

O DESPERTAR DA FORÇA DE DEFESA: ANÁLISE GENÔMICA E
TRANSCRIPTÔMICA DE DEFENSINAS E LTPs EM ESPÉCIES
SELVAGENS E CULTIVARES COMERCIAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR

LEANDRO DE OLIVEIRA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2018

O DESPERTAR DA FORÇA DE DEFESA: ANÁLISE GENÔMICA E
TRANSCRIPTÔMICA DE DEFENSINAS E LTPs EM ESPÉCIES
SELVAGENS E CULTIVARES COMERCIAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR

LEANDRO DE OLIVEIRA SILVA

“Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia e Biotecnologia.”

Orientadora: Prof^a. Clícia Grativol Gaspar de Matos

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2018

O DESPERTAR DA FORÇA DE DEFESA: ANÁLISE GENÔMICA E TRANSCRIPTÔMICA DE DEFENSINAS E LTPs EM ESPÉCIES SELVAGENS E CULTIVARES COMERCIAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR

LEANDRO DE OLIVEIRA SILVA

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.”

Aprovada em 21 de fevereiro de 2018.

Comissão Examinadora:

Prof. Felipe Klein Ricachenevsky (D.Sc., Biologia Celular e Molecular) – UFSM

Prof^a. Kátia Valevski Sales Fernandes (D.Sc., Bioquímica e Biologia Molecular) –
UENF

Prof. André de Oliveira Carvalho (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF

Prof^a. Clícia Grativol Gaspar de Matos (D.Sc., Química Biológica) – UENF
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por se mostrar presente de tantas formas que eu não saberia enumerar. Obrigado por estar sempre comigo, atender às minhas preces e cuidar de mim todas as vezes que me senti sem direção;

À Prof^a. Clícia Grativol Gaspar de Matos, minha orientadora, minha amiga, que abriu as portas de seu laboratório e acreditou em meu potencial. Sem seu apoio e incentivo certamente eu não estaria onde hoje estou. Sua empolgação é contagiosa; seus ensinamentos, memoráveis; sua dedicação, imensurável, e seu amor (pelos orientandos e pela ciência), incontestável. Espero ter correspondido às suas expectativas. Obrigado por me ensinar a contar histórias científicas;

À Prof^a. Valdirene Moreira Gomes, por aceitar colaborar com este projeto cedendo os equipamentos, reagentes de seu laboratório e, principalmente, seu entusiasmo;

Ao Prof. Paulo Ferreira, pelo uso do genoma e dos transcriptomas de cana-de-açúcar e à Mestre Lídia Pereira Gomes, pela preciosa ajuda e paciência inesgotável na (árdua) tarefa de me auxiliar na bancada;

À Lilia Almeida, por ser minha amiga. Sem seu apoio talvez eu não estivesse aqui. Obrigado por me ajudar na instalação em Campos dos Goytacazes, e em todos os momentos em que precisei, provando que amigos de verdade são para todas as horas, mesmo;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo custeio e financiamento deste trabalho. À Gabriela da Costa Vieira Bard, por se dispor a revisar esta dissertação e aos professores da banca, por doarem parte de seu tempo para avaliar este trabalho;

A todos os amigos do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), pela amizade e companheirismo, sem os quais meus dias não seriam tão azuis quanto foram. Amo vocês!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIACÕES.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Taxonomia, aspectos gerais e econômicos da cana-de-açúcar.....	1
1.2. Constituição genética e hibridização da cana-de-açúcar.....	3
1.3. Patógenos e cana-de-açúcar.....	7
1.4. Mecanismos de defesa.....	8
1.5. Peptídeos antimicrobianos.....	12
1.5.1. Defensinas.....	13
1.5.2. LTPs.....	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo Geral.....	22
2.2. Objetivos Específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Análises <i>in silico</i>	23
3.1.1. Alinhamento de defensinas e LTPs contra sequências genômicas de cana-de-açúcar.....	23
3.1.2. Alinhamento de defensinas e LTPs contra transcriptomas de cana-de-açúcar.....	24
3.1.3. Predição da estrutura gênica e da sequência de aminoácidos.....	24
3.1.4. Comparação estrutural das defensinas e LTPs previstas a partir de <i>scaffolds</i> e transcritos.....	24
3.1.5. Alinhamentos comparativos das defensinas e LTPs.....	25
3.1.6. Obtenção de árvores filogenéticas de defensinas e LTPs.....	25
3.1.7. Análise de expressão de defensinas e LTPs em bibliotecas de RNA-seq.....	25
3.1.8. Análise da região promotora de genes de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar.....	26
3.1.9. Modelagem tridimensional de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar.....	26
3.2. Identificação de peptídeos de defensinas e LTPs em folhas de cana-de-açúcar.....	26
3.2.1 Material vegetal.....	26

3.2.2. Extração ácida de proteínas das folhas de cana-de-açúcar.....	27
3.2.3. Eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE.....	28
3.2.4. Preparo das amostras e condições de corrida	28
3.2.5. Visualização das proteínas	29
4.1. Seleção de sequências de defensinas e LTPs.....	30
4.2. Identificação de defensinas e LTPs em sequências genômicas de cana-de-açúcar	34
4.3. Caracterização de transcritos de defensinas e LTPs em bibliotecas de RNA-seq de cana-de-açúcar	36
4.4. Árvores filogenéticas de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar.....	39
4.5 Análise de expressão de defensinas e LTPs em bibliotecas de RNA-seq ...	48
4.6. Análise da região promotora dos genes de defensinas e LTPS.....	51
4.7. Modelagem tridimensional de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar	56
4.8. Identificação de peptídeos de defensinas e LTPs em folhas de cana-de-açúcar	60
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÕES.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Processo de obtenção dos cultivares modernos de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp.). Adaptado de (GRATIVOL, 2014).	4
Figura 2 Representação esquemática dos cromossomos de cultivares atuais de cana-de-açúcar, mostrando um genoma altamente poliplóide e aneuplóide, com a ocorrência de cromossomos recombinantes e de herança desigual. Adaptado de (D'HONT, 2005).	5
Figura 3 Mecanismos de reconhecimento e defesa de plantas contra patógenos. Adaptada de (BENKO-ISEPPON et al., 2010).....	10
Figura 4 Estrutura tridimensional compartilhadas por todas as defensinas de plantas.	14
Figura 5 Estruturas tridimensionais de LTPs de plantas.....	20
Figura 6 Fluxograma de identificação e caracterização de defensinas e LTPs em cana-de-açúcar.	23
Figura 7 Extração ácida de folhas de cana-de-açúcar a partir da descrição de (EGOROV et al., 2005).	27
Figura 8 Agrupamentos de defensinas de acordo com suas similaridades quanto à constituição peptídica.....	32
Figura 9 Agrupamentos de defensinas de acordo suas similaridades quanto à constituição de aminoácidos.....	35
Figura 10 <i>Heatmaps</i> de abundância de transcritos de defensinas e LTPs identificados em transcriptomas de cana-de-açúcar.	38
Figura 11 Alinhamento comparativo de sequências de aminoácidos de defensinas preditas a partir de <i>scaffolds</i> e de transcritos de cana-de-açúcar e defensinas de outras espécies de plantas, excluindo os aminoácidos do peptídeo sinal e do domínio C-terminal.	41
Figura 12 Árvore filogenética de defensinas de cana-de-açúcar e outras defensinas de plantas monocotiledôneas e eudicotiledôneas ..	43
Figura 13 Alinhamento comparativo de sequências de aminoácidos de LTPs preditas a partir de <i>scaffolds</i> e de transcritos identificados no genoma de cana-de-açúcar (LTPs de 1 a 9) e LTPs de outras espécies de plantas, excluindo os aminoácidos do peptídeo sinal e do domínio C-terminal.	45

Figura 14 Árvore filogenética de LTPs identificadas em cana-de-açúcar e outras LTPs de plantas monocotiledôneas e eudicotiledôneas	47
Figura 15 <i>Heatmaps</i> de expressão de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar.....	50
Figura 16 Fatores de transcrição identificados na região promotora de genes de defensinas.....	54
Figura 17 Fatores de transcrição identificados na região promotora de genes de LTPs.....	55
Figura 18 Comparação entre defensinas de diferentes cultivares de cana-de-açúcar (SP70-1143, RB867515 e RB72454) e as espécies selvagens (<i>Saccharum spontaneum</i> e <i>Saccharum officinarum</i>)..	71
Figura 19 Comparação entre LTPs de diferentes cultivares de cana-de-açúcar (SP701143, RB867515 e RB72454) e as espécies selvagens (<i>Saccharum spontaneum</i> e <i>Saccharum officinarum</i>)..	73
Figura 20 Perfil eletroforético em gel unidimensional SDS-Tricina-PAGE dos extratos de folha de cana-de-açúcar..	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 A variação do número de aminoácidos presentes nas LTPs permite classificá-las em IX tipos. Adaptado de Boutrot et al. (2008).....	21
Tabela 2 Correspondência entre as defensinas identificadas por Belarmino <i>et. al</i> (2010) e aquelas identificadas por De-Paula et. al (2008).....	30
Tabela 3 Sequências de LTPs de sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>) foram retiradas do artigo de (WANG et al., 2012) e tiveram seus IDs atualizados de acordo com a atual nomenclatura do Phytozome (GOODSTEIN et al., 2012).....	33
Tabela 4 <i>Scaffolds</i> candidatos a defensinas no genoma da cana-de-açúcar.....	34
Tabela 5 <i>Scaffolds</i> candidatos de LTPs identificados no genoma da cana-de-açúcar.	36
Tabela 6 Defensinas selecionadas para alinhamento e obtenção de relacionamento filogenético com SODEFs identificadas por (BELARMINO et al., 2010) e (DE-PAULA et al., 2008) e <i>scaffolds</i> genômicos. Tabela adaptada de (CARVALHO; GOMES, 2011).....	40
Tabela 7 LTPs de plantas selecionadas para alinhamento e obtenção de relacionamento filogenético com LTPs identificadas no genoma de cana-de-açúcar (LTP de 1 a 9).....	44
Tabela 8 Fatores de transcrição identificados nas regiões promotoras de genes de defensinas e LTPs por meio dos programas TSSP (SOLOVYEV; SHAHMURADOV; SALAMOV, 2010) e PlantCARE (LESCOT, 2002).	51
Tabela 9 Comparação entre as defensinas preditas a partir dos <i>scaffolds</i> e aquelas usadas como referência.....	56
Tabela 10 Comparação entre as LTPs preditas a partir dos <i>scaffolds</i> e aquelas usadas como referência.....	59

LISTA DE ABREVIACÕES

- AA** - *Acidovorax avenae*
- AEC** – *antes da era comum*
- AMP** - peptídeo antimicrobiano (do inglês *antimicrobial peptide*)
- AVR** - proteína de avirulência
- BCA** - Ácido bicinconínico
- BLAST** - *Basic Local Alignment Search Tool*
- CS $\alpha\beta$** - elemento estrutural α -hélice folha- β estabilizado por cisteínas
- CT** - controle
- Dm-AMP1** - antifungal plant defensin from *Dahlia merckii*
- EST** - *Expressed Sequence Tag*
- ET** - etileno
- ETI** - *effector triggered immunity*
- FAPESP** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- GD** - *Gluconacetobacter diazotrophicus*
- IgE** - Imunoglobulina E
- JA** - ácido jasmônico
- kDa** - kilodalton
- LBMP** - Laboratório de Biologia Molecular de Plantas
- LTP** - proteína transportadora de lipídios
- MAPK** - *mitogen-activated protein kinases*
- MeJA** - metil jasmonato
- NBS-LRR** - *nucleotide-binding site leucine-rich repeat*
- NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*
- ORF** - *open reading frame*
- PAMP**- *pathogen-associated molecular patterns*
- PMSF** - Fluoreto de fenilmetilasulfonila
- PR** - proteína relacionada à patogênese
- PRR** - *pattern recognition receptors*
- PTI** - *pattern triggered immunity*
- PVPP** - Polivinilpirrolidona
- RNA-seq** - *mRNA sequencing*

ROS - espécies reativas de oxigênio
Rs-AFP2 - *Raphanus sativus* antifungal protein 2
SA - ácido salicílico
SAR - resposta sistêmica adquirida
Sd - *sugarcane defensin*
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SOBIC - *Sorghum bicolor*
SODEF - defensina de *Saccharum officinarum*
SPE10 - antifungal protein from *Pachyrhizus erosus*
SOF - *Saccharum officinarum* defensin
SUCEST - *Brazilian Sugarcane EST Project*
TFA - Ácido trifluoracético
TR7 - Transcriptoma de Referência 7-TR7
Tris - Hidroximetil amino etano
WD - *water deficit*

