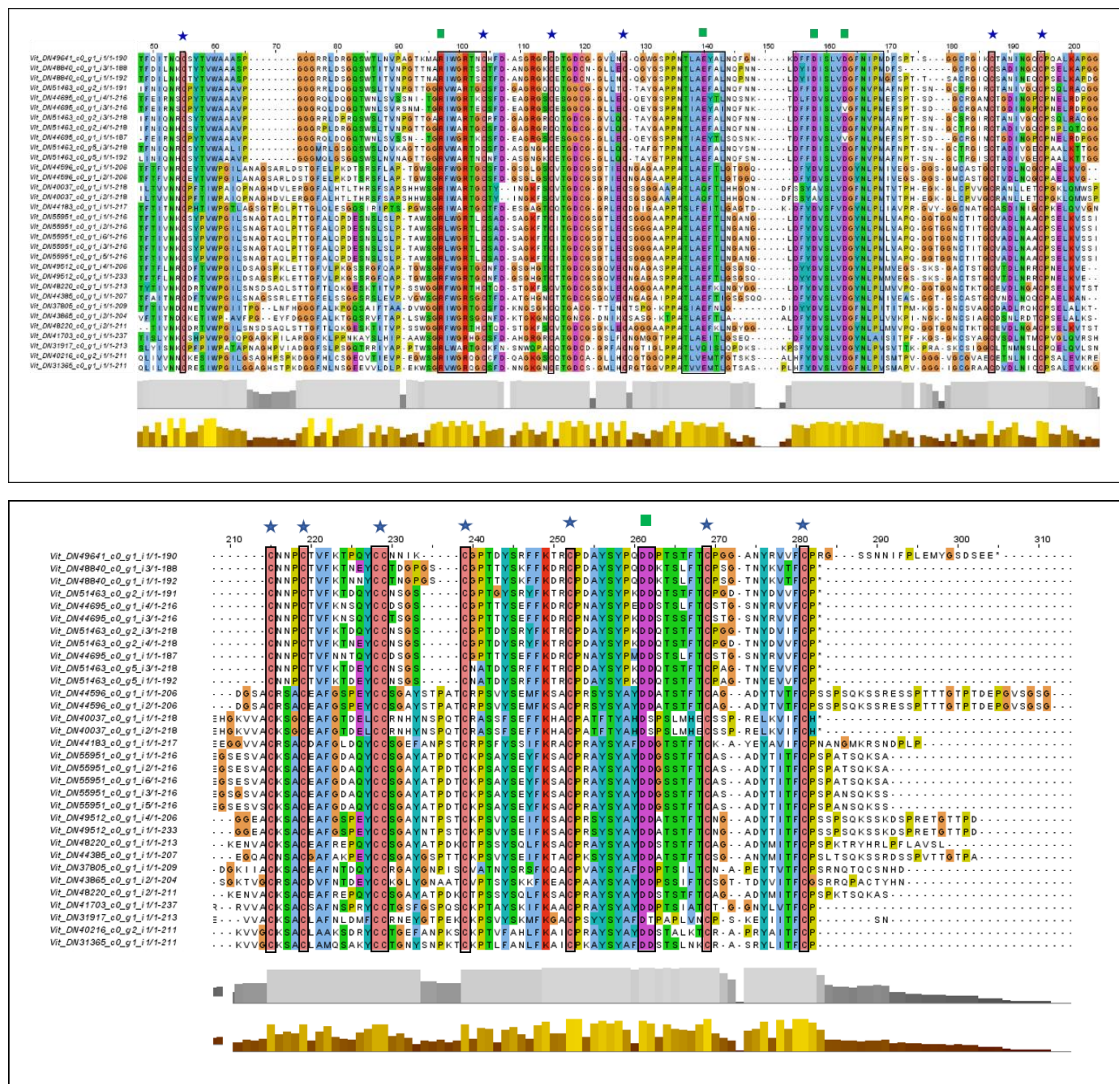


Figura 1. Alinhamento das TLPs com presença de resíduos de cisteína e pelo motivo REDDD respectivamente representado pela (★) e (■). Fonte: Autor (2019).

Todas as TLPs selecionadas apresentaram domínios conservados correspondentes a GH64-TLP-SF (que inclui hidrolases glicosídicas), *Thaumatococcus* (relacionado à atividade antifúngica) e TLP-PA (semelhante ao domínio taumatina e presente em proteínas antifúngicas/alergênicas) (Tabela 2).

Tabela 2. Domínios conservados previamente reconhecidos para TLPs (*Thaumatococcus* Like Proteins) bem como o respectivo número de candidatos identificados em *Vitis* spp.

Famílias	Domínio Conservados	Quantidade de Candidatos
TLPs	GH64-TLP-SF	10
	Thaumatococcus	16
	TLP-PA	6

Fonte: Autor (2019).

Propriedades físico-químicas

As candidatas a TLPs, mostraram-se mais presentes na região extracelular e no vacúolo, apresentaram-se tanto básicas quanto ácidas, com pI variando de três a oito e pM de 25 a 33 (Tabela 3).

Tabela 3. Localização subcelular, ponto isoelétrico (pI) e peso molecular (pM) das TLPs

Gene	ID dos transcritos	Localização Subcelular	pI/pM
VvTLP1	Vit_DN49641_c0_g1_i1	Vacúolo	7,58 – 23,62
VvTLP2	Vit_DN48840_c0_g1_i1	Vacúolo	4,43 – 21,18
VvTLP3	Vit_DN48840_c0_g1_i1	Vacúolo	5,05 – 21,62
VvTLP4	Vit_DN51463_c0_g2_i1	Vacúolo	7,57 – 21,34
VvTLP5	Vit_DN44695_c0_g1_i4	Extracelular	4,63 – 26,17
VvTLP6	Vit_DN44695_c0_g1_i3	Extracelular	5,24 – 26,28
VvTLP7	Vit_DN51463_c0_g2_i3	Vacúolo	8,29 – 25,23
VvTLP8	Vit_DN51463_c0_g2_i4	Vacúolo	7,28 – 25,02
VvTLP9	Vit_DN44695_c0_g1_i1	Vacúolo	4,12 – 21,13
VvTLP10	Vit_DN51463_c0_g5_i3	Vacúolo	4,79 – 24,89
VvTLP11	Vit_DN51463_c0_g5_i1	Vacúolo	4,21 – 21,28
VvTLP12	Vit_DN44596_c0_g1_i1	Extracelular	3,91 – 32,65
VvTLP13	Vit_DN44596_c0_g1_i2	Extracelular	3,91 – 32,65
VvTLP14	Vit_DN40037_c0_g1_i1	Extracelular	7,18 – 24,52
VvTLP15	Vit_DN40037_c0_g1_i2	Extracelular	7,18 – 24,52
VvTLP16	Vit_DN44183_c0_g1_i1	Extracelular	4,51 – 29,06
VvTLP17	Vit_DN55951_c0_g1_i1	Extracelular	4,01 – 27,98
VvTLP18	Vit_DN55951_c0_g1_i2	Extracelular	4,01 – 27,98
VvTLP19	Vit_DN55951_c0_g1_i6	Extracelular	4,01 – 27,98
VvTLP20	Vit_DN55951_c0_g1_i3	Extracelular	4,05 – 27,94
VvTLP21	Vit_DN55951_c0_g1_i5	Extracelular	4,01 – 27,93
VvTLP22	Vit_DN49512_c0_g1_i4	Extracelular	4,55 – 32,42
VvTLP23	Vit_DN49512_c0_g1_i1	Extracelular	4,55 – 30,81
VvTLP24	Vit_DN48220_c0_g1_i1	Extracelular	7,73 – 33,77
VvTLP25	Vit_DN44385_c0_g1_i1	Extracelular	4,24 – 29,75
VvTLP26	Vit_DN37805_c0_g1_i1	Extracelular	6,80 – 28,44
VvTLP27	Vit_DN43865_c0_g1_i2	Extracelular	8,00 – 27,41
VvTLP28	Vit_DN48220_c0_g1_i2	Extracelular	4,43 – 29,84
VvTLP29	Vit_DN41703_c0_g1_i1	Extracelular	8,35 – 28,48
VvTLP30	Vit_DN31917_c0_g1_i1	Extracelular	7,94 – 25,25

VvTLP31	Vit_DN40216_c0_g2_i1	Extracelular	7,53 – 23,31
VvTLP32	Vit_DN31365_c0_g1_i1	Extracelular	7,91 – 23,24

Fonte: Autor (2019).

Predição da Atividade Antimicrobiana

A partir do CAMP_{R3} foi possível prever sobre a atividade antimicrobiana das TLPs de acordo com os parâmetros estatísticos SVM, RFC e DAC que indicaram valores variando de 0.8815 a 1.000, com 90 % das predições ≤ 1.0 , sugerindo uma expressiva atividade antimicrobiana das TLPs analisadas (Tabela 4).

Tabela 4. Potencial antimicrobiano das TLPs obtidas no CAMP_{R3}

Gene	ID	SVM	RFC	DAC
VvTLP1	Vit_DN49641_c0_g1_i1	1.000	0,969	1.000
VvTLP2	Vit_DN48840_c0_g1_i3	1.000	0,960	1.000
VvTLP3	Vit_DN48840_c0_g1_i1	1.000	0,944	1.000
VvTLP4	Vit_DN51463_c0_g2_i1	1.000	0,9445	1.000
VvTLP5	Vit_DN44695_c0_g1_i4	1.000	0,9525	1.000
VvTLP6	Vit_DN44695_c0_g1_i3	1.000	0,9395	1.000
VvTLP7	Vit_DN51463_c0_g2_i3	1.000	0,894	1.000
VvTLP8	Vit_DN51463_c0_g2_i4	1.000	0,955	1.000
VvTLP9	Vit_DN44695_c0_g1_i1	1.000	0,953	1.000
VvTLP10	Vit_DN51463_c0_g5_i3	1.000	0,951	1.000
VvTLP11	Vit_DN51463_c0_g5_i1	1.000	0,9495	1.000
VvTLP12	Vit_DN44596_c0_g1_i1	1.000	0,952	1.000
VvTLP13	Vit_DN44596_c0_g1_i2	1.000	0,952	1.000
VvTLP14	Vit_DN40037_c0_g1_i1	1.000	0,9425	1.000
VvTLP15	Vit_DN40037_c0_g1_i2	1.000	0,9425	1.000
VvTLP16	Vit_DN44183_c0_g1_i1	1.000	0,935	1.000
VvTLP17	Vit_DN55951_c0_g1_i1	1.000	0,9255	1.000
VvTLP18	Vit_DN55951_c0_g1_i2	1.000	0,9255	1.000
VvTLP19	Vit_DN55951_c0_g1_i6	1.000	0,9255	1.000
VvTLP20	Vit_DN55951_c0_g1_i3	1.000	0,9255	1.000
VvTLP21	Vit_DN55951_c0_g1_i5	1.000	0,925	1.000
VvTLP22	Vit_DN49512_c0_g1_i4	1.000	0,9355	1.000
VvTLP23	Vit_DN49512_c0_g1_i1	1.000	0,938	1.000
VvTLP24	Vit_DN48220_c0_g1_i1	1.000	0,945	1.000
VvTLP25	Vit_DN44385_c0_g1_i1	1.000	0,9245	1.000
VvTLP26	Vit_DN37805_c0_g1_i1	1.000	0,946	1.000
VvTLP27	Vit_DN43865_c0_g1_i2	1.000	0,9265	1.000
VvTLP28	Vit_DN48220_c0_g1_i2	1.000	0,9425	1.000
VvTLP29	Vit_DN41703_c0_g1_i1	1.000	0,8815	1.000
VvTLP30	Vit_DN31917_c0_g1_i1	1.000	0,934	1.000
VvTLP31	Vit_DN40216_c0_g2_i1	1.000	0,9515	1.000
VvTLP32	Vit_DN31365_c0_g1_i1	1.000	0,963	1.000

SVM: Support Vector Machine; RFC: Random Forest Classifier; DAC: Discriminant Analysis Classifier.