RESUMO

A cana-de-açúcar moderna (o híbrido interespecífico *Saccharum* spp.) é um cultivar de grande importância econômica, devido à sua alta capacidade de armazenamento de sacarose, sendo empregada principalmente na produção de açúcar e etanol. *Saccharum* spp. é resultante do cruzamento de *Saccharum officinarum*, denominada “cana nobre”, da qual herdou a alta capacidade de acúmulo de sacarose, e a espécie selvagem *Saccharum spontaneum*, da qual herdou a resistência e a adaptabilidade, em um processo iniciado no século XIX. A necessidade de suprir as demandas por produtos derivados da cana-de-açúcar exige a obtenção de híbridos com maior capacidade de armazenamento e que também sejam resistentes a doenças, principalmente aquelas causadas por fungos, bactérias e vírus, cujo principal efeito é a diminuição da produtividade da lavoura. Além disso, os mecanismos moleculares responsáveis pelas distintas capacidades de defesa observadas entre os híbridos e as espécies selvagens ainda não foram completamente elucidados, o que justifica a necessidade de maiores estudos a respeito deste aspecto. A produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs) é um dos mecanismos que compõe a linha de frente da defesa de animais e plantas. Dentre os AMPs, as defensinas e as proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) são moléculas com grande potencial de ação antimicrobiana. Este trabalho teve como principal objetivo caracterizar defensinas e LTPs no genoma do cultivar SP70-1143 e em transcriptomas de espécies selvagens (*S. spontaneum* e *S. officinarum*) e híbridos (SP70-1143, RB867515 e RB72454) de cana-de-açúcar, assim como obter uma árvore filogenética das defensinas e LTPs caracterizadas e outros peptídeos de plantas. Também foram analisadas as regiões promotoras dos genes de defensinas e LTPs identificadas e as estruturas terciárias desses dois AMPs. Por fim, testaram-se protocolos de extração de peptídeos de folhas de cana-de-açúcar. Foram identificados seis genes de defensinas e nove genes de LTPs no banco de sequências genômicas de cana-de-açúcar. As proteínas preditas a partir dos genes exibiram os resíduos de aminoácidos conservados típicos das defensinas e LTPs. A análise das regiões promotoras nos permitiu identificar fatores de transcrição característicos de proteínas relacionadas à patogênese (PRs), tais como elementos responsivos aos hormônios vegetais ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA) e

etileno (ET). Análises de expressão de transcritos de defensinas e LTPs em bibliotecas de transcriptoma de cana-de-açúcar submetida a infecção por *Acidovorax avenae* mostraram aumento de expressão desses dois AMPs, sugerindo a participação destes na resposta à infecção por *A. avenae*. Análise de expressão de transcritos de defensinas e LTPs em biblioteca de transcriptoma de cana-de-açúcar submetida a déficit hídrico e inoculação com a bactéria benéfica *Gluconacetobacter diazotrophicus* mostraram que defensinas e LTPs parecem responder mais ao déficit hídrico do que à bactéria benéfica. A modelagem tridimensional de defensinas e LTPs de diferentes cultivares e espécies selvagens de cana-de-açúcar mostrou a presença dos elementos secundários típicos destas proteínas e alta conservação tridimensional entre elas. Foram testados três protocolos de extração de proteínas: extração alcoólica, ácida e em tampão-fosfato. A extração ácida mostrou-se mais eficiente para a obtenção de peptídeos de baixa massa molecular (6-10 kDa), compatíveis com a massa de defensinas e LTPs. A caracterização de defensinas e LTPs forneceu novos elementos para um maior entendimento dos mecanismos de defesa dos diferentes híbridos, contribuindo para posteriores estudos e melhoramento da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Saccharum* spp., defesa vegetal, AMPs, defensinas, LTPs

ABSTRACT

Modern sugarcane (the hybrid *Saccharum spp.*) is a cultivar of great economic importance, due to its high sucrose storage capacity for the production of sugar and ethanol. *Saccharum spp.* was generated from crossings between sugarcane wild species in a process dating back to the 19th century. The hybrid inherited the high ability for accumulation of sucrose from *Saccharum officinarum* and the resistance and adaptability from *Saccharum spontaneum*. The need for high demands for sugarcane products requires the generation of hybrids with greater storage capacity and resistance to diseases, especially those caused by fungi, bacteria and virus, which can reduce crop productivity. In addition, the molecular mechanisms responsible for the distinct defense capacities observed between hybrids and wild species have not yet been fully elucidated, what justifies further studies on this aspect. The production of antimicrobial peptides (AMPs) is one of the first line of defense in animals and plants. Among these, defensins and lipid transfer proteins (LTPs) are molecules of great potential for antimicrobial action. This work aimed to characterize defensins and LTPs in the genome of SP70-1143 sugarcane cultivar and in transcriptomes of wild species (*S. spontaneum* and *S. officinarum*) and hybrids (SP70-1143, RB867515 and RB72454), as well as to analyse the phylogenetic relatedness between the characterized defensins and LTPs and other plant proteins. We also analyzed the promoter regions of sugarcane defensins and LTPs genes and the tertiary structures of these AMPs. Finally, protocols were tested for the extraction of peptides from sugarcane leaves. Six defensin and nine LTP genes were identified in the genomic sequence database of sugarcane. Proteins predicted from the genes exhibited the typical conserved amino acid residues of defensins and LTPs. The analysis of the promoter regions allowed us to identify transcription factors characteristic of pathogenesis-related proteins (PRs), such as elements responsive to salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA) and ethylene (ET) plant hormones. Expression analysis of defensins and LTPs transcripts in RNA-seq libraries from sugarcane submitted to *Acidovorax avenae* infection showed increased expression of these two AMPs. Expression analysis of defensins and LTPs transcripts in RNA-seq libraries from sugarcane submitted to water deficit and inoculation with the beneficial bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* showed

that defensins and LTPs appear to respond more to water deficit than to beneficial bacteria. The three-dimensional modeling of defensins and LTPs from different sugarcane wild species and cultivars showed the presence of typical secondary elements found in these proteins and high three-dimensional conservation between them. Three protein extraction protocols were tested: alcoholic, acidic and phosphate-buffered extraction. Acid extraction was more efficient to obtain low molecular weight peptides (6-10 kDa), compatible with the mass of defensins and LTPs. The characterization of defensins and LTPs provided new elements for a better understanding of the defense mechanisms of the different hybrids, contributing to further studies and improvement of sugarcane.

Key words: *Saccharum* spp., plant defense, AMPs, defensins, LTPs

1. INTRODUÇÃO

1.1. Taxonomia, aspectos gerais e econômicos da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar moderna (o híbrido *Saccharum* spp.) é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae, a qual inclui importantes gêneros de cereais, como sorgo (*Sorghum bicholor*), milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), cevada (*Hordeum vulgare*), aveia (*Avena sativa*) e arroz (*Oryza sativa*) (DANIELS; ROACH, 1987). Foi descrita pela primeira vez por Lineu, em 1757, no livro “Species Plantarum” (HITCHCOCK, 1923). Inicialmente, o gênero *Saccharum* incluía apenas duas espécies: *S. officinarum* L. e *S. spicatum* L., tendo sido esta última transferida para o gênero *Perotis* (DILLON et al., 2007). Várias revisões taxonômicas aconteceram durante o século XX, culminando com a criação do grupo chamado “Complexo *Saccharum*”, formado por gêneros com espécies capazes de realizar hibridizações entre si (MUKHERJEE, 1957).

Em 1987, J. Daniels e B. T. Roach propuseram a hipótese mais aceita atualmente para a evolução e domesticação da cana-de-açúcar, que a classifica como membro da família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Andropogoneae, subtribo Saccharinae e gênero *Saccharum* (DANIELS; ROACH, 1987; GRIVET et al., 2004).

Cultivada em regiões tropicais e subtropicais de todo o planeta, a origem da cana-de-açúcar não é bem definida, acreditando-se que tenha primeiro se estabelecido na Melanésia, Indonésia e Papua Nova Guiné por volta de 6.000 A.E.C., disseminando-se posteriormente para o Pacífico Sul, Índia, China e proximidades (MUKHERJEE, 1957). Tornou-se conhecida no Ocidente, pela primeira vez, durante as conquistas de Alexandre, o Grande, há mais de dois mil anos (GRIVET et al., 2004). Os primeiros exemplares a chegarem ao Brasil vieram da Ilha da Madeira (Portugal) por volta de 1515, sendo a primeira usina de açúcar brasileira fundada em 1532 (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

O gênero *Saccharum* é constituído de 35-40 espécies, distribuídas entre dois centros de diversidade: África e Ásia (Velho Mundo) e América do Norte, Central e do Sul (Novo Mundo). A maior parte das espécies nativas (25) está na Ásia, sendo que a América do Norte possui seis espécies nativas e cinco introduzidas (BONNETT et al., 2008; WEBSTER; SHAW, 1995).

Cultivares de cana-de-açúcar possuem grande importância econômica, devido à sua alta capacidade de armazenamento de sacarose, cuja produção e subsequente acúmulo nos colmos é resultante de um ciclo envolvendo diversas enzimas que atuam nos órgãos-fonte e nos drenos (DAL-BIANCO et al., 2012). Estes cultivares, sob condições ideais, podem armazenar em seus colmos aproximadamente 700 mM de sacarose (até 62% do peso seco ou 25% do peso fresco) (BULL; GLASZIOU, 1963). O processo de armazenamento da sacarose depende de diferentes fatores, como: carregamento e descarregamento do floema durante a maturação; taxa de carregamento de sacarose no parênquima e vacúolo e, até mesmo, a temperatura (RAE et al., 2005). Fatores enzimáticos, morfológicos e as condições ambientais são responsáveis por diferentes cultivares de cana-de-açúcar possuírem capacidades distintas de armazenamento de sacarose (MOORE, 2005).

A cana-de-açúcar é empregada principalmente para a produção de açúcar e etanol (SCHUBERT, 2006), sendo responsável por fornecer aproximadamente 70% do açúcar produzido no mundo (BULL; GLASZIOU, 1963; CARSON; BOTHA, 2002; DE SOUZA et al., 2008; DILLON et al., 2007; LAKSHMANAN et al., 2005). O Brasil, maior produtor mundial de cana-de-açúcar, alcançou 658,7 milhões de toneladas somente na safra 2015/16 (CONAB, 2016). Contudo, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) prevê queda de 8,9% na safra 2018 devido a condições climáticas desfavoráveis (IBGE, 2017). Outras aplicações da cana-de-açúcar incluem a produção de cachaça, ração animal, xarope (SOLOMON, 2011) e, por meio do uso do bagaço, produção de papel (LAM et al., 2004) e geração de bioeletricidade (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008; WACLAWOVSKY et al., 2010).

Na década de 1970, com a implementação do Programa Pró-Álcool no Brasil, a cana-de-açúcar começou a ser empregada largamente para a produção de etanol (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011), que pode ser obtido por processo químico (hidratação do etileno) ou microbiológico (por fermentação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*) (RADECKA et al., 2015; STEFAN ROKEM; GREENBLATT, 2015). Atualmente, a maior parte do etanol produzido no mundo deve-se ao processo de fermentação alcoólica ou etanólica (HAHN-HÄGERDAL et al., 1991; JONES; THOMAS; MICHAEL INGLEDEW, 1994; MADALENO et al., 2016;

SILVA et al., 2005), onde as leveduras convertem o açúcar em etanol, energia, biomassa celular, gás carbônico e outros subprodutos. Os Estados Unidos da América (EUA) são os maiores produtores mundiais de etanol, pois eles também o obtêm a partir do milho (WANG et al., 2016). Somente em 2015, os EUA produziram 14,806 milhões de galões (aproximadamente 56 bilhões de litros), seguidos pelo Brasil (26 bilhões de litros), União Européia (5 bilhões de litros) e China (3 bilhões de litros) (RFA, 2016).

1.2. Constituição genética e hibridização da cana-de-açúcar

Uma parte significativa dos eventos de especiação em plantas acontece por meio da hibridização (SOLTIS; SOLTIS, 2009). Importantes cultivares modernos são híbridos e a cana-de-açúcar passou pelo mesmo processo (CHEN, 2010). Estima-se que algo em torno de 10% dos animais e 25% das plantas hibridizaram com pelo menos uma outra espécie ao longo de suas histórias evolutivas (MALLET, 2005). Esse número é ainda maior se considerarmos apenas as Angiospermas, cujas estimativas de hibridização variam de 30-35% a 70% das espécies, dependendo da referência (HECHT, 1972; MASTERSON, 1994).

Após a hibridização ocorre o choque genômico, uma resposta ao estresse resultante das alterações do genoma. Os genomas recém-formados estão submetidos à mobilidade de transposons e às rápidas alterações de tamanho, estrutura e controle, incluindo inserções, deleções e translocações (MCCLINTOCK, 1984). Além disso, a hibridização também pode levar a poliploidia, ou seja, o aumento do número de cópias do genoma. A poliploidia representa uma característica central na especiação de plantas (LUTZ, 1907), e é considerada um mecanismo evolutivo fundamental por duas razões: estar frequentemente associado à especiação; poder proporcionar um salto no surgimento de uma nova espécie e resultar em efeitos drásticos na evolução da linhagem posterior devido à duplicação genômica (WOOD et al., 2009). Além disso, desempenha um importante papel na modificação dos padrões de expressão global dos genes, ao originar duas ou mais cópias dos mesmos (ADAMS, 2007; HEGARTY et al., 2006; OSBORN et al., 2003; STUPAR; HERMANSON; SPRINGER, 2007).