Fonte: Autor (2019).

Predição de ligações dissulfeto, estrutura secundária e terciária

Contendo 16 resíduos de cisteínas, as TLPs candidatas dispuseram de oito ligações dissulfeto distribuídas ao longo da sequência, conforme demonstrado na figura 2.

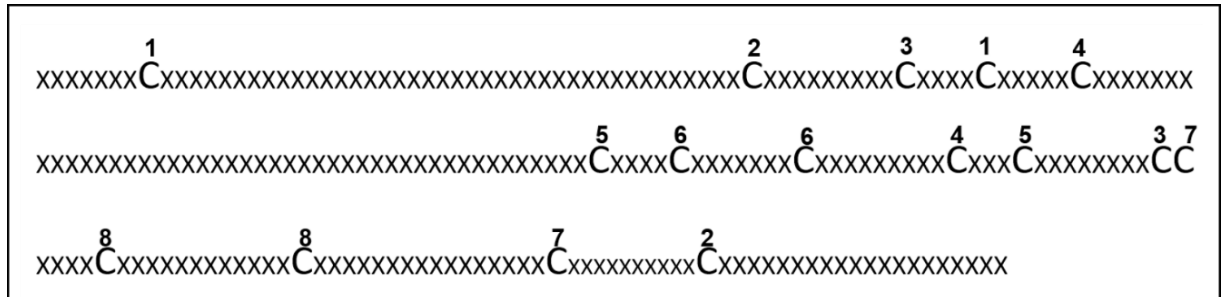


Figura 2. Ligações dissulfeto das candidatas à TLPs em *Vitis* spp. Fonte: Autor (2019).

A estrutura secundária das TLPs obtidas a partir do software PSIPRED indicou que as sequências desta família apresentam de dez a doze folhas- β , além de duas até quatro α -hélices (Figura 3).

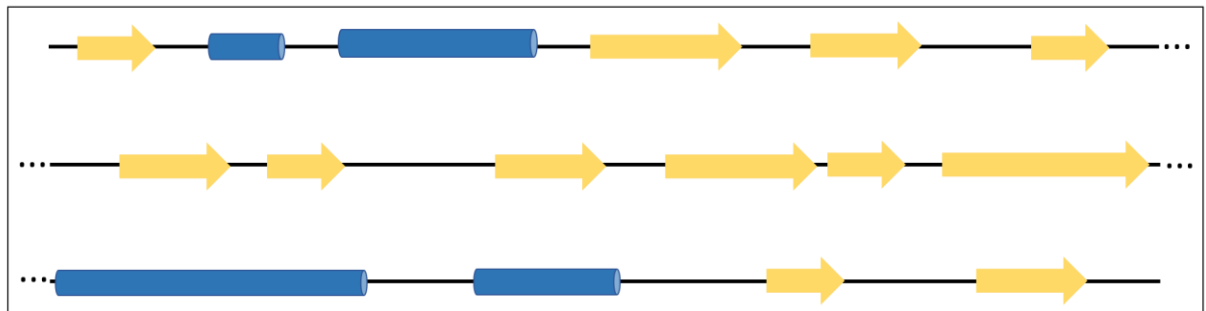


Figura 3. Modelo esquemático das estruturas secundárias das TLPs em *Vitis* spp. Fonte: Autor (2019).

Foram gerados três modelos tridimensionais para cada sequência candidata (Figura 4), tendo em vista obter o melhor modelo 3D, sendo considerados como critério de escolha a identidade, cobertura e similaridade dos modelos gerados.

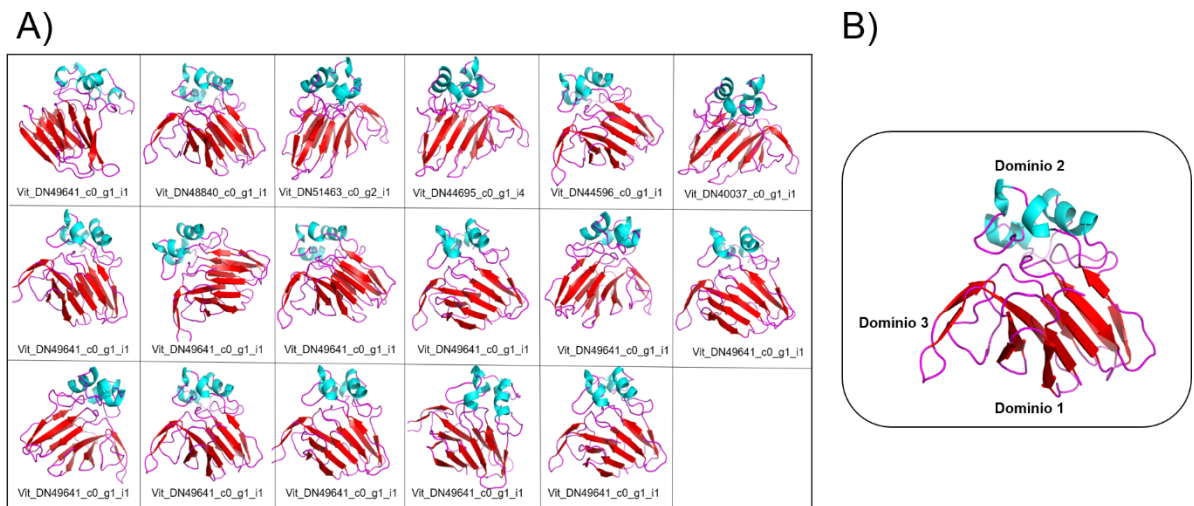


Figura 4. A) Estrutura 3D modelada por homologia para TLPs de *Vitis* spp. B) Exemplo da localização dos domínios. Fonte: Autor (2019).

Em seguida, por meio do gráfico de Ramachandran, foram selecionados os modelos que apresentaram maior porcentagem dos resíduos de aminoácidos presentes na região mais favorável ou na região permitida. Os resultados obtidos apontaram que boa parte das candidatas apresentaram ≥ 85 % dos seus resíduos nas regiões favoráveis e 11 % em regiões permitidas. Apenas três transcritos (Vit_DN49641_c0_g1_i1, Vit_DN44596_c0_g1_i1 e Vit_DN44596_c0_g1_i2) obtiveram 90 % dos resíduos em regiões permitidas, conforme representado na tabela 5.

Tabela 5. Valores obtidos no Swiss-Model e Procheck para a avaliação de qualidade dos modelos tridimensionais gerados para as TLPs de *Vitis* spp.

Gene	(aa)	Identidade	GMQE	QMEAN	Zscore	Ramachandran*			
						RMF	RPA	RGP	RNP
VvTLP1	218	67,51%	0,80	-0,14	- 5,84	90,5%	8,9%	0,6%	0,0%
VvTLP2	197	71,79%	0,94	0,97	-6,28	88,7%	11,3%	0,0%	0,0%
VvTLP3	201	71,36%	0,94	0,88	-6,23	87,8%	12,2%	0,0%	0,0%
VvTLP4	200	81,42%	0,97	0,32	-5,69	89,9%	8,9%	1,3%	0,0%
VvTLP5	200	76,88%	0,97	1,02	-6,4	87,0%	13,0%	0,0%	0,0%
VvTLP6	240	71,36%	0,77	0,67	-6,06	87,6%	12,4%	0,0%	0,0%
VvTLP7	233	81,09%	0,79	0,69	-5,75	88,3%	11,7%	0,0%	0,0%
VvTLP8	233	84,08%	0,79	0,86	-5,71		10,6%	0,6%	0,0%
VvTLP9	196	69,90%	0,94	0,47	-6,49	87,3%	12,7%	0,0%	0,0%
VvTLP10	233	90,03%	0,88	1,43	-6,1	87,4%	12,6%	0,0%	0,0%
VvTLP11	201	97,51%	0,99	1,56	-6,05	88,0%	12,0%	0,0%	0,0%
VvTLP12	322	56,54%	0,60	-0,37	-6,85	90,6%	9,4%	0,0%	0,0%
VvTLP13	322	56,54%	0,60	0,37	-6,85	90,6%	9,4%	0,0%	0,0%
VvTLP14	227	43,52%	0,75	-1,57	-6,72	85,5%	13,4%	1,1%	0,0%
VvTLP15	227	44,44%	0,76	-1,37	-6,86	82,8%	16,1%	1,1%	0,0%
VvTLP16	277	51,14%	0,68	-1,87	-6,94	85,9%	13,0%	0,6%	0,6%
VvTLP17	273	55,91%	0,71	-0,21	-8,07	89,1%	9,8%	1,1%	0,0%
VvTLP18	273	55,91%	0,71	-0,21	-7,71	89,1%	9,8%	1,1%	0,0%
VvTLP19	273	55,91%	0,71	-0,21	-8,07	89,1%	9,8%	1,1%	0,0%
VvTLP20	273	55,91%	0,71	-0,21	-7,77	89,1%	9,8%	1,1%	0,0%
VvTLP21	272	55,25%	0,70	-0,55	-7,65	89,1%	9,8%	1,1%	0,0%
VvTLP22	313	56,02%	0,60	-0,87	-7,28	89,1%	9,8%	1,1%	0,0%
VvTLP23	298	56,28%	0,64	-0,83	-7,38	89,0%	9,9%	1,2%	0,0%
VvTLP24	312	44,83%	0,54	-1,41	-7,16	88,5%	8,7%	2,2%	0,5%
VvTLP25	288	56,94%	0,66	-1,08	-7,06	86,9%	11,9%	0,0%	1,1%
VvTLP26	266	51,79%	0,63	-2,14	-6,47	85,1%	13,2%	1,7%	0,0%
VvTLP27	256	45,07%	0,69	-1,60	-7,39	87,2%	11,7%	0,6%	0,6%
VvTLP28	287	54,88%	0,66	-0,44	-7,7	87,8%	11,0%	1,1%	0,0%
VvTLP29	267	53,00%	0,70	-1,25	-6,62	87,9%	11,5%	0,6%	0,0%
VvTLP30	232	47,27%	0,75	-2,39	-6,9	84,1%	14,8%	1,1%	0,0%
VvTLP31	221	47,25%	0,79	-1,52	-6,59	87,0%	11,9%	0,6%	0,6%
VvTLP32	221	48,17%	0,79	-1,59	-6,82	87,0%	12,4%	0,0%	0,6%

GMQE: Estimativa Global de Qualidade do Modelo; QMEAN: Análise de Energia Modelo Qualitativa; Zscore: Qualidade geral do modelo; (*) RMF: Região Mais Favorável; RPA: Região Permitida Adicional; RGP: Região Generosamente Permitida; RNP: Região Não Permitida. Fonte: Autor (2019).

Análise de fenogramas

A árvore gerada a partir do método de Neighbor Joining (NJ) para TLPs de *Vitis* spp. incluiu sequências de TLPs previamente descritas do banco de dados Uniprot. O dendograma apresentou seis grupos. As sequências do grupo I foram compostas pelas famílias Apocynaceae e Marantaceae. O grupo II, corresponde a sequências de Solanaceae, Brassicaceae, Sapotaceae, Oleaceae, Actinidiaceae, Fabaceae e Vitaceae. Neste ramo foram agrupadas 11 TLPs identificadas neste estudo. O gene

Vit_DN49641_c0_g1 agrupou com a espécie *A. thaliana*, emegindo um bootstrap de 88 %. Outros dois genes (Vit_48840_c0_g1_i1 e Vit_48840_c0_g1_i3) mostram similaridade com a família Sapotaceae, com bootstrap de 74 %.

O grupo III foi composto apenas por sequências da família Poaceae. As sequências identificadas no grupo IV pertenciam as famílias Poaceae e Sapotaceae. Já no grupo V, foi observado apenas a família Cupressaceae. No ramo correspondente ao grupo VI, houve agrupamento das famílias Brassicaceae, Fabaceae, Rosaceae e Vitaceae, com 21 sequências identificadas como TLP.

Para compreender as diferenças de cada grupo, os ramos foram analisados de forma isolada visando identificar os aminoácidos que estavam mais presentes (Figura S1). As espécies do grupo I compartilham de vários aminoácidos como: Alanina (A), Treonina (T), Fenialanina (F), Isoleucina (I) e Asparagina (N).

No grupamento II, os aminoácidos predominantes foram a Valina (V), o Triptofano (W) e a Alanina (A). Já no grupo III, foram identificados a Alanina (A), Treonina (T), Fenialanina (F), Valina (V), Triptofano (W) e Lisina (K). O ramo IV apresentou uma maior diversidade na conservação de aminoácidos do tipo Valina (V), Asparagina (N), Triptofano (W), Alanina (A) e Prolina (P).

O grupo V foi composto por Triptofano (W), Glicina (G), Fenialanina (F), Leucina (L), Alanina (A), Histidina (H), Isoleucina (I) e Lisina (K). Por fim, o grupo VI mostrou-se conservado para presença de Cisteína (C), Arginina (R), Triptofano (W) e Ácido aspártico (D).

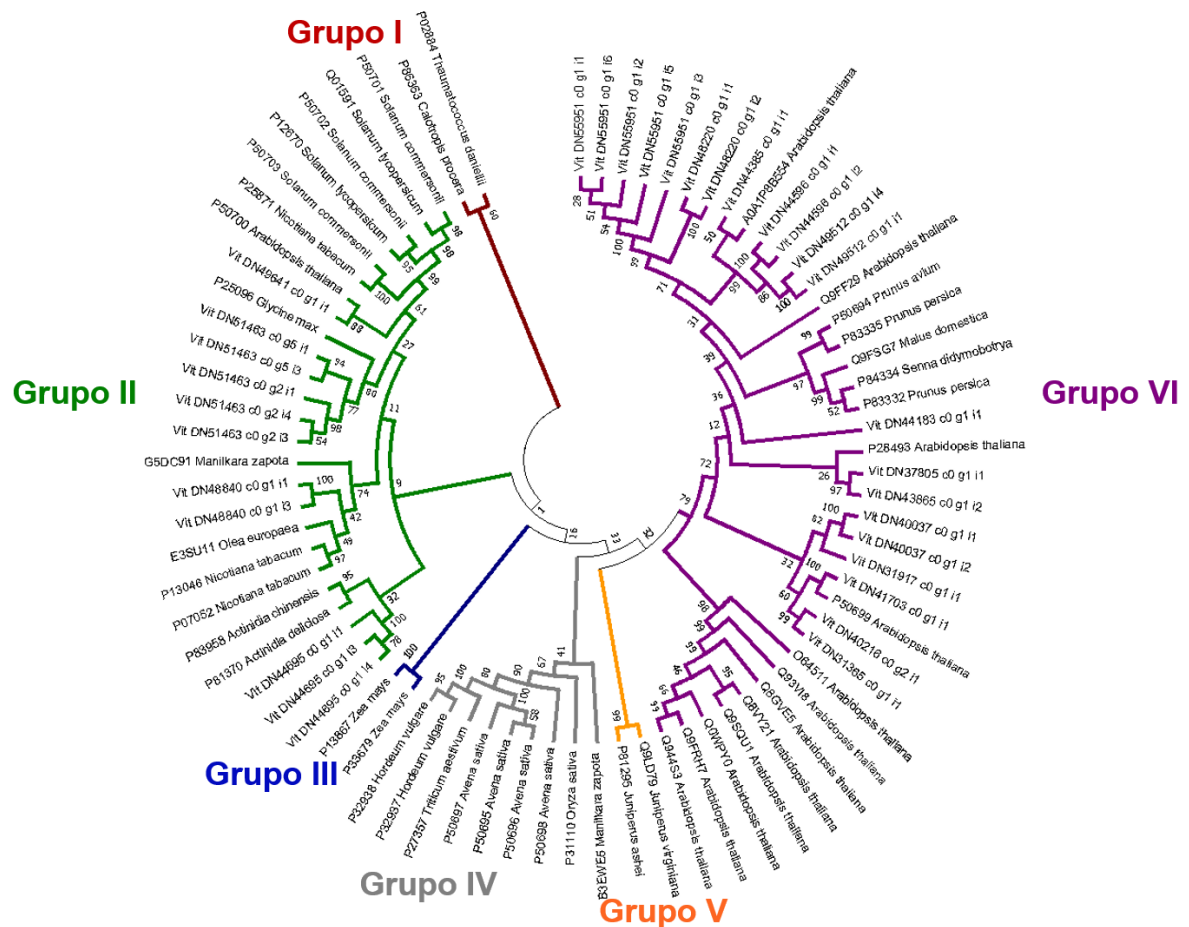


Figura 5. Fenograma das TLPs de *Vitis* spp. comparativamente com seqüências do banco de dados Uniprot. As proteínas são representadas por seus códigos de acesso, seguido da espécie vegetal. Fonte: Autor (2019).

Perfil de expressão *in silico*

Na análise de expressão *in silico*, foram identificados seis transcritos diferencialmente expressos. Desses, três transcritos foram induzidos (Vit_DN41703_c0_g1_i1 com $\log_2FC=3,49$, Vit_DN40037_c0_g1_i1 com $\log_2FC=4,38$ e Vit_DN40037_c0_g1_i2 com $\log_2FC=6,40$) na cultivar suscetível e não significativos na cultivar resistente, dois transcritos foram reprimidos (Vit_DN55951_c0_g1_i5 com $\log_2FC=1,58$ e Vit_DN49641_c0_g1_i1 com $\log_2FC=1,82$) na cultivar resistente e não significativos na cultivar susceptível, e por fim, um transcrito (Vit_DN31917_c0_g1_i1 com $\log_2FC=1,50$) foi reprimido na cultivar susceptível e não significativo na cultivar resistente (Figura 6).

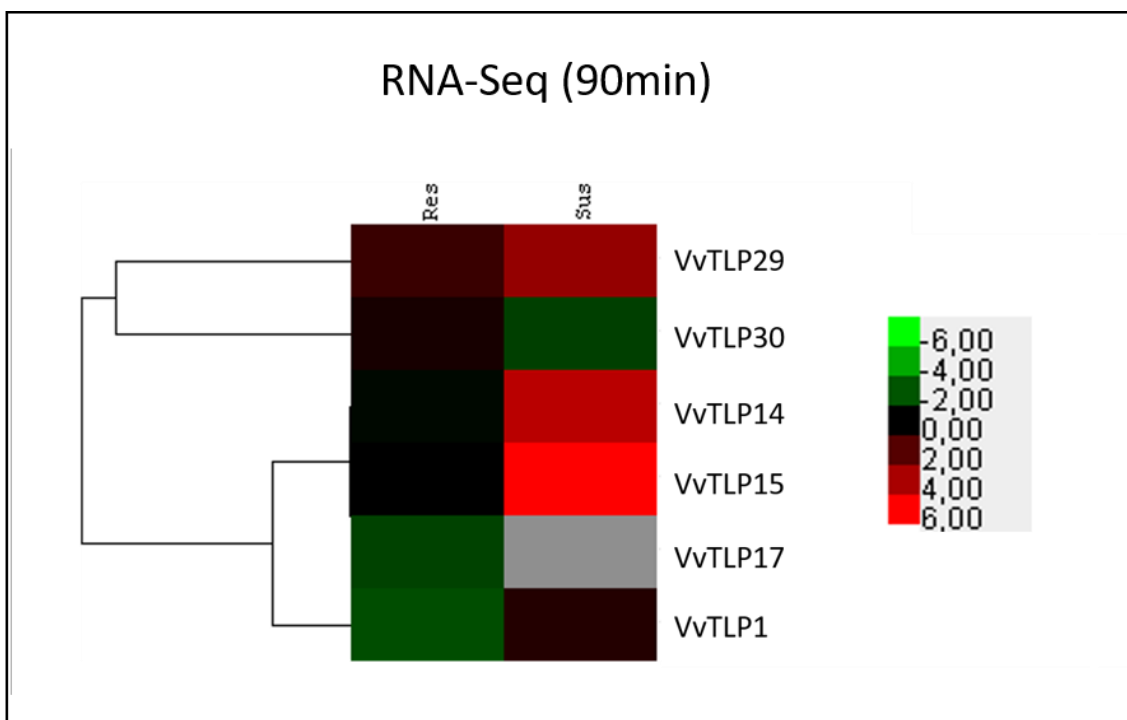


Figura 6. Perfil de expressão *in silico* das TLPs de dois genótipos de *Vitis* contrastantes quanto à resistência contra *Xanthomonas citri* pv. *anacardii*, a partir de dados de RNA-Seq. A escala de cores representa os níveis de expressão relativa com vermelho indicando indução e em verde repressão dos transcritos. Fonte: Autor (2019).

Validação dos genes através da RT-qPCR

Foram desenhados cinco pares de *primers* para transcritos que codificaram TLPs tendo como base os contigs de RNA-Seq e os dados de expressão diferencial. Desses, três (VvTLP1, VvTLP3 e VvTLP4) demonstraram-se eficientes nas amostras de cDNA das duas cultivares de *Vitis* inoculadas com *Xca* em diferentes tempos de estresse (90 minutos, 24 horas e 48 horas) ou seus controles (sem inoculação). Para a normalização dos dados de expressão relativa foram utilizados os genes de referência TRU5, TCBP e 60 SRP.

Os resultados do RNA-Seq indicaram que VvTLP1 (Vit_DN49641_c0_g1_i1) foi reprimida ($\log_2FC=1,82$) na cultivar IAC-572 e não significativa na cultivar Red Globe após inoculação do patógeno por 90 minutos (Tabela 6). Na quantificação relativa, esse transcrito foi regulado negativamente nos tempos iniciais (90 minutos e 24 horas de estresse) na cultivar resistente, porém, após 48 horas de estresse, a VvTLP1 teve um aumento em sua expressão ($\log_2FC=5,36$) em relação às amostras controle (Tabela 6; Figura 7). Em contrapartida, a cultivar susceptível respondeu de forma oposta a condição de estresse, apresentando indução ($\log_2FC= 3,69$ e $2,28$) com 90

minutos e 24 horas após a inoculação do patógeno, respectivamente. Porém, não houve modulação da sua expressão às 48 horas após a imposição do estresse (Tabela 6; Figura 7).

A VvTLP3 (Vit_DN31917_c0_g1_i1) mostrou-se constitutiva na cultivar IAC-572 e foi regulada negativamente ($\log_2FC=1,50$) na Red Globe, de acordo com os dados das bibliotecas de RNA-Seq (Tabela 6; Figura 8). As análises de quantificação relativa indicaram que, na cultivar resistente, a VvTLP3 apresentou um padrão de expressão distinto em cada tempo de estresse avaliado, sendo não significativa com 90 minutos, reprimida ($\log_2FC=0,27$) em 24 horas e induzida ($\log_2FC=2,56$) 48 horas após a inoculação, em comparação a situação controle (Tabela 6; Figura 8), o que sugere uma resposta progressiva do híbrido IAC-572 após o contato com a bactéria. Por sua vez, a cultivar susceptível se mostrou reprimida ($\log_2FC=0,59$) no tempo de 90 minutos, enquanto que com 24 e 48 horas sua expressão não sofreu alteração significativa em relação aos seus respectivos controles não inoculados (Tabela 6; Figura 8).