Dois tipos de poliplóides são classicamente reconhecidos: aqueles que resultam da multiplicação de um cromossomo específico e aqueles originários da

fusão de conjuntos de cromossomos estruturalmente diferentes, chamados autopoliplóides e alopoliplóides, respectivamente (KIHARA; ONO, 1926). Poliploidia normalmente ocorre em conjunto com a hibridização interespecífica, ou seja, gerando novas espécies alopoliplóides, culminando em reestruturação transcriptômica, metabolômica e proteômica (LEITCH; LEITCH, 2008).

Há evidências de que mais de 90% das angiospermas sofreram uma ou mais duplicações genômicas e muitas delas se tornaram poliplóides (ADAMS; WENDEL, 2005; CUI et al., 2006; SOLTIS et al., 2015). Importantes cultivares domésticos, como o trigo (*Triticum aestivum*), a soja (*Glycine max*) e o algodão (*Gossypium hirsutum*) sofreram eventos de duplicação total do genoma (PANCHY; LEHTI-SHIU; SHIU, 2016).

Saccharum spp. é um híbrido resultante do cruzamento das espécies selvagens *Saccharum officinarum* ($2n = 80$), denominada “cana nobre”, e *Saccharum spontaneum* ($2n = 36-128$) (DILLON et al., 2007; EDMÉ et al., 2005), com contribuições genômicas menores de *Saccharum robustum*, *Saccharum sinense*, *Saccharum barberi*, *Erianthus* e *Miscanthus* (AL-JANABI et al., 1993; FERREIRA et al., 2016), em um processo iniciado no século XIX (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011) (**Figura 1**).

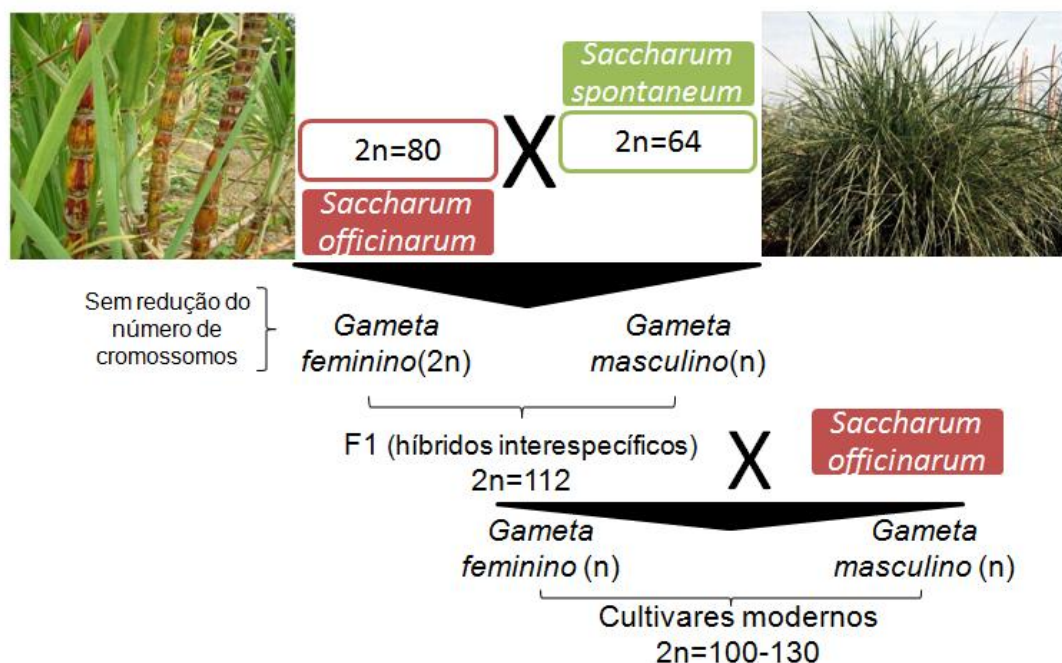


Figura 1: Representação esquemática do processo de obtenção dos cultivares modernos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). Adaptado de Grativol (2014).

Saccharum spp. possui entre 100-130 cromossomos, sendo de 10% a 20% deles provenientes de *S. spontaneum*, 5 a 17% de cromossomos recombinantes compostos por parte de *S. officinarum* e parte de *S. spontaneum* e o restante de cromossomos de *S. officinarum* (D'HONT, 2005) (**Figura 2**). As hipóteses sobre a estrutura genômica e a evolução da cana-de-açúcar se baseiam principalmente na distribuição do número de cromossomos entre as espécies, e estudos recentes têm sugerido um número básico de 10 cromossomos para *S. officinarum* e 8 para *S. spontaneum* (D'HONT et al., 1996, 1998).

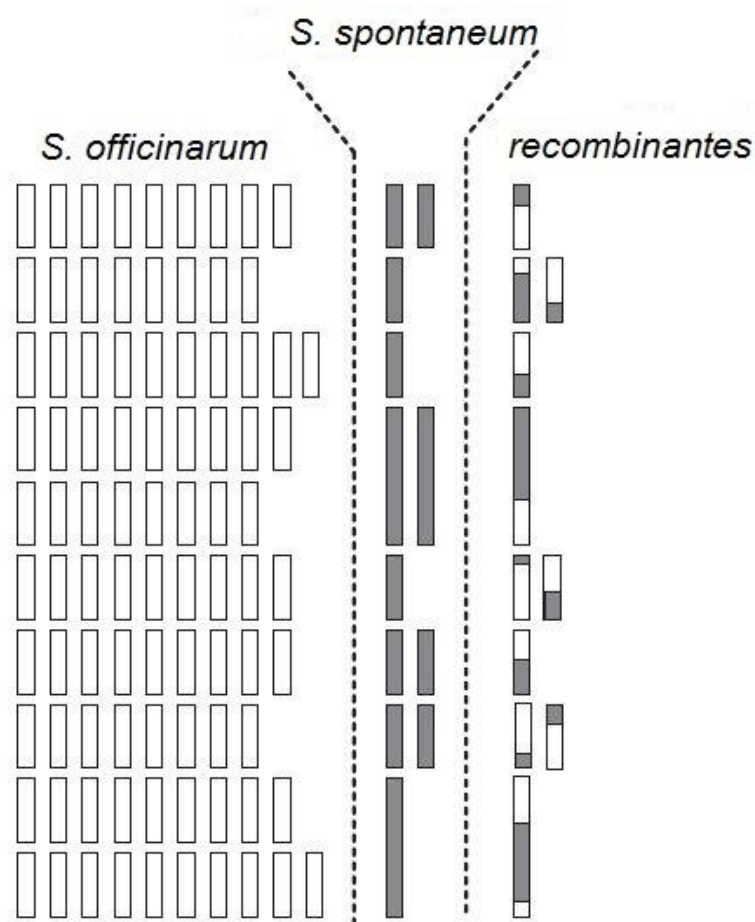


Figura 2: Representação esquemática dos cromossomos de cultivares atuais de cana-de-açúcar, mostrando um genoma altamente poliplóide e aneuplóide, com a ocorrência de cromossomos recombinantes e de herança desigual. As barras brancas correspondem aos cromossomos de *S. officinarum* e, as cinzas, aos cromossomos de *S. spontaneum*. Cromossomos homólogos (ou homeólogos) estão em uma mesma linha. Adaptado de D'Hont (2005).

No processo de melhoramento genético de qualquer cultivar é essencial uma escolha minuciosa dos parentais, inclusive no caso da cana-de-açúcar, cujos programas podem demorar mais de uma década até a liberação de novas variedades (FERREIRA et al., 2005). Os melhoristas baseiam-se em cruzamentos interespecíficos e retrocruzamentos com *S. officinarum* como forma de produzir novos híbridos, utilizando uma base genética obtida nos primeiros melhoramentos, do início do século XX. Entretanto, o uso de progenitores próximos pode diminuir a diversidade genética devido à depressão por endogamia (FERREIRA et al., 2005). Cruzamentos entre parentes tendem a conduzir à homozigose, com o surgimento de características deletérias, sendo que o uso de indivíduos geneticamente distantes pode contribuir para o melhoramento genético da cana-de-açúcar (BISON et al., 2004; RODRIGUES et al., 2001).

O sequenciamento completo do genoma da cana-de-açúcar é um desafio pela natureza de sua estrutura altamente poliplóide e aneuplóide e também pelo seu tamanho (8 a 10 Gb) (MOORE, 2005). A complexidade genômica, inclusive, representa uma dificuldade a mais no processo de melhoramento genético deste cultivar, caracterizado principalmente por sua natureza multigênica/multialélica (GRIVET; ARRUDA, 2002; TOMKINS et al., 1999) e geralmente um número cromossômico superior a 100 (HOARAU et al., 2001; JANNOO et al., 1999). Na ausência de um genoma completo sequenciado, bibliotecas de sequências expressas (ESTs, do inglês *Expressed Sequence Tags*) podem ser utilizadas como importantes fontes de dados para análises de duplicação do genoma ancestral (BLANC; WOLFE, 2004; CUI et al., 2006; SCHLUETER et al., 2004). O programa SUCEST (do inglês *Brazilian Sugarcane EST Project*), criado pela FAPESP, disponibilizou milhares de ESTs, organizados em bibliotecas de diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento vegetal, assim como tecidos infectados com bactérias endofíticas (ROSSI; ARAUJO; VAN SLUYS, 2001; VETTORE et al., 2003). Outro banco de dados importante para cana-de-açúcar é o de sequências genômicas filtradas por metilação, publicado por Grativol et al. (2014). Essas sequências foram usadas em uma avaliação de herança gênica das espécies selvagens nos híbridos modernos de cana-de-açúcar. Resultados sugeriram que genes envolvidos com o metabolismo de açúcar seriam herdados majoritariamente de *S. officinarum*,

enquanto que genes relacionados com a adaptação do híbrido ao estresse seriam herdados principalmente de *S. spontaneum*.

1.3. Patógenos e cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar comercial (*Saccharum* spp.) é a mais importante fonte de açúcar atualmente disponível (MANNERS, 2011). Contudo, sua produção é constantemente ameaçada por doenças, principalmente aquelas causadas por fungos e bactérias como, por exemplo, a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (FALLOON et al., 2006), agente causal do raquitismo-da-soqueira, que causa enormes prejuízos e não possui formas de combate, além do manejo adequado das lavouras (EVTUSHENKO et al., 2000).

Uma vasta gama de micro-organismos infecta/coloniza as culturas de cana-de-açúcar, sendo algumas das principais doenças: a escaldadura de folhas, causada pela bactéria *Xanthomonas albilineans* (BIRCH; PATIL, 1987; PERSLEY, 1973; ROTT; CHAGVARDIEFF, 1987); carvão da cana-de-açúcar, causada pelo fungo *Ustilagos citaminea* Syd (MARCHELO; AHMED; BUKHARI, 2008); ferrugem da cana-de-açúcar, causada pelo fungo *Puccinia melanocephala* (CHAPOLA; HOFFMANN; MASSOLA, 2016; OLORIZ et al., 2012; WANG et al., 2013); a podridão vermelha, causada pelo fungo *Colletotrichum falcatum* (Went) (ABBAS et al., 2016; BUKHARI et al., 2012; HASSAN; AFGHAN; HAFEEZ, 2012; MALATHI; VISWANATHAN, 2012; NITHYA et al., 2012; PRATHIMA et al., 2013; SAKSENA et al., 2013); síndrome do amarelecimento foliar (amarelinho), causada por um vírus do grupo Polerovirus (ABU AHMAD et al., 2007; DEBIBAKAS et al., 2014; GLYNN et al., 2010; SMITH et al., 2000) e vírus do mosaico da cana-de-açúcar (SCMV) (DEWANTI et al., 2016).

Durante o processo de melhoramento tradicional da cana-de-açúcar, os melhoristas realizaram cruzamentos de forma a combinar as características desejáveis de *S. spontaneum* (resistência a doenças) com as de *S. officinarum* (alto acúmulo de sacarose), e os híbridos resultantes deste e dos subsequentes cruzamentos são cultivados até hoje, sendo que os mesmos possuem distintas capacidades de defesa contra o ataque de patógenos. Por exemplo, o híbrido RB72454 é resistente à ferrugem e à escaldadura, mas suscetível às estrias vermelhas (EMBRAPA, 2008), enquanto que o híbrido RB867515 (que tem RB72454

como um dos progenitores) é resistente ao carvão, à ferrugem à escaldadura e ao mosaico, mas tem susceptibilidade às estrias vermelhas (EMBRAPA, 2008). O híbrido SP70-1143, por outro lado, é suscetível a ferrugem e resistente às estrias vermelhas (OLIVARES et al., 1997), mosaico (SOUZA et al., 2017) e a nematóides (DINARDO-MIRANDA, 1994). Já o híbrido RB937570 (que tem como progenitores RB72454 e SP70-1143) é tolerante à ferrugem, carvão, escaldadura, estria vermelha, raquitismo, porém suscetível ao mosaico (EMBRAPA, 2008). Enfim, a resistência dos híbridos de *Saccharum* spp. se mostra bastante variável, não possuindo correspondência perfeita com a dos progenitores, mas se expressando nem sempre de forma previsível (EMBRAPA, 2008).