Por fim, os dados do RNA-Seq para a VvTLP4 (Vit_DN41703_c0_g1_i1) indicaram uma indução moderada ($\log_2FC=1,3$) no híbrido IAC-572 enquanto que na Red Globe a indução foi mais pronunciada ($\log_2FC=3,49$) no tempo de 90 minutos (Tabela 6; Figura 8). Na validação por RT-qPCR, a VvTLP4 apresentou expressão não significativa nos tempos iniciais avaliados (90 minutos e 24 horas após a inoculação) para IAC-572, sendo induzida ($\log_2FC=9,19$) após 48 horas de estresse (Tabela 6; Figura 8), sugerindo o estabelecimento de uma estratégia de defesa em resposta à infecção bacteriana. Em contraste, a VvTLP4 foi reprimida na cultivar susceptível no tempo de 90 minutos ($\log_2FC=0,525$) e teve expressão constitutiva nos tempos de 24 e 48 horas após a inoculação com Xca (Tabela 6; Figura 8).

Tabela 6. Expressão relativa via RT-qPCR de três TLPs (VvTLP1, VvTLP3 e VvTLP4) em duas cultivares de videira após 90 minutos, 24 horas e 48 horas de inoculação com *X. citri* e sua regulação na biblioteca de RNA-Seq (90 minutos)

ID do transcrito	Anotação	RNA-Seq [FC / Reg.]		RT-qPCR*		RT-qPCR*		RT-qPCR *	
		90 minutos		90 minutos		24 horas		48 horas	
		IAC 572	Red Globe	IAC 572	Red Globe	IAC 572	Red Globe	IAC 572	Red Globe
Vit_DN49641_c0_g1_i1	VvTLP1	1,82/DR	N.S.	0,57/DR	3,6 /UR	0,25/DR	2,28/UP	5,36/UR	N.S.
Vit_DN31917_c0_g1_i1	VvTLP3	N.S.	1,50/DR	N.S.	0,59/DR	0,27/DR	N.S.	2,56/UR	N.S.
Vit_DN41703_c0_g1_i1	VvTLP4	1,36/UR	3,49/UR	N.S.	0,52/DR	N.S.	N.S.	9,19/UR	N.S.

Fonte: Autor (2019).

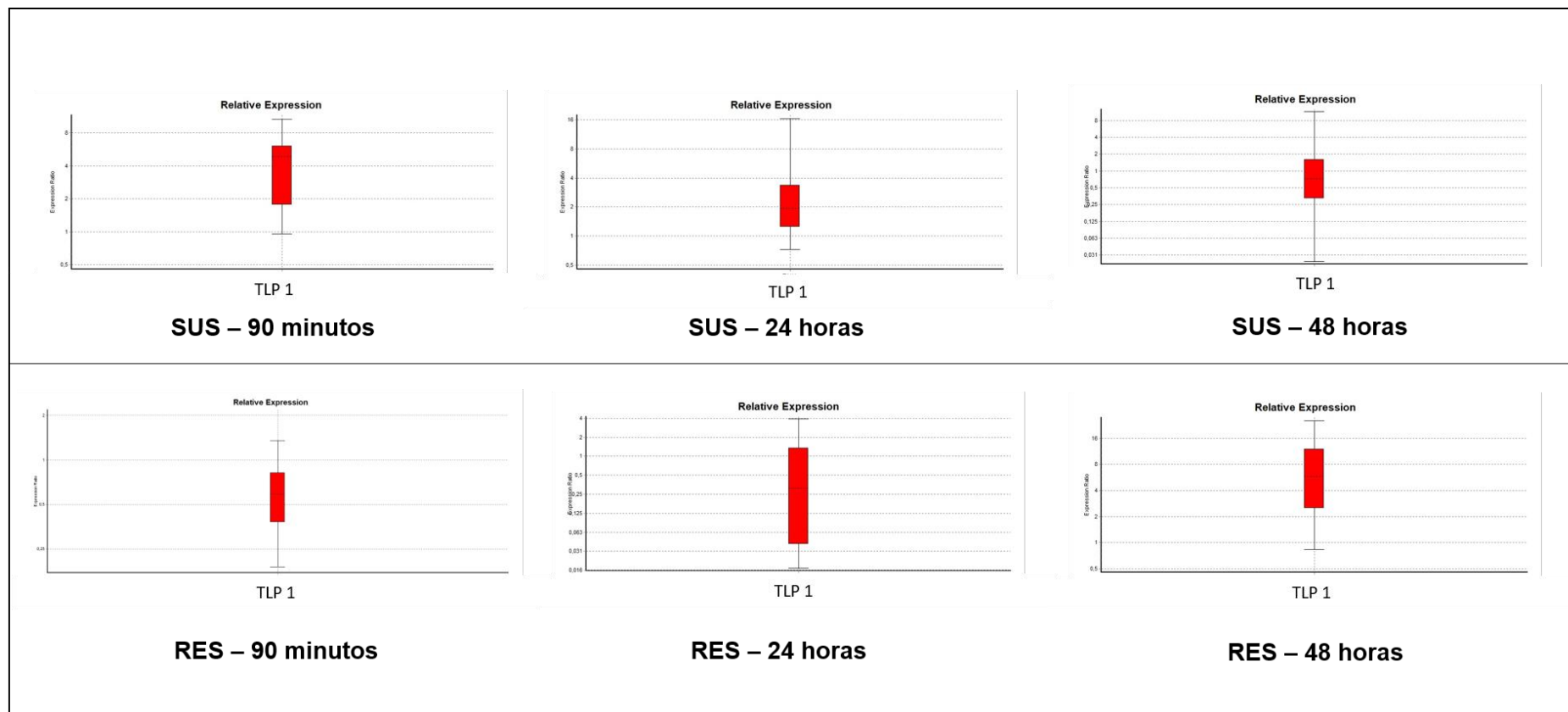


Figura 7. Expressão relativa do transcrito candidato a TLP (TLP 1 - Vit_DN49641_c0_g1_i1) após 90 minutos, 24 horas e 48 horas da inoculação da bactéria *X. citri* pv. *anacardi*, comparativamente aos controles não inoculados. Fonte: Autor (2019).

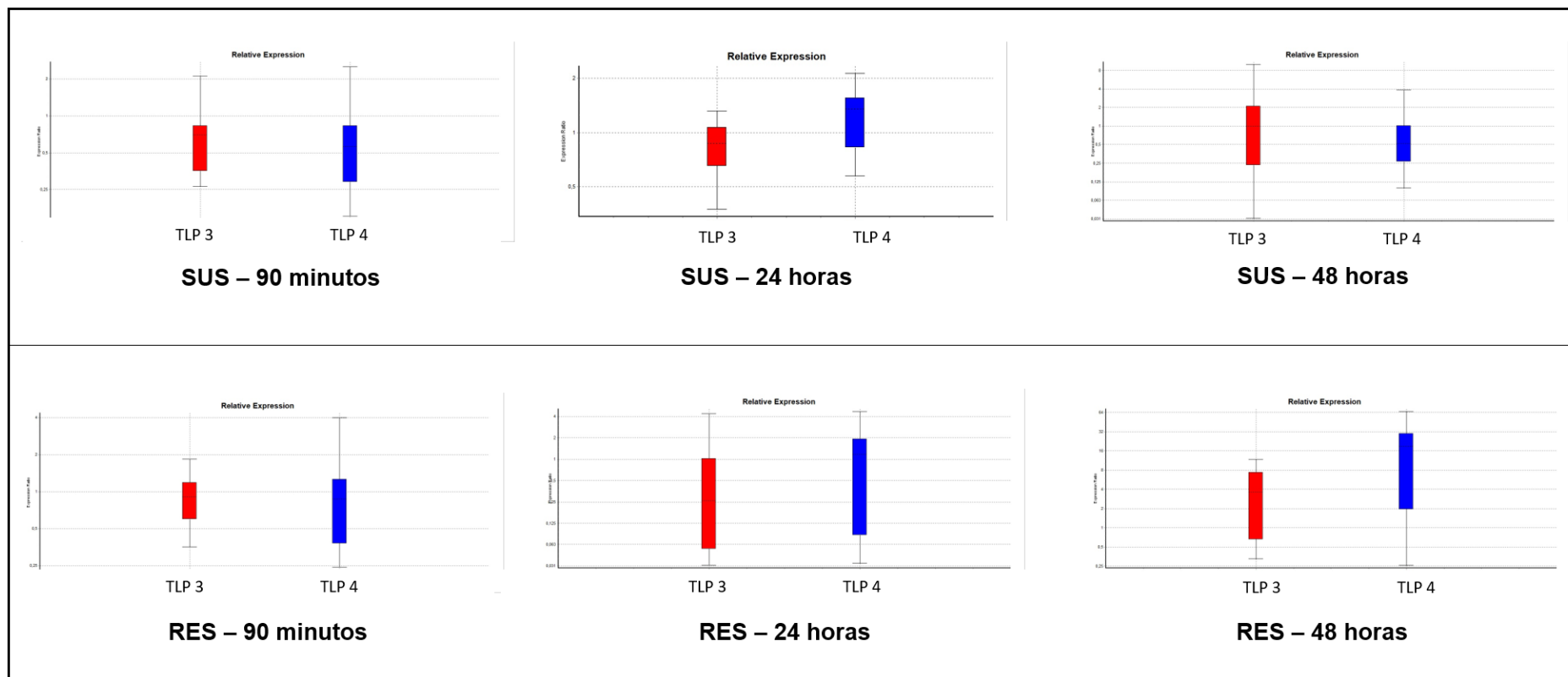


Figura 8. Expressão relativa do transcrito candidato a TLP 3 (Vit_DN31917_c0_g1_i1) e TLP 4 (Vit_DN41703_c0_g1_i1) após 90 minutos, 24 horas e 48 horas da inoculação da bactéria *X. citri* pv. *anacardi*, comparativamente aos controles não inoculados. Fonte: Autor (2019).

DISCUSSÃO

Seleção de candidatos e predição de domínios conservados

As proteínas relacionadas à patogênese compõem um grupo com várias moléculas que são induzidas por fitopatógenos, desempenhando um papel importante no sistema imune inato, atuando na proteção da planta quando acometidas por fitopatógenos (Ali et al., 2018). As TLPs candidatas apresentaram três domínios conservados, sendo eles, a superfamília GH64-TLP-SF, que inclui membros de outros dois domínios encontrados, TLP-PA e THN, que são semelhantes à taumatina, conforme reportado anteriormente por Chen et al. (2016) ao fazer caracterização de proteínas relacionadas à defesa utilizando a espécie *Populus szechuanica* sob infecção do fungo *Melampsora laricis-populina*.

As 32 TLPs apresentaram aminoácidos altamente conservados e correspondentes ao motivo REDDD, com pequenas variações de resíduos. Tal motivo já foi relatado por Yan et al. (2017) ao identificar TLPs em *Vitis vinifera* inoculada com *Elsinoe ampelina*, *Erysiphe necator* e *Botrytis cinerea*. Em relatos anteriores observados por Ali et al. (2019) e Faillace et al. (2019) foram identificadas a presença de vários resíduos de cisteína na classe de TLPs, o mesmo pôde ser identificado neste estudo, tal fato é considerado canônico, sendo assim um padrão desta família. As 32 TLPs identificadas em nosso estudo apresentaram a presença de cisteínas, que são resíduos conhecidos por sua presença em regiões conservadas, favorecendo sua identificação a partir de alinhamentos, bem como por conferirem estabilidade à proteína devido a formação de pontes dissulfeto, além de resistência a ação de proteases e alterações de pH (Ghosh & Chakrabarti et al., 2008).

Localização subcelular e propriedades físico-químicas

LaRosa et al. (1992) e Jami et al. (2007) relataram que proteínas da família PR-5 são encontradas predominantemente em raízes, botões florais e epiderme, sendo acumuladas no vacúolo quando sujeitas a ataques patogênicos. Samac et al. (2011) avaliando a expressão de TLPs em raízes de *Medicago truncatula* sob inoculação de *Phytophthora medicaginis* verificaram que a maioria das TLPs identificadas estavam direcionadas para a região extracelular, enquanto as demais estavam localizadas no vacúolo e apresentavam ponto isoelétrico variando de 3 a 12 e peso molecular de 25

kDa. Resultados semelhantes foram reportados por Singh et al. (2013) analisando TLPs em *Arachis diogeni* infectada por *Phaeoisariopsis personata*.