1.4. Mecanismos de defesa

As plantas não possuem um sistema imune específico, porém recorrem a diversas outras estratégias para se defenderem contra os diferentes patógenos com os quais entram em contato. São caracterizadas por possuírem elementos constitutivos e induzíveis contra o ataque de patógenos (BOWLES, 1990). Estratégias de defesa em plantas constituem-se de barreiras morfológicas, indução do estresse oxidativo, produção de metabólitos secundários e proteínas antimicrobianas que, em conjunto, agem contra o patógeno (BOWLES, 1990; HEIL, 2002).

De forma geral, plantas são resistentes a diversos micro-organismos, e somente alguns são capazes de causar doenças (LIPKA; FUCHS; LIPKA, 2008). São dotadas de um sistema de defesa dinâmico, formado por diversos mecanismos que atuam contra organismos invasores (DANGL; JONES, 2001). A natureza da interação entre a planta e o patógeno nos permite dividir a resistência a doenças em dois tipos: vertical e horizontal. Essa divisão surge do fato de que nem todos os patógenos são capazes de infectar todas as plantas, sendo estas interações dinâmicas e resultantes da co-evolução das espécies (SCHULZE-LEFERT; PANSTRUGA, 2011; SENTHIL-KUMAR; MYSORE, 2013).

A resistência vertical surge da adaptação do micro-organismo ao cultivar, e é de curta duração (MYSORE; RYU, 2004). Ela é considerada um exemplo de resistência gene-a-gene muito específica de um genótipo/cultivar da planta contra um determinado patógeno (FLOR, 1971). Diversos estudos têm focado na

introdução de genes de resistência (R) em cultivares suscetíveis, tentando superar a capacidade do patógeno de produzir efetores e aumentar sua virulência. Grande parte das proteínas R possui um sítio de ligação rico em leucina (NBS-LRRs) que, após reconhecimento da proteína avr, desencadeia a resposta hipersensível (HR) através da geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*).

A resistência horizontal, por outro lado, é eficiente contra todas as estirpes de um dado patógeno (HEATH, 2000) e corresponde a um amplo espectro de resistência composta de diversos elementos que incluem, mas não estão limitados a: parede celular; cutícula; fitoanticipinas; acúmulo de lignina; produção de fitoalexinas; resposta hipersensível; produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRs), dentre outras (SENTHIL-KUMAR; MYSORE, 2013; THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Portanto, a resistência horizontal tem maior duração e ampla gama de ação contra os mais diferentes patógenos (NIKS; MARCEL, 2009; SENTHIL-KUMAR; MYSORE, 2013).

O sistema de defesa inato das plantas pode ser dividido em duas vias: imunidade ativada por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), denominada PTI, ou imunidade desencadeada por efetores (ETI) (JONES; DANGL, 2006) (**Figura 3**).

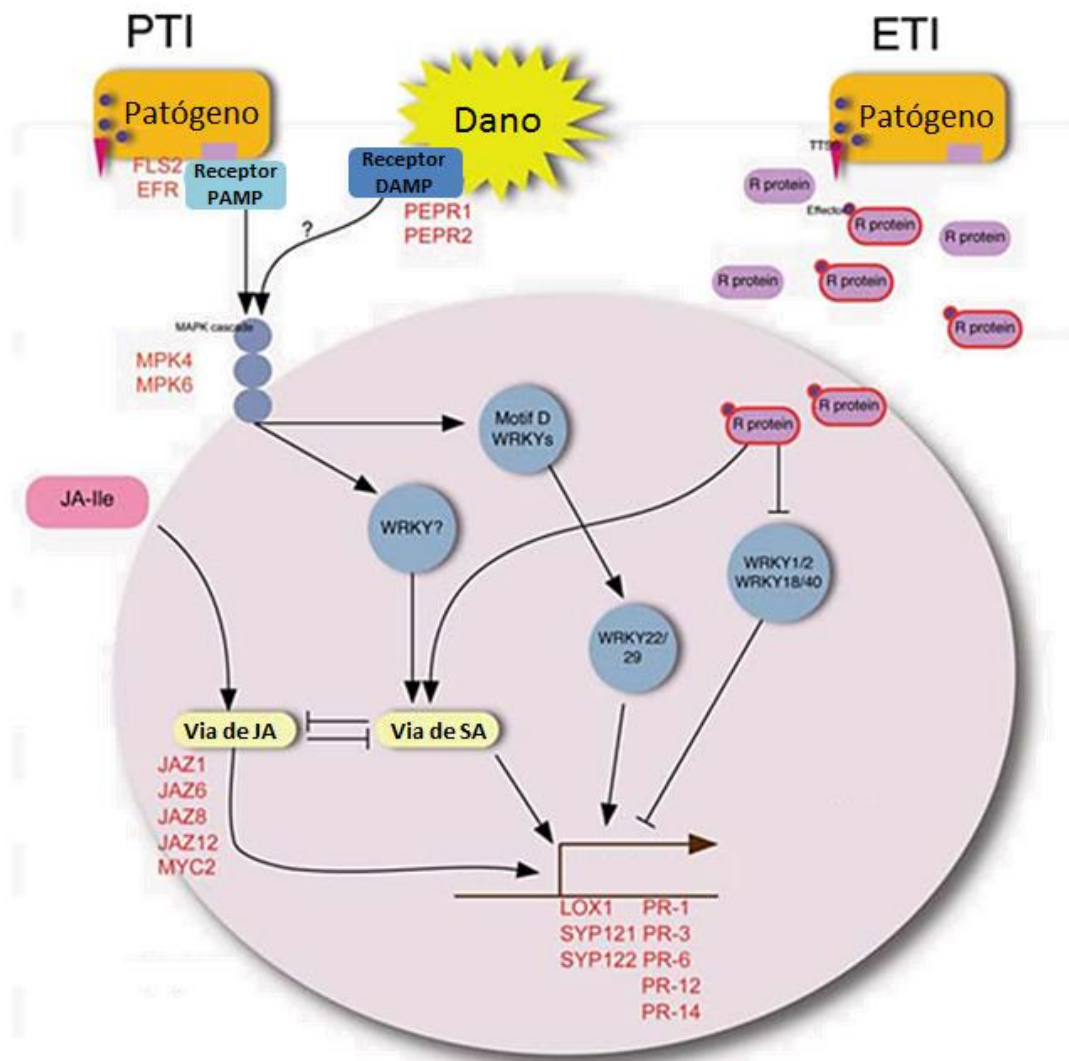


Figura 3: Representação esquemática dos mecanismos de reconhecimento e defesa de plantas contra patógenos bacterianos: PTI e ETI. Em última análise, através de várias vias ramificadas e de múltiplos componentes, os genes relacionados com a defesa são transcritos. Os genes up-regulated são representados com caracteres avermelhados. Figura adaptada de Dodds & Rathjen (2010).

O primeiro reconhecimento do microorganismo pela planta hospedeira é análogo aos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) dos animais, que reconhecem os PAMPs, pequenos elementos estruturais de moléculas maiores indispensáveis à sobrevivência dos micro-organismos (JANEWAY, 1989). A PTI desencadeia uma série de processos: cascatas de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), produção de ROS, sinalização mediada por hormônios e expressão gênica (SCHWESSINGER; ZIPFEL, 2008). Os PAMPs constituem o

primeiro mecanismo de reconhecimento específico, os quais dependem de reconhecimento de padrões transmembrana (BENKO-ISEPPON et al., 2010; ZIPFEL; FELIX, 2005).

A compreensão dos mecanismos da resistência vertical, considerada a mais atuante na defesa dos cultivares contra patógenos, é essencial para a obtenção de novos híbridos pela transferência de genes R. Porém, por possuir diversas vias de atuação, a resistência horizontal possui maior amplitude (AYLIFFE, 2004; NIKS; MARCEL, 2009; ZHAO et al., 2005). Dependendo do nível de interação planta-patógeno, a resistência vertical é regulada principalmente por ETI (*Effector Triggered Immunity*), sendo que a resistência horizontal se desenvolve por PTI (*Pattern Triggered Immunity*) e/ou ETI (SCHULZE-LEFERT; PANSTRUGA, 2011; SENTHIL-KUMAR; MYSORE, 2013). ETI é a base da resistência clássica gene-a-gene demonstrada por Flor (1971).

A interação planta-patógeno pode resultar em infecção (o que constitui uma resposta compatível) ou resistência (constituindo uma resposta incompatível) (HEIL, 2002). Em plantas resistentes há uma ativação eficiente do sistema de defesa na ocasião do contato com o patógeno, o que pode não acontecer ou acontecer tardiamente em plantas não-resistentes (STASKAWICZ et al., 1995). Contudo, patógenos são capazes de suprimir a PTI por meio da produção de avr. Então é ativada uma segunda via de defesa das plantas, os produtos de genes R, mediada por outros receptores, em sua maioria de localização intracelular. Estes são capazes de reconhecer os produtos de genes de avirulência e ativar a ETI, constituindo uma resposta de defesa mais intensa, o que pode levar, inclusive, à morte celular programada (ELLIS; DODDS; PRYOR, 2000; JONES; DANGL, 2006). Como em uma corrida armamentista em nível molecular, patógeno e planta estão submetidos a uma pressão seletiva para diversificarem seus efetores e proteínas R (BOLLER; HE, 2009).

PTI e ETI induzem a biossíntese de diferentes hormônios, sinalizando distintas vias. ETI aciona a biossíntese e sinalização por ácido salicílico (SA), o que leva a indução de resistência local e resistência sistêmica adquirida (SAR), mediante ataque de patógenos biotróficos (MÉTRAUX et al., 1990). SAR é a indução de resistência à doença em tecidos sadios distantes do local de contágio ativada pela infecção local (WARD et al., 1991). PTI estimula a biossíntese de etileno (ET) (FELIX

et al., 1999; WARD et al., 1991) que, juntamente com ácido jasmônico (JA), ativam as defesas contra patógenos necrotróficos (THOMMA et al., 1998). As interações entre ambas as vias de sinalização por JA/ET e SA levam à síntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs) (NIKI et al., 1998; THOMMA et al., 1998).

1.5. Peptídeos antimicrobianos

A necessidade de defesa mediante organismos invasores é um desafio comum a plantas e animais. Mecanismos complexos, como a imunidade inata, surgiram e foram moldados diante da evolução de hospedeiros e patógenos. A produção de AMPs é um dos mecanismos que compõe a linha de frente da defesa de animais, plantas e micro-organismos (BULET, 1999; CHARLET et al., 1996; EHRET-SABATIER et al., 1996; GANZ, 2004; GAO et al., 2009; KATO; KOMATSU, 1996; LAI et al., 2002; MYGIND et al., 2005; PARK; KIM; KIM, 1996; TERRAS et al., 1995; TOMASINSIG; ZANETTI, 2005; ZASLOFF, 1987).

AMPs são importantes componentes de defesa induzida e constitutiva (STOTZ; WALLER; WANG, 2012), sendo a primeira linha defensiva em animais (SCHRÖDER, 1999). São polipeptídios com menos de 100 aminoácidos (a maioria menor que 50), componentes do sistema de defesa do hospedeiro e possuem atividade antimicrobiana (GANZ, 2004). AMPs de plantas, assim como os de animais, apresentam grande diversidade estrutural e foram agrupados em diferentes classes com base na sua estrutura primária (PADOVAN; SCOCCHI; TOSSI, 2010), possuindo as seguintes características comuns: baixa massa molecular (2-10 kDa); possuem carga líquida positiva em pH fisiológico; são estabilizados pela presença de 2-6 ligações dissulfeto; suas atividades são voltadas sobre fungos, oomicetos e bactérias, embora alguns membros também possuam atividade sobre insetos, vírus e protozoários (JUNG et al., 2013; NAWROT et al., 2014; SEGURA et al., 1998).

Defensinas (PR-12) e proteínas transportadoras de lipídios (LTPs) (PR-14) constituem duas classes de proteínas relacionadas à patogênese bem estudadas. O termo “proteínas relacionadas à patogênese” indica que estas proteínas não são expressas ou são expressas em quantidades basais em tecidos saudáveis, e têm seus níveis de expressão aumentados com subsequente acúmulo em condições patológicas (SELS et al., 2008). Entendem-se condições patológicas como aquelas decorrentes de ataque direto de fungos, bactérias, vírus, insetos e herbívoros (LAMB

et al., 1989; RIDGEN; COUTTS, 1988). Para algumas PRs, o mesmo efeito é obtido quando a planta é exposta a substâncias químicas que simulam um ataque de patógenos, como os hormônios vegetais etileno (ET), jasmonato (JA) e ácido salicílico (SA) (DELANEY et al., 1994; XU et al., 1994). Algumas PRs são expressas constitutivamente somente em determinados órgãos ou estádios do desenvolvimento vegetal (LINTHORST et al., 1990; LOTAN; ORI; FLUHR, 1989). PRs estão acumuladas em vacúolos e apoplastos, assim como nas paredes celulares primárias e secundárias, localização esta condizente com a função de defesa, dentre muitas outras, a elas atribuídas (VAN REE, 2002).

Defensinas e LTPs constituem, portanto, moléculas com grande potencial de atuação, com atividade bem caracterizada principalmente sobre fungos e bactérias, sugerindo um importante papel no combate a organismos patogênicos (CARVALHO; GOMES, 2007, 2011; DE-PAULA et al., 2008; GACHOMO et al., 2012; HAYES et al., 2013).

1.5.1. Defensinas

Defensinas possuem estrutura globular, compacta e altamente estabilizada por ligações dissulfeto, sendo muito estáveis sob diversas condições físico-químicas, como pHs 4.0-10.0, temperaturas de 0 °C a 90 °C e digestão por tripsina (DE BEER; VIVIER, 2008; WALTERS et al., 2009; WANG; RAO; YE, 2009; WONG; NG, 2005a, 2005b). Tratam-se de peptídeos monoméricos, à exceção da SPE10 de *Pachyrhizus erosus*, que forma dímeros (SONG et al., 2004, 2011).

A análise estrutural de várias defensinas revelou uma estrutura tridimensional altamente conservada, composta, em plantas, de duas fitas- β paralelas e uma α -hélice, e seis ou oito resíduos de cisteína envolvidos na formação de ligações dissulfeto (CORNET et al., 1995; SCHIBLI et al., 2002; YANG et al., 2000) (**Figura 4**). As duas ligações dissulfeto formadas entre a α -hélice e a fita- β final constituem o elemento estrutural α -hélice folha- β estabilizado por cisteínas (CS $\alpha\beta$) (CORNET et al., 1995). Este elemento estrutural é característico de peptídeos relacionados à atividade antimicrobiana, e foi identificado primeiramente em uma toxina de escorpião que atua bloqueando canais de K⁺ (BONTEMS et al., 1991).

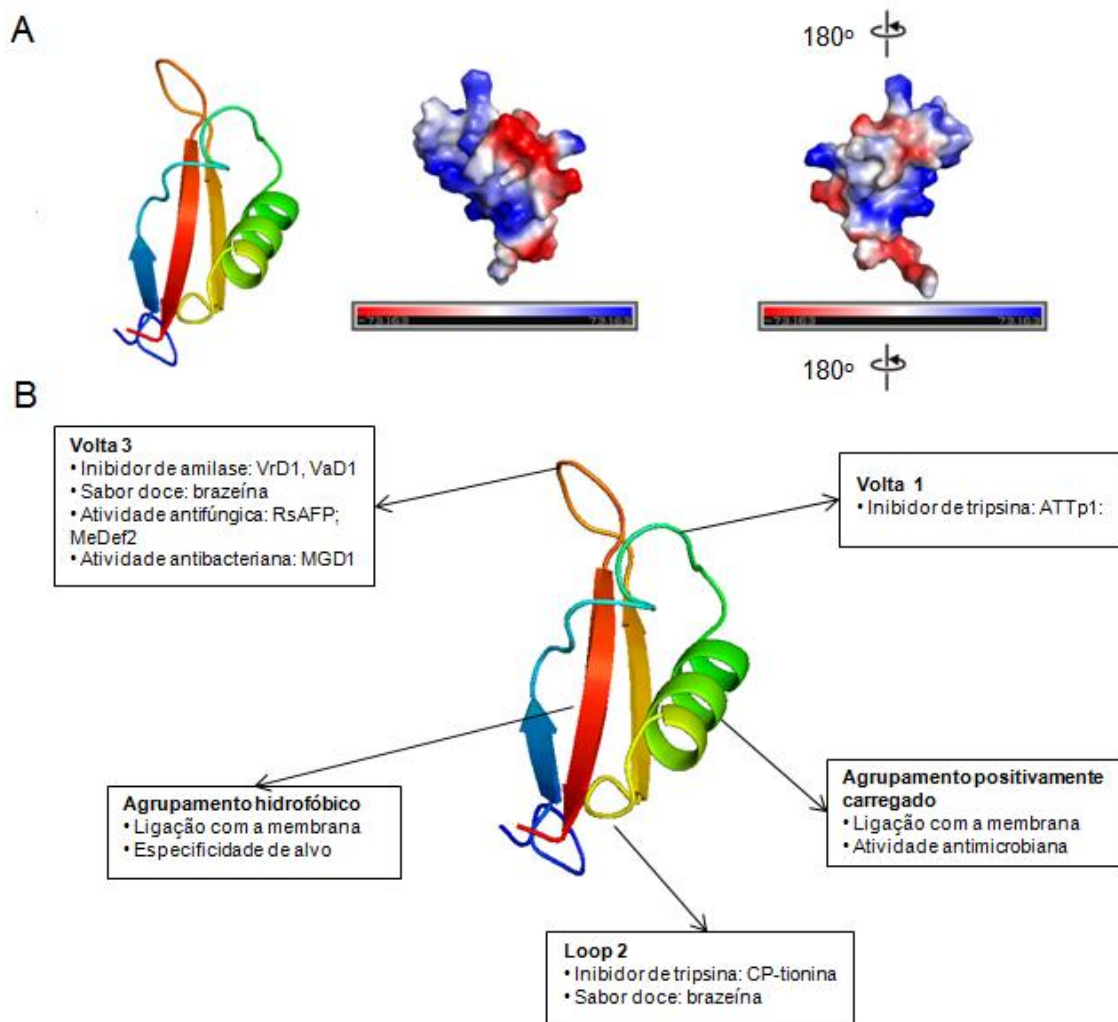


Figura 4: Representação esquemática da estrutura tridimensional compartilhada por defensinas de plantas. **(A)** Defensina 5 (PDB: 2KSK_A) de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Simulação de superfície de contato no vácuo (vermelho representa carga negativa, azul positiva e branco sem carga ou hidrofóbico). Modelagem realizada por meio do programa Phyre²; obtenção da superfície de contato e visualização por meio do programa PyMol. **(B)** Relação estrutura-função de algumas defensinas caracterizadas.

As defensinas se diferenciam umas das outras por suas estruturas terciárias, arranjo global e pelo número de ligações dissulfeto formadas (BROEKAERT et al., 1995; BULET, 1999). O elemento estrutural γ -core, constituído por GXC-X₃₋₉-C, com X representando qualquer aminoácido, está presente em todas elas, sugerindo que estas moléculas ancestrais surgiram antes da separação entre procariotos e eucariotos (YOUNT et al., 2007; YOUNT; YEAMAN, 2004). As atividades de algumas defensinas foram relacionadas a regiões específicas da molécula (**Figura 4B**).

As primeiras defensinas de plantas foram identificadas em sementes de urtiga (*Urtica dioica* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.) (BROEKAERT et al., 1989; COLILLA; ROCHER; MENDEZ, 1990; MENDEZ et al., 1990), e inicialmente classificadas como tioninas por causa do tamanho similar (5 kDa) e pela presença de oito resíduos de cisteína. Mais tarde, verificou-se que a estrutura (inclusive as posições das ligações dissulfeto) diferia das de α - e β -tioninas (BRUIX et al., 1993) e, então, elas foram chamadas de γ -tioninas. Por fim, após verificarem as semelhanças entre as estruturas e as propriedades antimicrobianas das γ -tioninas e das defensinas de mamíferos e de insetos, γ -tioninas foram renomeadas para “defensinas de planta” (TERRAS et al., 1995).

Após a descoberta destes peptídeos, defensinas foram subsequentemente isoladas de várias espécies de plantas, como rabanete (*Raphanus sativus*) (TERRAS et al., 1993); pimenta (*Capsicum annuum* L.) (MEYER et al., 1996); tabaco (*Nicotiana tabacum*); flores de Petunia x hybrida (LAY, 2003); e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (GAMES et al., 2008; WONG et al., 2006). Também foram identificadas em diferentes tecidos: parede celular, espaço extracelular e camadas periféricas de sementes; epiderme e feixe vascular; xilema; estômatos de folhas; parênquima de semente e outros (ALMEIDA et al., 2000; KRAGH et al., 1995; SEGURA et al., 1998; TERRAS et al., 1995). Em cana-de-açúcar, 23 defensinas foram identificadas em bibliotecas de ESTs no banco do SUCEST (BELARMINO et al., 2010; DE-PAULA et al., 2008; PADOVAN et al., 2009), e cinco delas tiveram suas identidades confirmadas por experimentos (DE-PAULA et al., 2008).

Defensinas de planta são caracterizadas por forte caráter catiônico, baixa massa molecular (ao redor de 6 kDa), presença de 8 resíduos conservados de cisteína, que possibilitam a formação quatro ligações dissulfeto responsáveis por estabilizar sua estrutura tridimensional, presença de uma glicina conservada entre a quarta e a quinta cisteínas (LAY, 2003) e alta conservação da estrutura terciária, com uma folha- β composta de três fitas antiparalelas e uma α -hélice, na configuração $\beta\alpha\beta\beta$ (JANSSEN et al., 2003; LACERDA et al., 2014). Podem ser encontradas em praticamente todas as plantas superiores (BROEKAERT et al., 1995; BROWN; WHANCOCK, 2006; GANZ, 2003; LIU et al., 2006; THOMMA; CAMMUE; THEVISSSEN, 2002), e estão relacionadas a diversas atividades

biológicas sendo sua atividade antimicrobiana (principalmente sobre fungos) bem caracterizada (TERRAS et al., 1993, 1995).

As defensinas de plantas possuem um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo inibição de α -amilase, bloqueio de canais de íons e atividade antibacteriana (CARVALHO; GOMES, 2011; LAY; ANDERSON, 2005; THOMMA; CAMMUE; THEVISSSEN, 2002). Muitas defensinas são altamente expressas em sementes (TERRAS et al., 1995), outras são induzidas por fatores bióticos e abióticos, como: seca (MEE DO et al., 2004); frio (KOIKE et al., 2002); metais pesados (MIROUZE et al., 2006); e micro-organismos patogênicos (PENNINCKX et al., 1996; TERRAS et al., 1995; ZIMMERLI et al., 2004).

O mecanismo através do qual as defensinas conseguem comprometer o crescimento de fungos (assim como o de algumas bactérias) ainda não foi completamente desvendado, porém, dois principais modelos explicam o mecanismo de ação: o modelo de tapete e o modelo de poro (LACERDA et al., 2014). Ambos concebem a interação entre a defensina e moléculas carregadas negativamente encontradas na membrana celular do patógeno, causando permeabilização e morte por necrose. O modelo de tapete enfatiza a formação de poros pela ação de vários peptídeos de membrana, enquanto o modelo de poro mostra as defensinas formando oligômeros e, então, formando poros múltiplos na membrana.

Há também a hipótese de que defensinas não causam danos à membrana, mas interagem com fosfolipídeos, levando ao aumento da permeabilidade iônica ou permitindo a passagem destes peptídeos para o meio intracelular. Eles também podem induzir à formação de ROS e ativar a morte celular programada. (HEGEDÜS; MARX, 2013; WILMES et al., 2011). Foi demonstrado que, em alguns casos, as defensinas permanecem na superfície da membrana e induzem a morte celular por cascatas de sinalização (THEVISSSEN et al., 2012), em outros casos são internalizadas e interagem com alvos intracelulares (LOBO et al., 2007; SAGARAM et al., 2013; VAN DER WEERDEN; HANCOCK; ANDERSON, 2010; VAN DER WEERDEN; LAY; ANDERSON, 2008). A permeabilização de membranas é descrita para defensinas de planta, porém não parece ser o evento-chave do processo, mas um efeito secundário pois, em algumas defensinas, só ocorre em concentrações bem superiores às necessárias à inibição do crescimento (THEVISSSEN et al., 1996). Por outro lado, produção de ROS tem sido relatada como um evento central na

morte celular durante a ação de algumas defensinas (AERTS et al., 2006, 2007, 2011; VAN DER WEERDEN; LAY; ANDERSON, 2008).

Já foram descritos os modos de ação antifúngica de duas defensinas: Rs-AFP2, de rabanete (*Raphanus sativus*) (THEVISSSEN et al., 2000) e Dm-AMP1, de dália (*Dahlia merckii*) (THEVISSSEN et al., 2004). Rs-AFP2 se liga à glicosilceramida de membranas fúngicas, e Dm-AMP1 liga-se a manosil-di-inositol-fosforil-ceramida. Por se ligarem a diferentes esfingolipídios, estas defensinas possuem especificidades de ação antimicrobiana. Outra característica compartilhada por defensinas de plantas é a perda da atividade antifúngica devido ao aumento da força iônica causada, por exemplo, pela adição de K^+ e Mg^{2+} (ALMEIDA et al., 2000; OSBORN et al., 1995; SPELBRINK et al., 2004; TERRAS et al., 1992, 1993). Sugeriu-se, primeiramente, que as cargas dos íons prejudicariam a interação eletrostática entre o peptídeo e a membrana, reduzindo a capacidade da defensina em se ligar (BROEKAERT et al., 1995). Experimentos com β -purotionina, uma tionina de trigo, conduzidos por Oard e Karki (2006), porém, mostraram que os cátions causam mudanças conformacionais na proteína, deixando-a mais rígida e interferindo na interação com o alvo (OARD; KARKI, 2006).