Predição da atividade antimicrobiana, análise e modelagem estrutural

Neste estudo, a predição da atividade antimicrobiana envolveu três testes estatísticos SVM, RFC e DAC e contou com cerca de 10.200 sequências de proteínas, das quais aproximadamente 5000 proteínas já foram validadas experimentalmente (Waghu et al., 2014). Todas as TLPs aqui apresentadas foram preditas com estatística variando de 0,8 a 1,0, o que confere alta confiabilidade aos resultados obtidos.

As PR-5 dispõem de resíduos de cisteínas em números pares, que se ligam e formam pontes dissulfeto, o que lhes confere alta estabilidade. Ghosh & Chakrabarti et al. (2008) identificaram 16 resíduos de cisteínas, formando oito pontes dissulfeto, utilizando a espécie *Lycopersicon esculentum*, similarmente ao verificado por Tachi et al. (2009) avaliando TLPs em *Glycine max* sob estresse salino.

Quanto à estrutura, as TLPs de *Vitis* spp. exibiram maior predominância de folhas- β , corroborando ao observado por Ghosh & Chakrabarti et al. (2008) em *Lycopersicon esculentum*. Em nosso estudo, os modelos tridimensionais mantiveram o mesmo padrão para todas as TLPs, contendo três tipos de domínios, sendo o domínio 1 correspondente a um β -barril, o domínio 2 formado por vários *loops*, e o domínio 3 dispondo de um pequeno *loop*, com toda estrutura estabilizada por oito pontes dissulfeto características da família, conforme relatado por Liu et al. (2010).

As 32 TLPs candidatas apresentaram mais de 80 % dos resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis e cerca de 10 % em regiões permitidas, conforme indicado no gráfico de Ramachandran, o qual fornece informações detalhadas acerca da qualidade do arranjo estrutural. De acordo com Kumar et al. (2014) um modelo de boa qualidade deve apresentar cerca de 90 % dos resíduos em regiões favoráveis ou permitidas.

Análise fenética

Petre et al. (2011) analisaram aminoácidos de TLPs em 18 sequências de diferentes espécies de *Chlamydomonas reinhardtii* e verificaram que alguns aminoácidos expostos sofreram diversificação de seleção, enquanto outros que estavam presentes na fenda ácida demonstraram-se bem conservados.

No dendograma gerado neste estudo foi possível identificar seis grupos de diferentes famílias e espécies, onde cada grupo foi analisado separadamente visando identificar os níveis de conservação de cada ramo. Todas as sequências de TLPs utilizadas na análise fenética apresentaram o motivo REDDD característico, porém com níveis de conservação diferentes. Pouco se sabe sobre as diferenças dos domínios GH64-TLP-SF, Thaumatin e TLP-PA. No entanto, as divisões identificadas na árvore NJ sugerem que os níveis de intensidade do padrão de conservação observado para cada grupo sejam bastante divergentes.

Validação dos genes de interesse via RT-qPCR

Vários relatos reportam o envolvimento das TLPs no processo de defesa vegetal frente a estresses abióticos e bióticos. No entanto, até o nosso conhecimento, não existem estudos que abordam sua ação mediante infecção por patógenos bacterianos, sendo relatada até o momento, apenas a sua atividade antifúngica.

Weng et al. (2014) avaliaram a expressão gênica de uma TLP em tecidos foliares de *Vitis pseudoreticulata* infectadas pelo agente causador do oídio (*Erysiphe necator*) sob diferentes tempos de estresse (0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas após a inoculação). A validação por RT-qPCR demonstrou que o padrão de expressão das TLPs foi elevado nas primeiras 36 horas após a inoculação, sugerindo que neste período inicial deve ocorrer uma resposta de defesa mais efetiva e um provável aceleração da morte celular programada do tipo HR. He et al. (2017) reportaram a superexpressão da VvTLP em dois genótipos (*V. vinifera* "Thompson Seedless" e *V. amurensis* 'Zuoshan-1') de videira contrastantes quanto à resistência a *Plasmopara viticola*. Os autores verificaram que a expressão da TLP foi induzida em ambos os genótipos durante todo o processo de infecção (0, 8, 12, 24, 48 e 96 horas após a inoculação), atingindo seu nível máximo de expressão nas primeiras 12 horas de estresse, o que indica que as TLPs possuem um importante papel na defesa vegetal, especialmente no início do ataque patogênico.

Em nossas análises, as diferentes TLPs avaliadas (VvTLP1, VvTLP3 e VvTLP4) apresentaram perfis de expressão distintos, porém contrastantes quanto às cultivares resistente e susceptível, indicando que as mesmas fazem uso de diferentes estratégias de defesa ao agente bacteriano em videira.

CONCLUSÃO

As sequências caracterizadas neste estudo apresentaram características estruturais e funcionais semelhantes ao observado na literatura para essa classe de PRs. Além disso, foram observados perfis de expressão distintos na RT-qPCR, porém contrastantes quanto às cultivares resistente e susceptível, o que pode indicar que tais cultivares fazem uso de diferentes estratégias de defesa ao agente bacteriano em videira.

AGRADECIMENTOS

As instituições de apoio à pesquisa CNPq, a rede InterSys e ao programa Biologia Computacional financiada pela CAPES pelas bolsas concedidas possibilitando êxito na pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A and Rawat, S. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol. Res*, 212, 29-37.
- Ali, G., Hu, X., & Reddy, A. S. N. (2019). Overexpression of the Arabidopsis thaumatin-like protein 1 in transgenic potato plants enhances resistance against early and late blights. *bioRxiv*, 621649.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2), 195-201.
- Bonanno, A.; Cavalcanti, J.S.B. (2011). Globalization, Food Quality and Labor: The case of grape production in north-eastern Brazil. *Int. J. of Soc. of Agr. & Food*, 19(1): 37–55.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., and Vandesompele, J. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M and Barton, G. J. (2004). The jalview java alignment editor. *Bioinformatics*, 20(3), 426-427.

Chen, Z. J., Cao, Z. M., Yu, Z. D., and Yu, D. (2016). Cloning and characterization of defense-related genes from *Populus szechuanica* infected with rust fungus *Melampsora larici-populina*. *Genetics and molecular research: GMR*, 15(1).

Chou, K. C., and Shen, H. B. (2010). Cell-PLoc 2.0: An improved package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *development*, 109, 1091.

Côrtes, M. V. C. B., Viana, H. F., Silva, F. R., Lobo, V. L. S., Silva, G. B., Prabhu, A. S and Filippi, M. C. C. F. (2008). Quantificação da atividade enzimática de proteínas relacionadas à patogênese no patossistema *Oryza sativa*/Magnaporthe grisea. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, 34(1), 1-18.

Dai, Z., Sheridan, JM, Gearing, LJ, Moore, DL, Su, S., Wormald, S., and Ritchie, ME (2014). edgeR: uma ferramenta versátil para a análise de triagens genéticas shRNA-seq e CRISPR-Cas9. *F1000Research*, 3.

Faillace, G. R., Turchetto-Zolet, A. C., Guzman, F. L., de Oliveira-Busatto, L. A., & Bodanese-Zanettini, M. H. (2019). Genome-wide analysis and evolution of plant thaumatin-like proteins: a focus on the origin and diversification of osmotins. *Molecular Genetics and Genomics*, 1-21.

Gama, M. A., Mariano, R. L., Viana, F. M., Ferreira, M. A., and Souza, E. B. (2011). Polyphasic characterization of pigmented strains of *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. *Plant disease*, 95(7), 793-802.

Gama, M. A. S. *et al.* Taxonomic Repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and Emendation of the Description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to Include Pigmented Isolates Pathogenic to Cashew Plant. *Phytopathology* (2018).

Ghosh, R., and Chakrabarti, C. (2008). Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. *Planta*, 228(5), 883.

Haas, BJ, Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Sangue, PD, Bowden, J., and MacManes, MD (2013). Reconstrução de sequências transcritas de novo a partir de RNA-seq utilizando a plataforma Trinity para geração e análise de referência. *Nature protocols*, 8 (8), 1494.

- He, R., Wu, J., Zhang, Y., Agüero, C. B., Li, X., Liu, S., and Lu, J. (2017). Overexpression of a thaumatin-like protein gene from *Vitis amurensis* improves downy mildew resistance in *Vitis vinifera* grapevine. *Protoplasma*, 254(4), 1579-1589.
- Hiller, K., Grote, A., Maneck, M., Münch, R., and Jahn, D. (2006). JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. *Bioinformatics*, 22(19), 2441-2443.
- Kumar, H. G. A., and Venkatesh, Y. P. (2014). In silico analyses of structural and allergenicity features of sapodilla (*Manilkara zapota*) acidic thaumatin-like protein in comparison with allergenic plant TLPs. *Molecular immunology*, 57(2), 119-128.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- LaRosa, P. C., Chen, Z., Nelson, D. E., Singh, N. K., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. (1992). Osmotin gene expression is posttranscriptionally regulated. *Plant physiology*, 100(1), 409-415.
- Leão Coelho de Souza, P. (2003). Utilização de diferentes tipos de estaca na produção de mudas do porta-enxerto de videira, CV. IAC 572 Jales. *Ciência Rural*, 33(1).
- Liu, J. J., Sturrock, R., and Ekramoddoullah, A. K. (2010). The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant cell reports*, 29(5), 419-436.
- Jami, S. K., Anuradha, T. S., Guruprasad, L., and Kirti, P. B. (2007). Molecular, biochemical and structural characterization of osmotin-like protein from black nightshade (*Solanum nigrum*). *Journal of plant physiology*, 164(3), 238-252.
- Jorge, A. R. P. N. S., Mariano, M. R. D. L. R., and de Oliveira Viana, I. (2006). Reação de clones de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, baseada nos componentes epidemiológicos do cancro bacteriano. *Ciência Rural*, 36(1).
- McGuffin, L. J., Bryson, K., and Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16(4), 404-405.

- Noh, M. Y., and Jo, Y. H. (2016). Identification and sequence analysis of two thaumatin-like protein (TmTLP) genes from *Tenebrio molitor*. *Entomological Research*, 46(6), 354-359.
- Petre, B., Major, I., Rouhier, N., and Duplessis, S. (2011). Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. *BMC plant biology*, 11(1), 33.
- Pfaffl, Michael W., Graham W. Horgan, and Leo Dempfle. "Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." *Nucleic acids research* 30.9 (2002): e36-e36.
- Read, T., Vance, D., and BluePrints, S. (2001). Robust Clustering: A Comparison of Sun™ Cluster 3.0 versus Sun Cluster 2.2 Software. Sun BluePrints™ OnLine, 2001, 1-23.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 365-386). Humana Press, Totowa, NJ.
- Samac, D. A., Penuela, S., Schnurr, J. A., Hunt, E. N., FOSTER-HARTNETT, D. A. W. N., Vandenbosch, K. A., and Gantt, J. S. (2011). Expression of coordinately regulated defence response genes and analysis of their role in disease resistance in *Medicago truncatula*. *Molecular plant pathology*, 12(8), 786-798.
- Singh, N. K., Kumar, K. R. R., Kumar, D., Shukla, P., and Kirti, P. B. (2013). Characterization of a pathogen induced thaumatin-like protein gene AdTLP from *Arachis diogeni*, a wild peanut. *PloS one*, 8(12), e83963.
- Tachi, H., Fukuda-Yamada, K., Kojima, T., Shiraiwa, M., and Takahara, H. (2009). Molecular characterization of a novel soybean gene encoding a neutral PR-5 protein induced by high-salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1), 73-79.
- Velazhahan, R., and Muthukrishnan, S. (2003). Transgenic tobacco plants constitutively overexpressing a rice thaumatin-like protein (PR-5) show enhanced resistance to *Alternaria alternata*. *Biologia Plantarum*, 47(3), 347-354.