Originalmente as defensinas foram classificadas por Broekaert et al. (1995) de acordo com suas capacidades ou incapacidades de inibir o crescimento de fungos, assim como o efeito observado na morfologia das hifas durante a inibição de *Fusarium culmorum*. Deste modo, dois grupos puderam ser distinguidos: as defensinas com atividade morfogênica causam redução do alongamento das hifas e ramificação das mesmas, enquanto que as defensinas não-morfogênicas causam redução do alongamento das hifas sem induzir ramificações (OSBORN et al., 1995). Essa classificação mostrou-se muito limitada por utilizar-se de apenas 12 sequências de defensinas, e basear-se puramente em características anti-fúngicas. Harrison et al. (1997) propuseram uma nova classificação baseada na identidade da sequência primária, utilizando 17 sequências. Contudo, devido ao grande número de defensinas descobertas, esta classificação se mostrou insuficiente para abarcar toda a diversidade de novos peptídeos isolados. A classificação mais usual de defensinas as divide em duas classes: a primeira (e maior) delas é constituída por peptídeos formados por uma sequência sinal e o peptídeo maduro; a segunda classe abrange defensinas com um grande peptídeo sinal e um pró-domínio C-terminal (LAY, 2003).

Van der Weerden e Anderson (2013) analisaram 139 defensinas do NCBI e acreditam ser possível, futuramente, elaborar um sistema de classificação baseado em aminoácidos conservados em regiões específicas do peptídeo, predizendo a atividade biológica de uma defensina sem a necessidade de testes de laboratório (algo impossível atualmente), auxiliando pesquisadores a lidarem com a quantidade crescente de novos peptídeos identificados.

1.5.2. LTPs

As proteínas transportadoras de lipídeos (LTPs) de plantas constituem um grupo de AMPs capazes de trocar lipídeos entre membranas em ensaios *in vitro* (YEATS; ROSE, 2008). Presentes em todas as plantas terrestres, são abundantemente expressas em vários tecidos e suas funções biológicas ainda são discutidas (SALMINEN; BLOMQUIST; EDQUIST, 2016). LTPs são codificadas por uma grande família gênica com mais de 50 membros identificados em Angiospermas e, aproximadamente, 50 membros em Briófitas e Pteridófitas (BOUTROT; CHANTRET; GAUTIER, 2008; LI et al., 2014; WEI; ZHONG, 2014). Porém, não foram encontradas em algas (EDSTAM et al., 2011).

As LTPs são proteínas pequenas (entre 7-10 kDa), possuem elevado ponto isoelétrico (pI de 9-11), estão presentes em altas concentrações (em torno de 4% do total de proteínas solúveis de planta) e são ricas em resíduos de cisteína conservados (a maioria com oito deles) (KADER, 1996). Sua estrutura terciária é caracterizada pela presença de quatro ou cinco α -hélices (**Figura 5A**) estabilizadas por quatro ligações dissulfeto, constituindo um elemento estrutural formado por cisteínas, de fórmula geral $C-X_n-C-X_nCC-X_n-CXC-X_n-C-X_n-C$, onde X representa qualquer aminoácido (**Figura 5B**).

LTPs são divididas em dois tipos: aquelas específicas para determinadas classes de fosfolipídios e aquelas capazes de ligar várias classes de lipídios, chamadas de LTPs inespecíficas (nsLTPs). Atividades alergênicas de nsLTPs foram descritas em frutas, vegetais, pólen e látex (SALCEDO et al., 2007). Como são resistentes à atividade proteolítica, estas proteínas conseguem atravessar o sistema gastrointestinal, causando sensibilização do sistema imunológico e induzindo à produção de imunoglobulinas (IgE), o que resulta em severos quadros de alergia (VAN REE, 2002). LTPs são os mais importantes alérgenos de frutas da família

Rosaceae, como pêssego (DUFFORT et al., 2002), maçã (PASTORELLO et al., 1999), damasco (PASTORELLO et al., 2000a) e uva (SCHEURER et al., 2004). Alguns trabalhos demonstraram a participação de nsLTPs no desenvolvimento de respostas alérgicas a nozes, cereais, castanha (EGGER et al., 2010; SATHE; SHARMA; ROUX, 2008; SCHOCKER F, 2004), milho (PASTORELLO et al., 2000b) e avelã (NEMNI et al., 2013).

A despeito de suas atividades biológicas de ligação a lipídeos *in vitro*, até o presente momento não há evidência de envolvimento direto de LTPs no transporte de lipídios *in vivo* e, além disso, o mecanismo de transporte de lipídeos *in vivo* pela LTP ainda não foi elucidado (FINKINA et al., 2016). LTPs são sintetizadas na forma de pré-proteínas com uma sequência sinal hidrofóbica, cujo tamanho varia de 21 a 35 resíduos de aminoácidos, conferindo um direcionamento predominantemente extracelular (DOULIEZ et al., 2000). Entretanto, algumas LTPs possuem localização intracelular, encontradas em glioxissomo (TSUBOI et al., 1992), vacúolo (CARVALHO et al., 2004) e vesícula (DIZ et al., 2011).

Kader (1996) divide as LTPs em duas subclasses: LTPs tipo I e LTPs tipo II. A similaridade entre as sequências de aminoácidos das duas subclasses é inferior a 30% (KADER, 1996). LTPs do tipo I têm massa molecular entre 9-10 kDa, possuem entre 90-95 resíduos de aminoácidos e padrão de ligações dissulfeto como mostrado na **Figura 5B**. Além disso, LTPs do tipo I não ligam esteróis. Além das cisteínas, a maior parte das LTPs I possuem resíduos de glicina e prolina conservados, com resíduos de tirosina nas regiões N- e C-terminal, relacionados com a interação ao ligante (SIMORRE et al., 1991).

LTPs do tipo II são menos estudadas que as do tipo I e têm massa molecular de aproximadamente 7 kDa, formadas por 65-70 aminoácidos e com um padrão de ligações dissulfeto, como mostrado na **Figura 5B**. São constituídas por três α -hélices e uma região contendo hélices individuais. Devido aos ângulos formados entre as α -hélices, a cavidade das LTPs II é triangular, com as cadeias laterais dos resíduos de alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina e valina voltados para o interior. A cavidade hidrofóbica das LTPs II é menor do que das LTPs I, mas a flexibilidade das primeiras permite a ligação com moléculas rígidas, como os esteróis (FINKINA et al., 2016; HOH et al., 2005; PONS et al., 2003; SAMUEL et al., 2002).

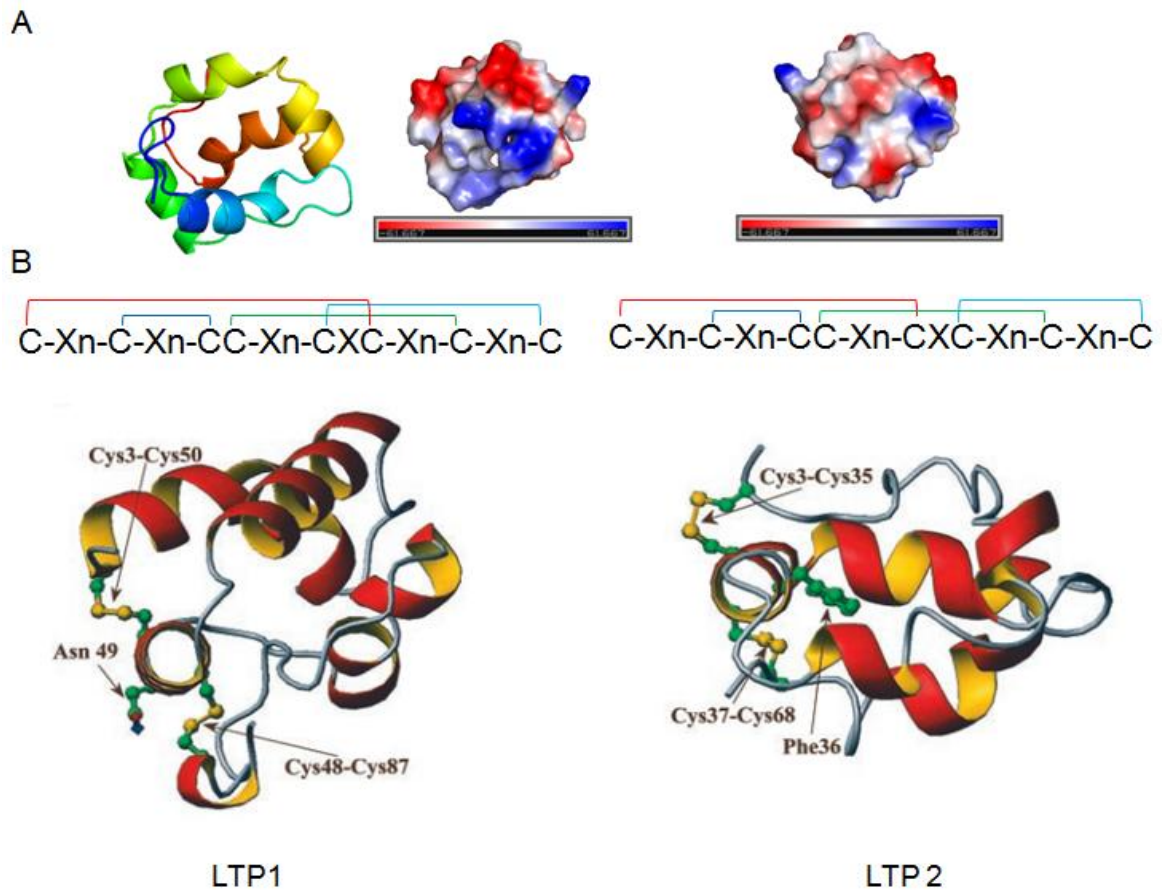


Figura 5: Representação esquemática das estruturas tridimensionais de LTPs de plantas. **(A)** LTP (GenBank: ATG16035.1). Simulação de superfície de contato no vácuo (vermelho representa carga negativa, azul positiva e branco sem carga ou hidrofóbico). 180° e a figura no topo indicam o novo ângulo de visualização do peptídeo. Modelagem realizada por meio do software Phyre²; obtenção da superfície de contato e visualização por meio do software PyMol. **(B)** O padrão de ligações dissulfeto formado entre os resíduos conservados de cisteínas difere entre LTPs das subclasses 1 e 2. Abaixo dos padrões das ligações dissulfeto estão representadas as estruturas terciárias de LTPs dos tipos I e II. Adaptada de Carvalho e Gomes (2007).

Diferentes classificações foram propostas para as LTPs, como a de Edstam et al. (2011), que se baseiam na similaridade entre as sequências e posição de íntrons, resultando em 10 diferentes tipos de LTPs (I, II, C, D, E, F, G, H, J e K) e a de Li et al. (2014), que agrupam as LTPs em 11 classes (I-XI). Boutrot et al. (2008) classificam as LTPs em nove tipos diferentes (I-IX), de acordo com a similaridade entre as sequências e o número de resíduos entre as cisteínas conservadas, como podemos observar na **Tabela 1**.

Tabela 1: A variação do número de aminoácidos presentes nas LTPs permite classificá-las em IX tipos. Os valores que possibilitam identificar diretamente o tipo de LTP estão destacados em cinza. Resíduos de cisteína conservados numerados de 1 a 8 estão destacados em preto. A diferenciação entre os tipos IV e VI é feita pela presença, em todas as LTPs do tipo VI, de uma valina localizada a quatro aminoácidos e uma metionina a dez aminoácidos da cisteína 7. Adaptado de Boutrot et al. (2008).