Waghu, F. H., Gopi, L., Barai, R. S., Ramteke, P., Nizami, B., and Idicula-Thomas, S. (2014). CAMP: Collection of sequences and structures of antimicrobial peptides. *Nucleic acids research*, 42(D1), D1154-D1158.

Weng, K., Li, Z. Q., Liu, R. Q., Wang, L., Wang, Y. J., and Xu, Y. (2014). Transcriptome of Erysiphe necator-infected Vitis pseudoreticulata leaves provides insight into grapevine resistance to powdery mildew. *Horticulture Research*, 1, 14049.

Yan, X., Qiao, H., Zhang, X., Guo, C., Wang, M., Wang, Y., and Wang, X. (2017). Analysis of the grape (Vitis vinifera L.) thaumatin-like protein (TLP) gene family and demonstration that TLP29 contributes to disease resistance. *Scientific reports*, 7(1), 4269.

Zhao, J. P., and Su, X. H. (2010). Patterns of molecular evolution and predicted function in thaumatin-like proteins of Populus trichocarpa. *Planta*, 232(4), 949-962.

Zhao, L., Ding, Q., Zeng, J., Wang, F. R., Zhang, J., Fan, S. J., and He, X. Q. (2012). An improved CTAB–ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochemical analysis*, 23(6), 647-650.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

A)

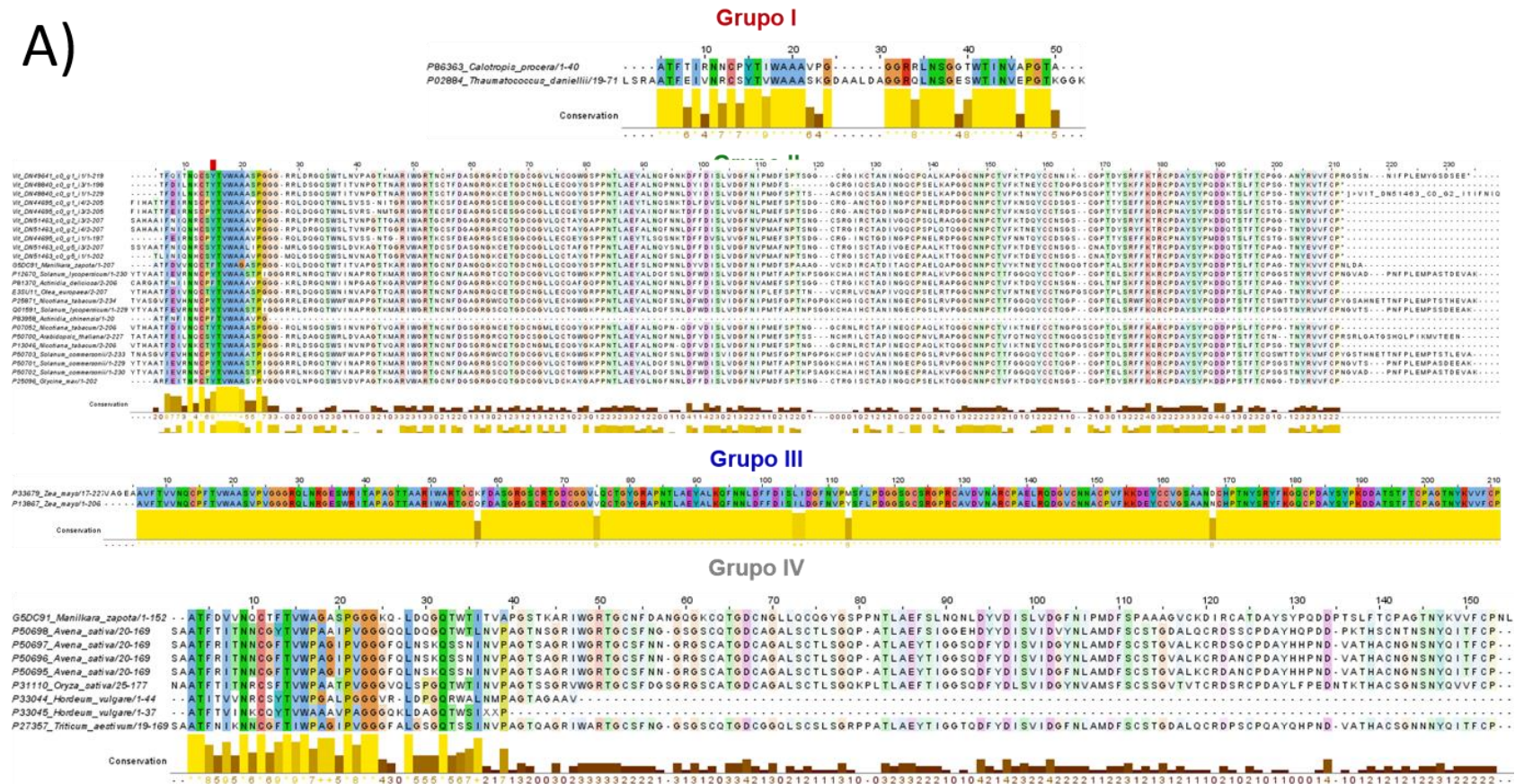


Figura S1.A. Alinhamento das sequências de cada grupo na análise fenética. Fonte: Autor (2019).



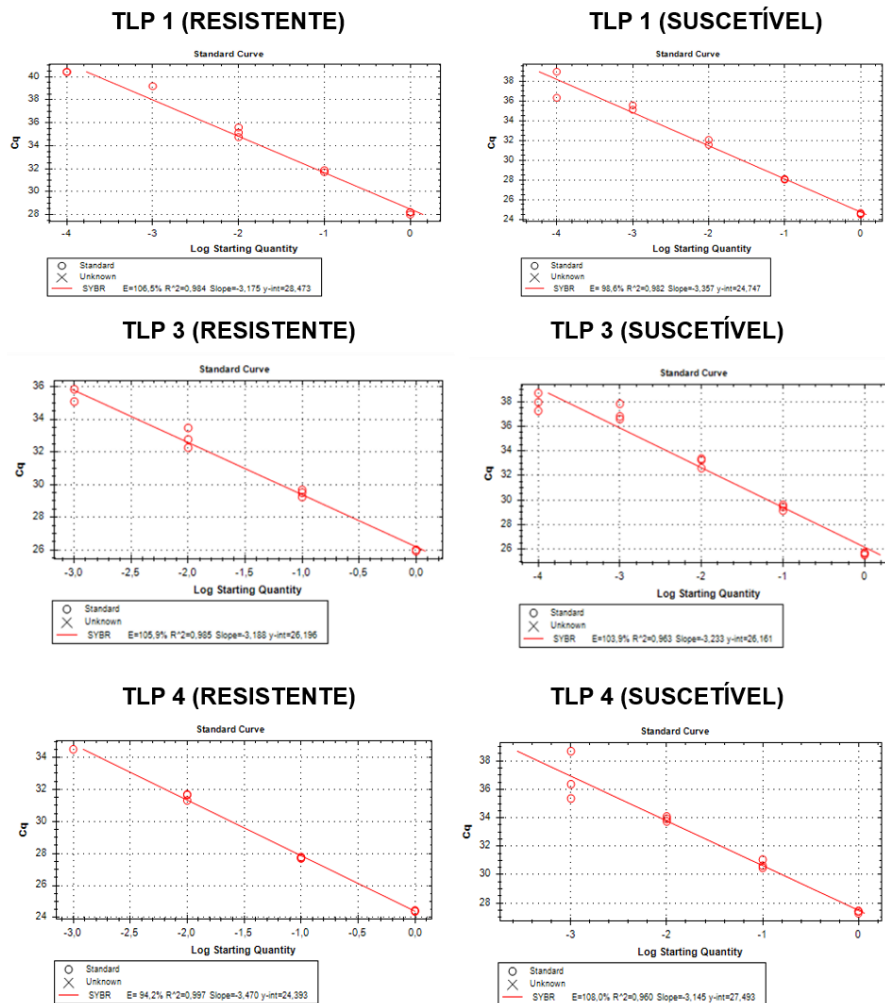


Figura S2. Curvas de eficiência de TLP 1 (Vit_DN49641_c0_g1_i1), TLP 3 (Vit_DN31917_c0_g1_i1) e TLP 4 (Vit_DN41703_c0_g1_i1) obtidos via RT-qPCR. Fonte: Autor (2019).

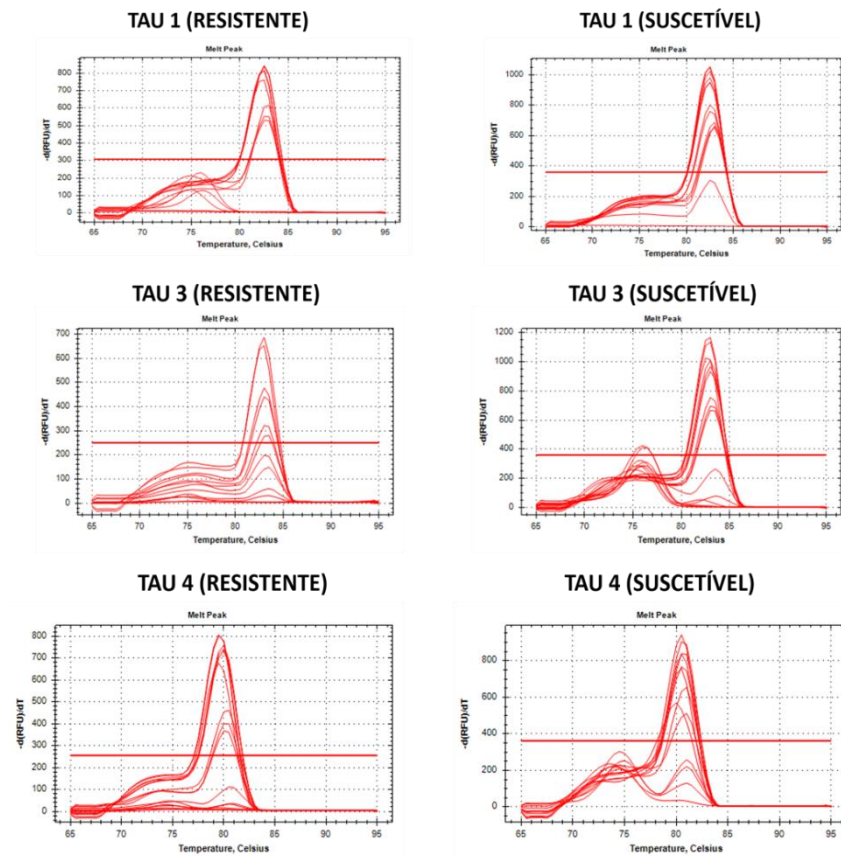


Figura S3. Curvas de *Melting* de TLP 1 (Vit_DN49641_c0_g1_i1), TLP 3 (Vit_DN31917_c0_g1_i1) e TLP 4 (Vit_DN41703_c0_g1_i1) obtidos via RT-qPCR. Fonte: Autor (2019).