Tipos de LTP	8CM e número de aminoácidos caracterizadores de cada tipo							
		1	2	3,4	5	6	7	8
Tipo I	X _{2,9}	C X ₉	C X ₁₃₋₁₅	CC X ₁₉	C X ₅ C X ₁₉₋₂₄	C X _{7, 13, 14}	C X ₀₋₂₆	
Tipo II	X ₀₋₁₃	C X ₇	C X _{13,15}	CC X ₈₋	C X ₅ C X _{16,21,}	C X _{5, 6}	C X ₀₋₂	
Tipo III	X ₂₋₇	C X ₉	C X _{15, 16,}	¹⁰ CC X ₉	²³ C X ₅ C X ₁₂	C X ₆	C X _{1, 2, 4}	
Tipo IV	X ₀₋₇	C X _{9,1}	¹⁹ C X _{15, 17}	CC X ₉	C X ₅ C X _{21-24,}	C X _{6-8, 10}	C X _{0, 1, 5}	
Tipo V	X _{2-5, 10}	⁰ C X ₁₄	C X ₁₄	CC X ₁₁₋	²⁸ C X ₅ C X ₂₄	C X ₁₀	C X _{6, 10, 12}	
Tipo VI	X ₂₋₁₇	C X ₁₀	C X _{16,17}	¹³ CC X ₉	C X ₅ C X _{22, 23}	C X _{7, 9}	C X ₅₋₁₂	
Tipo VII	X _{4,50}	C X ₉	C X ₁₅	CC X ₁₂	C X ₅ C X ₂₇	C X _{9, 11}	C X _{17, 18}	
Tipo VIII	X _{3,12,21}	C X ₆	C X _{13, 14}	CC X ₁₂	C X ₅ C X ₂₅	C X ₈	C X _{2, 14, 16}	
Tipo IX	X _{2,21}	C X ₁₃	C X ₁₅	CC X ₉	C X ₅ C X ₂₂	C X ₆	C X _{1, 4}	

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

2.1.2. Caracterizar sequências genômicas e transcriptômicas de defensinas e LTPs em espécies selvagens e cultivares comerciais de cana-de-açúcar.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Identificar e caracterizar, *in silico*, genes e regiões promotoras de defensinas e LTPs no genoma de um híbrido de cana-de-açúcar (cultivar SP70-1143);

2.2.2. Caracterizar transcritos de genes de defensinas e LTPs em transcriptomas de cana-de-açúcar (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, SP70-1143, RB72454 e RB867515);

2.2.3. Relacionar filogeneticamente as defensinas e LTPs identificadas nos diferentes genótipos de cana-de-açúcar;

2.2.4. Identificar possíveis efeitos da hibridização nas diferenças estruturais observadas entre as defensinas e LTPs de cana-de-açúcar;

2.2.5. Analisar os níveis de expressão das defensinas e LTPs de cana-de-açúcar identificadas em bibliotecas de RNA-seq publicadas;

2.2.6. Identificar defensinas e LTPs constitutivamente acumuladas em folhas de cana-de-açúcar (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, SP70-1143, RB72454 e RB867515).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análises *in silico*

Para identificação e caracterização *in silico* de defensinas e LTPs em cana-de-açúcar foram seguidos os passos básicos ilustrados no fluxograma abaixo (Figura 6):

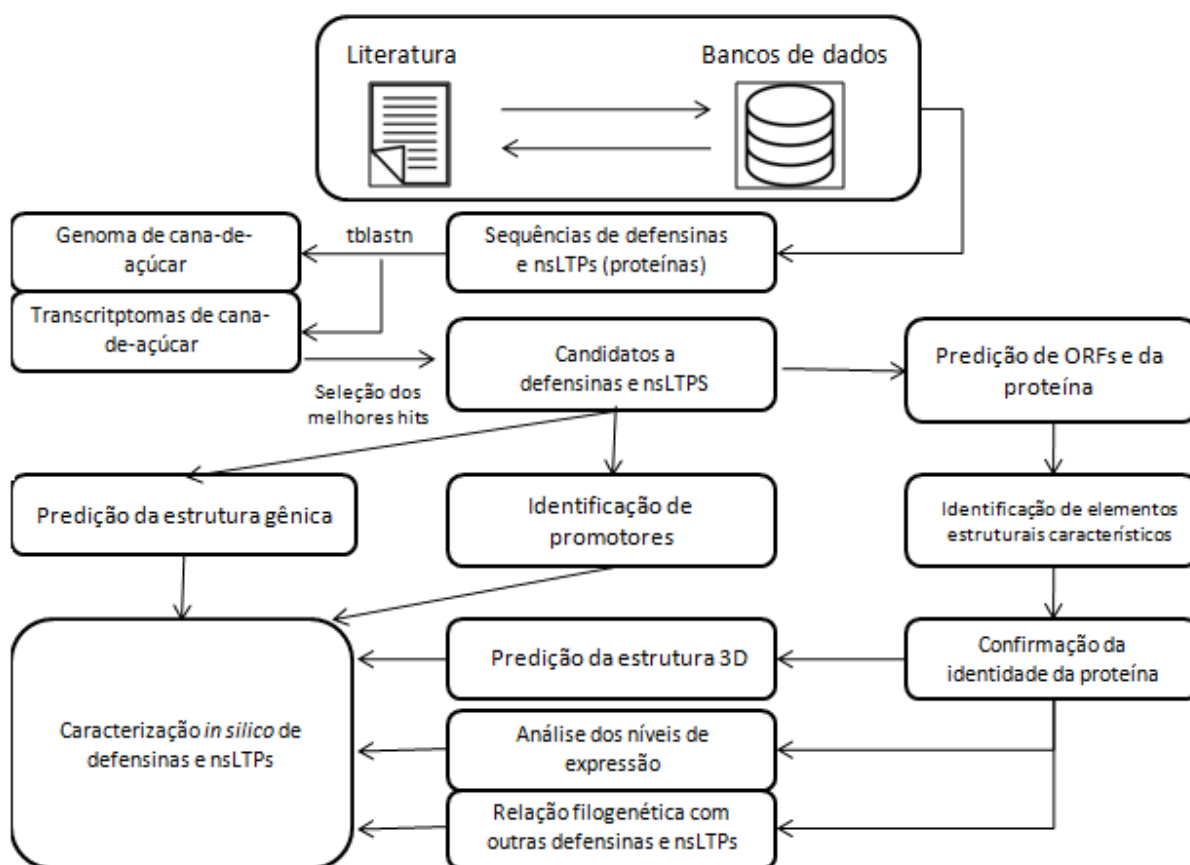


Figura 6: Fluxograma de identificação e caracterização de defensinas e LTPs em cana-de-açúcar.

3.1.1. Alinhamento de defensinas e LTPs contra sequências genômicas de cana-de-açúcar

Sequências peptídicas de defensinas de cana-de-açúcar publicadas por De-Paula et al. (2008) e por Belarmino et al. (2010) e sequências peptídicas de LTPs de sorgo (*Sorghum bicolor*) obtidas do artigo de Wang et al. (2012) foram alinhadas contra o banco de sequências genômicas de cana-de-açúcar do Laboratório de

Biologia Molecular de Plantas (LBMP/UFRJ) (GRATIVOL et al., 2014), utilizando a ferramenta TBLASTN (ALTSCHUL, 1990) com *E-value cutoff* de 0,0001. Os *scaffolds* com os melhores *hits* foram selecionados como potenciais genes de defensinas e LTPs em cana-de-açúcar.

3.1.2. Alinhamento de defensinas e LTPs contra transcriptomas de cana-de-açúcar

Sequências peptídicas de defensinas publicadas por De-Paula et al. (2008) e por Belarmino et al. (2010) e sequências peptídicas de LTPs de sorgo (*Sorghum bicolor*) obtidas do artigo de Wang et al. (2012) foram alinhadas contra o Transcriptoma de Referência 7-TR7 (SANTA BRIGIDA et al., 2016) por meio do TBLASTN (ALTSCHUL, 1990) com *e-value cutoff* de 0,0001 no programa BioEdit (ALZOHAIRY, 2011). Foram realizados, também, alinhamentos contra transcriptomas de cana-de-açúcar (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, SP70-1143, RB72454 e RB867515) (dados não publicados do grupo). Os transcritos com os melhores *hits* foram selecionados como prováveis defensinas e contabilizados em um *heatmap* por meio do programa Heatmapper (BABICKI et al., 2016).

3.1.3. Predição da estrutura gênica e da sequência de aminoácidos

Os *scaffolds* e transcritos identificados como prováveis defensinas e LTPs foram submetidos ao programa FGENESH (SOLOVYEV et al., 2006), para predição da estrutura gênica e aos programas ExpASy (GASTEIGER et al., 2003) e ORFfinder (ROMBEL et al., 2002) com parâmetros *default* para identificação de ORFs e predição da proteína codificada.

3.1.4. Comparação estrutural das defensinas e LTPs preditas a partir de *scaffolds* e transcritos

As sequências peptídicas de defensinas e LTPs preditas a partir dos *scaffolds* e dos transcritos foram alinhadas contra as respectivas defensinas e LTPs já descritas na literatura, por meio das ferramentas BLAST (ALTSCHUL, 1990) e MUSCLE (EDGAR, 2004), a fim de verificar se as proteínas preditas estão

completas e confirmar a presença dos elementos estruturais característicos dos peptídeos antimicrobianos.

3.1.5. Alinhamentos comparativos das defensinas e LTPs

As sequências peptídicas de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar e de outras plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Capsicum annuum*, *Echinochloa crusgalli*, *Helianthus annuus*, *Hordeum vulgare*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Saccharum officinarum*, *Sorghum bicolor*, *Spinacea oleracea*, *Triticum aestivum*, *Triticum turgidum* e *Zea mays*) baixadas de bancos de dados públicos foram alinhadas usando o programa Jalview (WATERHOUSE et al., 2009), a fim de comparar as sequências primárias e identificar os resíduos conservados. As demais sequências de defensinas foram obtidas a partir de artigos publicados ou do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A predição do peptídeo sinal foi feita por meio do programa ProP 1.0 Server (DUCKERT; BRUNAK; BLOM, 2004).

3.1.6. Obtenção de árvores filogenéticas de defensinas e LTPs

As sequências de defensinas e LTPs alinhadas no Jalview foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas por meio do programa MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016), usando o algoritmo *neighbor-joining* com 1.000 repetições de *bootstrap*. Árvores enraizadas foram construídas utilizando as sequências das defensinas e LTPs identificadas em cana-de-açúcar e também de outras plantas, eudicotiledôneas e monocotiledôneas. As árvores obtidas foram editadas por meio do programa FigTree 1.4.3 (RAMBAUT, 2010).

3.1.7. Análise de expressão de defensinas e LTPs em bibliotecas de RNA-seq

Os transcritos provenientes do Transcriptoma de Referência 7 (TR7) foram utilizados para analisar a expressão das defensinas e LTPs de cana-de-açúcar por meio de alinhamento contra bibliotecas de RNA-seq. Foram utilizadas as bibliotecas de RNA-seq de cana-de-açúcar submetida à infecção com bactéria patogênica (*Acidovorax avenae*), inoculação com bactéria benéfica (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e ao déficit hídrico (SANTA BRIGIDA et al., 2016; VARGAS et al.,

2014). A qualidade das bibliotecas foi avaliada usando FASTX Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) e os *reads* com qualidade maior ou igual a 20 (Q20) foram filtrados. As bibliotecas de RNA-seq filtradas foram mapeadas usando Bowtie2/2.1.0 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012) nos transcritos de defensinas e LTPs com configuração padrão. O número de *reads* de RNA-seq relacionados a cada um dos transcritos foi normalizado por *reads* por quilobase por milhão. A transformação em LOG₂(RPKM) foi utilizada para facilitar a visualização nos *heatmaps* construídos com a função *heatmap2* do programa R.

3.1.8. Análise da região promotora de genes de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar

As regiões promotoras dos genes de defensinas e LTPs foram analisadas por meio do programa TSSP - *Prediction of Plant Promoters* (SOLOVYEV; SHAHMURADOV; SALAMOV, 2010) e do programa PlantCARE (LESCOT, 2002).

3.1.9. Modelagem tridimensional de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar

As sequências de defensinas e LTPs preditas a partir de *scaffolds* e transcritos de cana-de-açúcar foram modeladas computacionalmente por meio do programa Phyre² (KELLEY et al., 2015) e visualizadas por meio dos programas Pymol (DELANO, 2002) e Chimera (PETTERSEN et al., 2004). Análise da estrutura modelada por meio de ferramenta do banco de dados PDBsum (LASKOWSKI, 2001).

3.2. Identificação de peptídeos de defensinas e LTPs em folhas de cana-de-açúcar

3.2.1 Material vegetal

As folhas jovens de cana-de-açúcar dos cultivares comerciais RB72454, RB867515 e SP70-1143 e das espécies selvagens *Saccharum spontaneum* e *Saccharum officinarum* foram cedidas pelo Laboratório de Biologia Molecular de Plantas/IBqM da UFRJ.

3.2.2. Extração ácida de proteínas das folhas de cana-de-açúcar

Foram testados três diferentes protocolos de extração de proteínas: extração alcóolica, extração em tampão fosfato e extração ácida. Folhas do cultivar SP70-1143 foram maceradas em nitrogênio líquido e submetidas aos três protocolos. Por apresentar melhores resultados, o extrato protéico para os testes posteriores foi obtido por meio da metodologia descrita por Egorov et al.(2005), com algumas modificações (**Figura 7**).