5 CONCLUSÕES GERAIS

- Foi possível identificar e caracterizar proteínas PR das classes defensinas e TLPs no transcriptoma de videira;
- As sequências caracterizadas neste estudo apresentam características estruturais e funcionais semelhantes ao observado na literatura para ambas as classes de PRs analisadas;
- As defensinas foram pouco representativas no transcriptoma das duas cultivares de *Vitis*, sendo identificadas apenas duas sequências diferencialmente expressas nas análises *in silico*;
- As TLPs apresentaram perfis de expressão distintos na RT-qPCR, porém contrastantes quanto as cultivares resistente e susceptível, o que pode indicar que tais cultivares fazem uso de diferentes estratégias de defesa ao agente bacteriano em videira.
- Os resultados obtidos neste estudo fornecem informações relevantes e inéditas no que se refere à participação de defensinas e TLPs na resposta da videira frente à ação da bactéria *X. citri*.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, Karan. et al. Overexpression of *Camellia sinensis* thaumatin-like protein, CstLP in potato confers enhanced resistance to *Macrophomina phaseolina* and *Phytophthora infestans* infection. **Molecular Biotechnology**. v.54, n.2, p.609-622, jun, 2013.
- ANO, Akihiko. et al. Characterization of a class III chitinase from *Vitis vinifera* cv. *Koshu*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 95, n. 6, p. 645-657, fev, 2003.
- ALBUQUERQUE, André. Irrigação e fertirrigação potássica na cultura da videira em condições semiáridas. **Rede de revista científicas de América**. v.43, n.3, p. 315-321, set, 2013.
- ARAÚJO, J.S.P. Perfil epidemiológico e subsídios para controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera* L.) no Brasil. (Tese de Doutorado). Rio de Janeiro. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2001.
- ARAÚJO, Nilberto. et al. A era da bioinformática: seu potencial e suas implicações para as ciências da saúde. **Estudos de Biologia**. v.30, n. 70/72, p.143-148, dez, 2008.
- ARIANI, Pietro. et al. Genome-wide characterisation and expression profile of the grapevine ATL ubiquitin ligase family reveal biotic and abiotic stress-responsive and development-related members. **Scientific reports**, v.6, p.1-17, jun, 2016.
- ARMIJO, Grace. et al. Grapevine pathogenic microorganisms: understanding infection strategies and host response scenarios. **Frontiers in plant science**, v.7, n.382, p.1-18, mar, 2016.
- ASADUZZAMAN, Sikder e SONOMOTO, Kenij. Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. **Journal of bioscience and bioengineering**, v.107, n.5, p.475-487, maio, 2009.
- AUVYNET, Constance e ROSENSTEIN, Yvonne. Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. **The Febs Journal**. v.276, n.22, p.6497–6508, out, 2009.

BARBOSA, Maria; RIBEIRO, Pedro; BATISTA, Diogenes. Manejo do cancro bacteriano da videira no Vale do São Francisco. **Estado da arte em fitobacterioses tropicais**. p. 229-242, 2016.

BATALIA, Michael. et al. The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. **Nature structural biology**. v.3, n.1, p.19-23, jan, 1996.

BENKO-ISEPPON, Ana. Maria. et al. Overview on plant antimicrobial peptides. **Current protein & peptide science**, v.11, n.3, p.1-8, jan, 2010.

BENKO-ISEPPON, Ana. Maria. 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.

BERTSCH, C; JOLY, D; WALTER, B. Sequence of a putative *Vitis vinifera* PR-1. **Vitis**, v.42, n.2, p.103, 2003.

BULET, Philipe., STOCKLIN, Reto; MENIN, Laure. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological reviews**, v.198, n.1, p.169-184, mar, 2004.

BULET, Philipe; STOCKLIN, Reto. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein and peptide letters**, v.12, n.1, p.3-11, jan, 2005.

BUSAM, Gunther; KASSEMAYER, Heinz; MATERN, Ulrich. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. **Plant Physiology**, v.115, n.3, p.1029-1038, nov, 1997.

BRANDAZZA, Ana; ANGELI, Sergio; TEGONI, Mariella; CAMBILAU, Christian.; PELOSI, Paolo. Plant stress proteins of the thaumatin-like family discovered in animals. **FEBS Lett.**, v.572, n.1-3, p.3-7, ago, 2004.

BROGDEN, Kim. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. **Nature Review Microbiology**, v.3, p.238-250, mar, 2005.

BREITENEDER, Heimo; RADAUER, Christian. A classification of plant food allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.113, n.5, p.821-830, mai, 2004.

BROEKAERT, Willem. F. et al. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant physiology**, v.108, n.4, p.1353-1358, ago, 1995.

CAMARGO, Umberto; TONIETTO, Jorge; HOFFMAN, Alexandre. Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.144-149, out, 2011.

CAMPOS-DE-QUIROZ, Hugo. Plant genomics: an overview. **Biological research**, v.35, n.3-4, p.385-399, 2002.

CARVALHO, Andre; GOMES, Valdirene. Prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides**, v.30, n.5, p.1007-1020, mai, 2009.

CATTLEY, Sonia; ARTHUR, Jonathan. BioManager: the use of a bioinformatics web application as a teaching tool in undergraduate bioinformatics training. **Briefings in bioinformatics**, v.8, n.6, p.457-465, nov, 2007.

COLILLA, Francisco; ROCHER, Asuncion; MENDEZ Enrique. y-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new Family of thionins from wheat endosperm. **FEBS Lett.** v. 270, n.1, p.191-194, set, 1990.

Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>> . Acesso em: Dezembro de 2017

CUTT, Jhon; KLESSIG, Daniel. Pathogenesis-related proteins. **Genes involved in plant defense.** p. 209-243, 1992.

COSTA, Gisele; SANTOS, Izabelle; BEM, Grazielle. The Beneficial Effect of Anthocyanidin-Rich Vitis vinifera L. Grape Skin Extract on Metabolic Changes Induced by High-Fat Diet in Mice Involves Antiinflammatory and Antioxidant Actions. **Phytotherapy Research**, v.31, n.10, p.1621-1632, ago, 2017.

DEBASTIANI, Gilson. et al. Cultura da Uva, Produção e Comercialização de Vinhos no Brasil: Origem, Realidades e Desafios. **Revista Cesumar-Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**, v.20, n.2, 2016.

DE BEER, Abré; VIVIER, Malené. Vv-AMP1, a ripening induced peptide from Vitis vinifera shows strong antifungal activity. **BMC plant biology**, v.8, n.75, p.1-16, jul, 2008.

DERCKEL, Jean; AUDRAN, Jean; HAYE, Bernard. Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and β -1, 3-glucanases of ripening grape berries. **Physiologia Plantarum**, v.104, n.1, p. 56-64, jan, 1998.

DE OLIVEIRA HOECKEL, Paulo; DE FREITAS, Claiton; FEISTEL, Paulo. A política comercial brasileira e sua influência no setor vitivinícola. **Perspectiva Econômica**. v.13, n.1, p24-43, 2017.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>> Acesso em: Novembro de 2017.

ENOKI, Shinichi; SUZIKI, Shunji. Pathogenesis-Related Proteins in Grape. In: **Grape and Wine Biotechnology**. 2016

FACHIN L.P. A integração das “ômicas” através de ferramentas de Bioinformática. Anais da 69ª Reunião Anual da SBPC. Belo Horizonte – MG. 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization (FAO). 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org.>> Acesso em: 12 fevereiro 2019.

FUJIMORI, Nozomi et al. Grape apoplastic β -1, 3-glucanase confers fungal disease resistance in *Arabidopsis*. **Scientia horticulturae**, v.200, p.105-110, mar, 2016.

GAMA, Marco. et al. Taxonomic Repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and Emendation of the Description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to Include Pigmented Isolates Pathogenic to Cashew Plant. **Phytopathology**. v.108, n.10, p.1143-1153, out, 2018.

GARG, Rohini. et al. Transcriptome analyses reveal genotype-and developmental stage-specific molecular responses to drought and salinity stresses in chickpea. **Scientific reports**. v.6, n.19228, p.1-15, jan, 2016.

GIACOMELLI, Lisa. et al. Identification and characterization of the defensin-like gene family of grapevine. **Molecular plant-microbe interactions**. v.25, n.8, p. 1118-1131, ago, 2012.

GOMÈS, Eric et al. Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cells in response to fungal elicitor treatments. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.16, n.5, p.456-464, mai, 2003.

GRENIER, Jean; POTVIN, Claude; ASSELIN, Alain. Some fungi express β -1,3-glucanases similar to thaumatin-like proteins. **Mycologia**. v.92, n.5, p.841-848, set, 2000.

HANCOCK, Robert. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **The Lancet Infectious Diseases**. v.1, n.3, p.156-164, out, 2001.

IBRAVIN. Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN). 2019. Disponível em: <<https://www.ibravin.org.br>> Acesso em: 12 fevereiro 2019.

HE, Mingyang. et al. Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection. **Protoplasma**. v.250, n.1, p.129-140, fev, 2013.

HE, Rongrong; et al. Overexpression of a Thaumatin-like Protein Gene from *Vitis amurensis* Improves Downy Mildew Resistance in *Vitis vinifera* Grapevine. **Protoplasma**. v.254, n.4, p.1579–1589, jul, 2017.

HERNÁNDEZ, Maria; SONG, Shiren; MENÉNDEZ, Cristina. Influence of genetic and vintage factors in flavan-3-ol composition of grape seeds of a segregating *Vitis vinifera* population. **J. Science of Food and Agriculture**, v.97, n.1, p.236–243, jan, 2017.

HIGGINS, C. F; PAYNE, J. W. Plant Peptides. In: **Nucleic Acids and Proteins in Plants I**. p.438–458, 1982.

IZADPANAH, Arash.; GALLO, Richard. Antimicrobial peptides. **Journal of the american academy of dermatology**. v.52, n.3, p.381-390, mar, 2005.

JAYASANKAR, Subramanian; LI, Zhijian; GRAY, Dennis. Constitutive expression of *Vitis vinifera* thaumatin-like protein after in vitro selection and its role in anthracnose resistance. **Functional plant biology**. v.30, n.11, p.1105-1115, nov, 2013.

JELLOULI, Neila et al. Proteomic and transcriptomic analysis of grapevine PR10 expression during salt stress and functional characterization in yeast. **Plant molecular biology reporter**, v.28, n.1, p.1-8, mar, 2010.

KITAJIMA, Sakihito; SATO, Fumihiko. Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. **The Journal of Biochemistry**, v.125, n.1, p1-8, jna, 1999.

KUKURBA, Kimberly; MONTGOMERY, Stephen. RNA sequencing and analysis. **Cold Spring Harbor protocols**. v.11, p.951-969, abril, 2015.

LACERDA, Ariane. Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers in Microbiology**, v.5, n.116, p.10, abril, 2014.

LAM, Hon et al. Silicon era of carbon-based life: application of genomics and bioinformatics in crop stress research. In **Crop Breeding**. p.159-208, 2016.

LEBEL, Sylvain et al. Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10 multigene family. **BMC plant biology**. v. 10, n. 1, p. 184, aug, 2010.

LESK, Arthur. Introdução à Bioinformática. Tradução da 2ª edição. Editora Artmed, Porto Alegre, Brasil, 2008.

LI, Zhijian; DHEKNEY, Sadanand. PR-1 gene family of grapevine: a uniquely duplicated PR-1 gene from a *Vitis* interspecific hybrid confers high level resistance to bacterial disease in transgenic tobacco. **Plant cell reports**. v.30, n.1, p.1-11, out, 2011.

LIU, Juan; STURROCK, Rosa; EKRAMODDOULLAH, Abul. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. **Plant cell reports**. v.29, n.5, p.419-436, mai, 2010.

LU, Xiang. et al. RNA-seq Analysis of Cold and Drought Responsive Transcriptomes of *Zea mays* ssp. *mexicana* L. **Frontiers in Plant Science**. v.8, n.136, fev, 2017

LOPES, Daniela; NASCIMENTO, Ana. Situação Atual do Cancro Bacteriano da Videira no Semi-Árido Nordeste. In: **Seminário novas perspectivas para o cultivo**

de uvas sem sementes no Vale do São Francisco. Petrolina: Embrapa Semi-Árido. Documento v.185, p.68-76. jun. 2004.

MA, Qian; YANG, Jingli. Transcriptome profiling and identification of the functional genes involved in berry development and ripening in *Vitis vinifera*. **Gene**, v.680, p.84-96, jan, 2019.

MALAVOLTA JUNIOR V.A. et al. Resistência de variedades de videira a *Xanthomonas Campestris* pv. *viticola*. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.70, n.3, p.373-376, set, 2003.

MANNERS, John. Purification, characterisation and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. **European Journal of Biochemistry**, v.244, n.3, p. 743-749, jul, 1997.

MARTINEZ, Manuel. From plant genomes to protein families: computational tools. **Computational and structural biotechnology journal**, v.8, n.10, p.1-5, 2013.

MARCUS, John. et al. Purification, characterisation and cDNA cloning of an antimicrobial peptide from *Macadamia integrifolia*. **European Journal of Biochemistry**. v.244, n.3, p. 743-749, jul, 1997.

MARGUERAT, Samuel; WILHELM, Brian; BAHLER, Jurg. Next-generation sequencing: applications beyond genomes. **Biochemical Society Transactions**. v. 36, n. 5, p. 1091, out, 2008.

MARX, Florentine. Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: a comparative study regarding expression, structure, function and potential application. **Applied microbiology and biotechnology**. v.65, n.2, p.133-142, ago, 2004.

MELLO, Loiva. Relatório da avaliação de impactos econômicos das novas cultivares sem sementes. **Brs Vitória e Brs Isis no Vale São Francisco – 2017**, p.1-8, 2018.

MENDEZ, Enrique et al. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. **The FEBS Journal**, v.194, n.2, p.533-539, dez, 1990.

MESTRE, Pere; ARISTA, Gautier; PIRON, Marie. Identification of a *Vitis vinifera* endo- β -1, 3-glucanase with antimicrobial activity against *Plasmopara viticola*. **Molecular plant pathology**, v.18, n.5, p. 708-719, mai, 2017.

MÉTRAUX, Jean. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal Plant Pathology**. v.107, p.13-18, jna, 2001.

MISRA, Rajesh; et al. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic *Arabidopsis*. **Scientific reports**. v.6, n.25340, p.1-14, mai, 2016.

MOCHIDA, Keiichi; SHINOZAKI, Kazuo. Genomics and bioinformatics resources for crop improvement. **Plant & Cell Physiology**. v.51, n.4, p.497-523, abril, 2010.

MUNIS, Farooq et al. A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium Dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.393, n.1, p.38-44, 2010.

MUTAWILA, C et al. Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Eutypa lata* and *Trichoderma atroviride* culture filtrates: expression of defence-related genes and phenotypes. **Protoplasma**, v.254, n.2, p.863-879, jun, 2017.

NANNI, V et al. VvAMP2, a grapevine flower-specific defensin capable of inhibiting *Botrytis cinerea* growth: insights into its mode of action. **Plant Pathology**. v.63, p.899–910, 2014.

NOONAN, Joseph., WILLIAM, Williams., & SHAN, Xueyan. Investigation of antimicrobial peptide genes associated with fungus and insect resistance in maize. **International journal of molecular sciences**, v.18, n.9, p.1938, 2017.

NARUSAKA, Yoshihiro et al. High-throughput screening for plant defense activators using a β -glucuronidase-reporter gene assay in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biotechnology** v.26, p.345–349, 2009.

NASCIMENTO, Ana; Mariano, Rosa. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.301-307, jan-fev, 2004.

NASCIMENTO, Ana et al. Reaction of grapevine clones to *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, based on epidemiological components of bacterial canker. **Ciência Rural**. v.36, n.1, p.1-7, 2006.

NEALE, A. D et al. Chitinase, beta-1, 3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. **The Plant Cell**. v.2, n.7, p.673-684, 1990.

NIRMALA, Grace; CELSIA, Evangeline; SWAMINATHAN, Akila. Cytotoxicity and apoptotic cell death induced by *Vitis vinifera* peel and seed extracts in A431 skin cancer cells. **Cytotechnology**, v.70, n.2, p. 1-18, Out, 2017.

O'ROURKE, Jamie et al. An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. **BMC Genomics**. v.15, n.866, 2014.

International Organisation of Vine and Wine (OIV), Disponível em: <<http://www.oiv.int/en/>> Acesso em: Dezembro 2016

PELEGRINI, Patricia; FRANCO, Octavio. Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v.37, n.11, p.2239-2253, 2005.

PELEGRINI, Patricia; MURAD, Andre; SILVA, Luciano. Identification of a novel storage glyceric-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria. **Peptides** v.29, n8, p. 1271-1279, ago, 2008.

PELEGRINI, Patricia; DEL SARTO, Rafael; SILVA, Osmar. Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. **Biochemistry research international**, p.1-9, Jan, 2011.

PEREIRA-SANTANA, Alejandro et al. Transcriptional profiling of sugarcane leaves and roots under progressive osmotic stress reveals a regulated coordination of gene expression in a spatiotemporal manner. **PLoS One**. v.12, n.12, 2017.

PINNA, Christian; MORAZZONI, Paolo; SALA, Angelo. Proanthocyanidins from *Vitis vinifera* inhibit oxidative stress-induced vascular impairment in pulmonary arteries from diabetic rats. **Phytomedicine**, v.25, p, 39-44, Fev, 2017.

POWERS, Jon; HANCOCK, Robert. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. **Peptides**, v.24, n.11, p. 1681-1691, nov, 2013.

PROTAS, José; CAMARGO, Umberto; MELO, Loiva. (2014) A vitivinicultura brasileira: realidade e perspectivas. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitivinicultura/> (Junho de 2017).

REDDY, Kudumula; YEDERY, Roshan; ARANHA, Clara. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.24, n.6, p.536-547, Dez, 2004.

ROSA, Sergio; SIMÕES, Pedro. Desafios da vitivinicultura brasileira. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 67-90, 2004.

SAGARAM, Uma et al Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. **PLoS One**, .v.6, n.4, e18550, 2011.

SAKAMOTO, Yuichi et al. Lentinula edodes tlg1 encodes a thaumatin-like protein that is involved in lentinan degradation and fruiting body senescence. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 793-801, 2006.

SELS, Jals; MATHYS, Janick; DE CONINCK, Barbara. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant physiology and biochemistry**, v.46, n.11, p. 941-950, Nov, 2008.

SILVA, Paulo; CORREIA, Rebert. Caracterização social e econômica da cultura da videira. In: LEAO, P. C. de S. (Org.). **Cultivo da videira. 2ed**. Petrolina-PE: Embrapa Semiárido, p.1-10, 2010.

SILVA, Carlos et al. **Plant antimicrobial peptides: state of art and perspectives in the omics era**. Curr. Prot. Pept. Sci. In Press, 2019.

SILVERSTEIN, Kevin et al. Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, 138.2: 600-610, 2005.

SINHA, Mau; SINGH, Rashmi; KUSHWAHA, Gajraj. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. **The Scientific World Journal**, p.1-19, 2014.

SOUZA, Luciani; RHODEN, Sandro; PAMPHILE, João. A importância das Ômicas como ferramentas para o estudo da prospecção de microrganismos: perspectivas e desafios. **Revista UNINGÁ Review**. Vol.18, n.2, pp.16-21. 2014.

SUNDAR, A.; VELAZHAHAN, R., NAGARATHINAM, S; VIIDHYASEKARAN, P. Induction of pathogenesis-related proteins in sugarcane leaves and cell-cultures by a glycoprotein elicitor isolated from *Colletotrichum falcatum*. **Biologia Plantarum**, v.52, n.2, p.321-328, 2008.

SCHUTTE, Brian et al. Discovery of five conserved β -defensin gene clusters using a computational search strategy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99(4), 2129-2133, 2002.

SHANGGUAN, Lingfei et al. RNA-Sequencing Reveals Biological Networks during Table Grapevine ('Fujiminori') Fruit Development. **PLoS One**. v.12, n.1, e0170571, 2017.

SHUKLA, Lata; CHINNUSAMY, Viswanathan; SUNKAR, Ramanjulu. The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses. **Biochimica et Biophysica**, v.1779, n.11, p.743-748, nov, 2008.

SRIPRIVA, Rajasekaran.; PARAMESWARI, Chidambaram.; VELUTHAMBI, Karuppannan. Enhancement of sheath blight tolerance in transgenic rice by combined expression of tobacco osmotin (*ap24*) and rice chitinase (*chi11*) genes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.53, p.12–21, 2017.

TERRAS, F.R.G; EGGERMONT, K., KOVALEVA, V., RAIKHEL. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. **The Plant Cell**, maio, 1995.

TONI, Bernadette et al. RNA-seq data of *Oryza sativa* cultivar Kuku Belang under PEG treatment. **Data in brief**, n.14, p.260-266, 2017.

TRINDADE, Loiselene; LIMA, Mirtes; FERREIRA, Marisa. Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. **Fitopatologia Brasileira**. v.30, p.46-54, 2005.

THOMMA, Bart; EGGERMONT, Kristel; PENNINCKX, Iris. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v.95, n.25, p.15107-15111, dez, 1998.

THOMMA, Bart; BROEKAERT, Willem. Tissue-specific expression of plant defensin genes PDF2.1 and PDF2.2 in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.36, n.7, p. 533-537, Jul, 1998.

VALLAD, Gary; GOODMAN, Robert. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop science**, 44(6), 1920-1934, 2004.

VARMA, A; SHRIVASTAVA, N. The role of plant genomics in biotechnology. **BIOTECHNOLOGY-Volume VIII: Fundamentals in Biotechnology**, v.8, n.317, 2009.

VAN LOON, Leendert. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review Phytopathology**. v.44, p.135-162, 2006.

VELAZHAHAN, Rethinasamy; DATTA, Swapan; MUTHUKRISHNAN, Subbaratnam. The PR-5 family: thaumatin-like proteins. In *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. **CRC Press**. p.107– 129, 1999.

VERLI, Hugo. O que é Bioinformática? In: VERLI H. (Org). **Bioinformática: da Biologia à flexibilidade molecular**. 1ª edição. Porto Alegre, Brasil. p.282, 2014.

VOIT, Eberhard; RADIVOYEVITCH, Tomas. Biochemical systems analysis of genome-wide expression data. **Bioinformatics**, v.16, n.11, p.1023-1037, 2000.

WANDERLEY-NOGUEIRA, Ana et al. Insight on pathogen defense mechanisms in the sugarcane transcriptome. **Functional Plant Science Biotechnology**, v.6, p.134-148, 2012a.

WANDERLEY-NOGUEIRA, Ana et al. An overall evaluation of the Resistance (*R*) & Pathogenesis Related (*PR*) superfamilies in soybean, as compared with *Medicago* & *Arabidopsis*. **Genetics & Molecular Biology**. v.35, n.1, p.260-271, 2012b.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics**, v.10, n.1, p.1-7, jan 2009.

WU, Jingni; KIM, Sang; KANG, Kyu.; KIM, Ju; PARK, Sang; GUPTA, Ravi; KIM, Yong. Overexpression of a pathogenesis-related protein 10 enhances biotic and abiotic stress tolerance in rice. **The plant pathology journal**, v.32, n.6, p.552, 2016.

YAN, Xiaoxiao; QIAO, Hengbo; ZHANG, Xiuming. Analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) thaumatin-like protein (TLP) gene family and demonstration that TLP29 contributes to disease resistance. **Scientific reports**, v.7, n.1, p.1-14, jun, 2017.

ZENG, Ailan et al. RNA sequencing analysis of salt tolerance in soybean (*Glycine max*). **Genomics**. 2018.

ZHANG, Xudong et al. Overexpression of the arabidopsis *NPR1* gene in citrus increases resistance to citrus canker. **European Journal Plant Pathology**. v.128, p.91-100, 2010.

ZHU, T., Song, F., & Zheng, Z. Molecular characterization of the rice pathogenesis-related protein, OsPR-4b, and its antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. **Journal of phytopathology**, v.154, n.6, p.378-384, 2006.

ZHU, Shunyi. Discovery of six families of fungal defensin-like peptides provides insights into origin and evolution of the CSab defensins. **Molecular Immunology**, v.45, n.3, p. 828-838, fev, 2008.