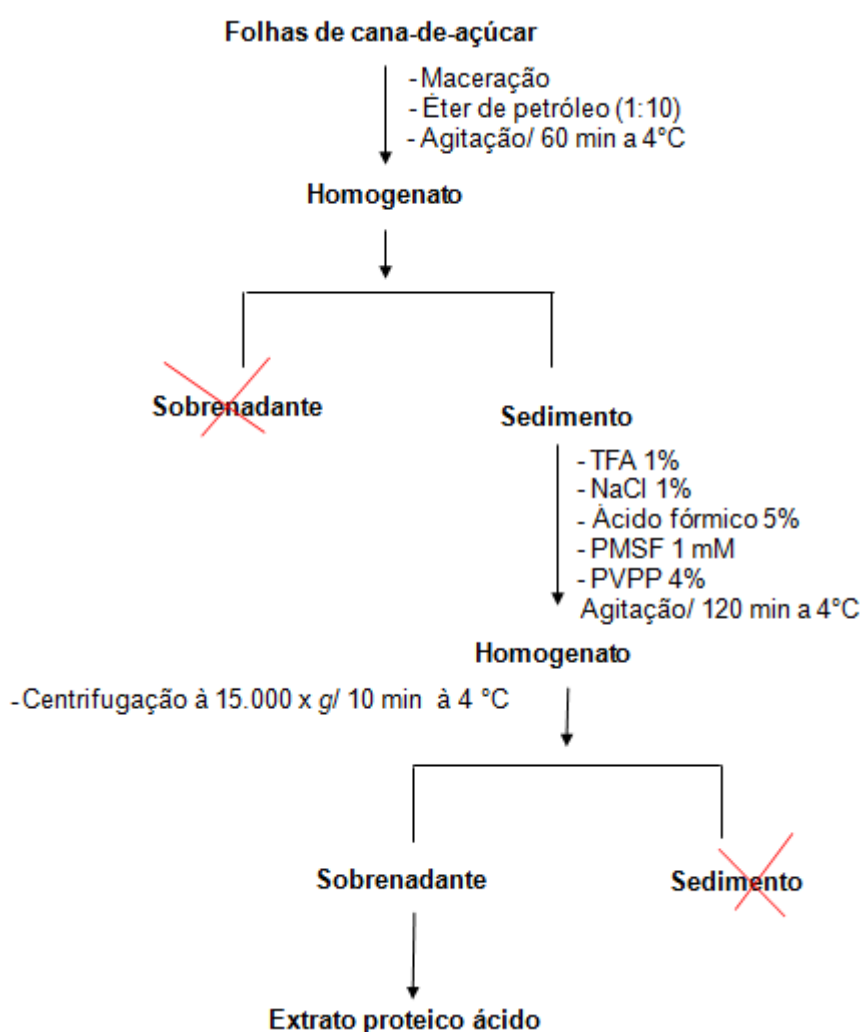


Figura 7: Representação esquemática da extração ácida de folhas de cana-de-açúcar a partir da descrição de Egorov et al. (2005).

As folhas das espécies selvagens (*Saccharum spontaneum* e *Saccharum officinarum*) e de cada cultivar de cana-de-açúcar (RB867515, RB72454 e SP-701143) foram pesadas (3 g) e maceradas em nitrogênio líquido, separadamente, até a obtenção de uma farinha fina. Adicionou-se éter de petróleo na proporção de 1:10 (30 mL) e o material foi mantido sob agitação durante 60 min, a 4 °C. Em seguida o material foi centrifugado e descartou-se o precipitado. Foi adicionada a solução de extração na proporção 1:10 (TFA 1%, NaCl 1%, PMSF 1 mM, e PVPP 4%, ácido fórmico 5%) e o material foi mantido sob agitação em ambiente refrigerado (4° C) por 120 min. Logo após, o homogenato foi centrifugado a 15.000 x g por 10 min, a 4 °C. Após a centrifugação, o precipitado foi descartado e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,45 mm. Posteriormente, o material foi dialisado a 4 °C por três dias em água destilada, com três trocas diárias, sendo em seguida, liofilizado e o teor proteico dosado pelo método BCA (ácido bicinconínico) (SMITH et al., 1985) com ovalbumina (SIGMA) como padrão.

3.2.3. Eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE

A eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE foi realizada segundo metodologia descrita por Schäggnier e Von Jagow (1987). Foram usadas placas de vidro 8 x 10 cm e 7 x 10 cm e espaçadores de 0,5 mm.

3.2.4. Preparo das amostras e condições de corrida

Alíquotas do material resultante do processo de extração de peptídeos de folhas dos diferentes cultivares de *Saccharum* spp. foram adicionadas ao tampão de amostra: (Tris/HCl 125 mM pH 8,0; SDS 2,5%; sacarose 10%; azul de bromofenol 0,25%; β-mercaptoetanol 5%). Em seguida, as amostras foram aquecidas por 5 min a 100°C, centrifugadas a 10.000 x g por 2 min e o sobrenadante aplicado no gel de concentração. Para a corrida, utilizaram-se tampão cátodo (Tris/HCl 0,1 M pH 8,3; SDS 0,2%) e tampão ânodo (Tris/HCl 0,2 M pH 8,9; SDS 0,2%). A eletroforese transcorreu por aproximadamente 16h em uma corrente de 20 V. Foram usados os seguintes marcadores: mioglobina (16.950 Da), mioglobina I + II (14.400 Da), mioglobina II (6.200 Da), (Sigma-Aldrich).

3.2.5. Visualização das proteínas

Para visualização das proteínas, o gel foi precipitado com nitrato de prata, segundo a metodologia descrita por Morrissey (1981). Após o término da corrida, o gel foi incubado por 40 min na solução 1 (ácido acético 10%, etanol 4%). Após este período, o gel foi lavado por 2 min em água ultrapura e em seguida incubado por 20 min na solução 2 (glutaraldeído 2%). O gel foi lavado por duas vezes, de 10 min cada em água ultrapura e incubado na solução 3 (etanol 60%) por 20 min. O gel foi, então, incubado por 20 min na solução de precipitação (etanol 20%, nitrato de prata 1%, hidróxido de amônio 30% e NaOH 40%). Em seguida, o gel foi lavado por duas vezes, de 10 min cada, na solução 3 e incubado na solução reveladora (etanol 20%, formaldeído 37%, ácido cítrico 5,75 mM). A coloração foi fixada com uma solução de fixação (ácido acético 10%, 0,5 mL de glicerol) por 10 min. Em seguida o gel foi armazenado em água destilada.

4. RESULTADOS

4.1. Seleção de sequências de defensinas e LTPs

Utilizando bibliotecas de *Expressed Sequence Tags* (ESTs), De-Paula et al. (2008) identificaram seis sequências protéicas candidatas a defensinas em cana-de-açúcar, denominadas *Sugarcane defensins* 1-6 (Sd1-6), e Belarmino et al. (2010) identificaram 17 sequências denominadas *Saccharum officinarum defensins* (SODEFs 1-17). Estas sequências foram alinhadas entre si a fim de verificar redundâncias (**Tabela 2**):

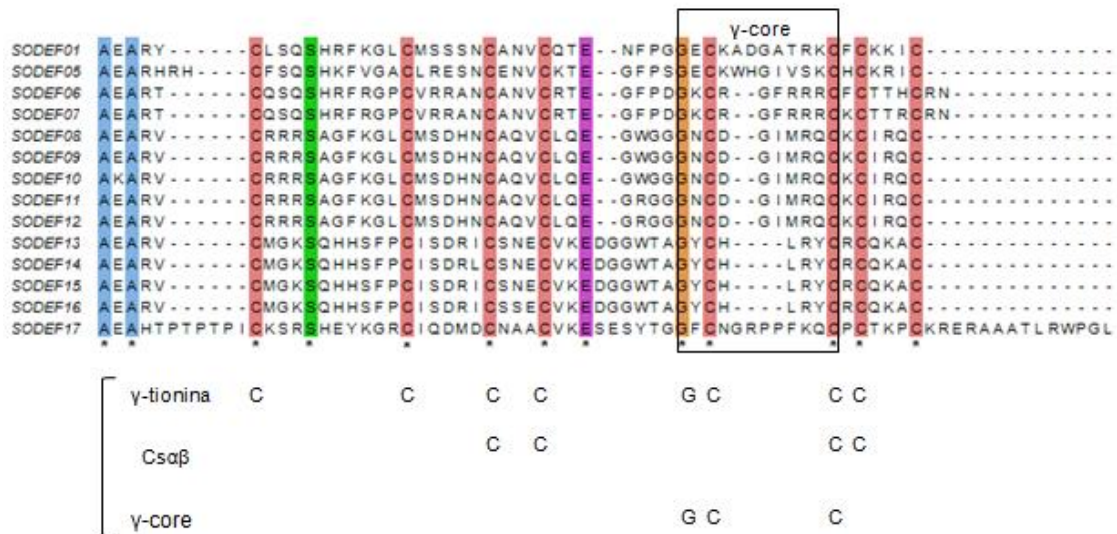
Tabela 2: Correspondência entre as defensinas identificadas por Belarmino et al. (2010) e aquelas identificadas por De-Paula et al. (2008).

De-Paula et al. (2008)		Belarmino et al. (2010)
Nome abreviado	Código de acesso	1º hit
Sd1	CA112870	SODEF 1-4
Sd2	CA095771	SODEF 09
Sd3	CA259771	SODEF 05
Sd4	CA259589	SODEF 06
Sd5	CA297803	SODEF 17
Sd6	CA188998	SODEF 13

Foi verificado que as seis defensinas identificadas por De-Paula et al. (2008) estavam incluídas entre as de Belarmino et al. (2010). Quatro defensinas identificadas por Belarmino et al. (2010) (SODEF 1-4) possuem sequências de aminoácidos idênticas e foram reduzidas a uma única sequência denominada SODEF 1-4. Foram selecionadas, portanto, 14 sequências candidatas a defensinas em cana-de-açúcar. As sequências foram analisadas em um alinhamento global (**Figura 8A**) para a identificação da posição dos resíduos conservados característicos de defensinas. As 14 defensinas mostraram a presença dos elementos estruturais característicos destes peptídeos (**Figura 8A**), dentre eles o elemento estrutural γ -core, as oito cisteínas e também uma serina, uma glicina e um ácido glutâmico conservados em posições características de defensinas. O *weblogo*

(Figura 8B) gerado a partir do alinhamento das 14 sequências mostra os resíduos de aminoácidos mais abundantes no peptídeo maduro, evidenciando a posição das cisteínas para a formação de ligações dissulfeto, da glicina e, também, a divergência entre as suas sequências primárias.

A



B

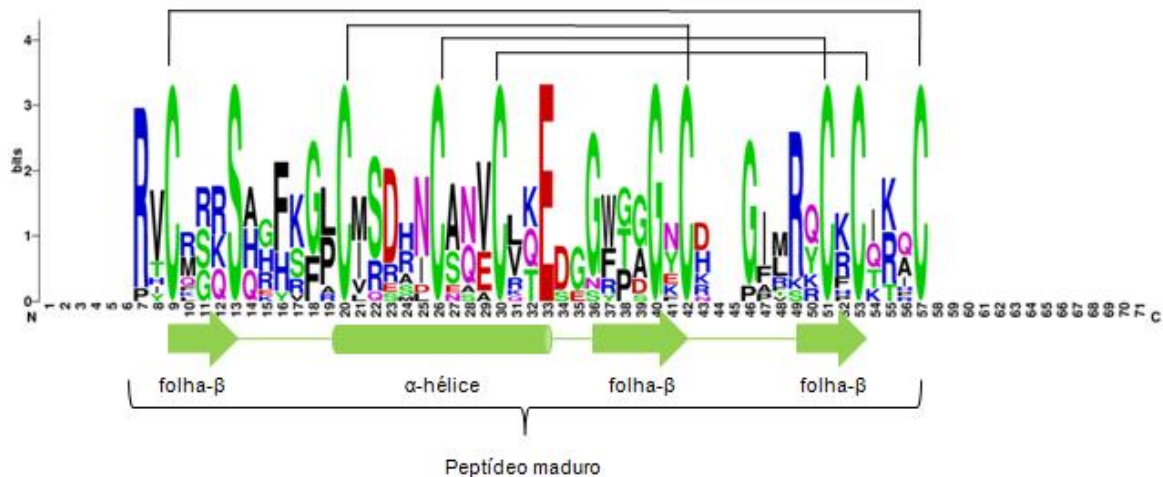


Figura 8: Agrupamentos de defensinas de acordo com suas similaridades quanto à constituição peptídica. **(A)** Alinhamento das SODEFs de cana-de-açúcar, mostrando os resíduos conservados e excluindo o peptídeo sinal. Alinhamentos foram refinados manualmente tendo como referência os resíduos de cisteínas conservados envolvidos na formação de ligações dissulfeto. O elemento estrutural γ -core é destacado por uma caixa. Gaps foram incluídos para otimizar o alinhamento. Os resíduos conservados são indicados por um (*) ao longo do alinhamento. Elementos estruturais típicos são mostrados abaixo do alinhamento no programa Jalview. **(B)** Weblogo dos peptídeos maduros preditos mostrando conservação de resíduos. Ligações dissulfeto são representadas por linhas acima do weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

Um total de 16 LTPs de *Sorghum bicolor* presentes no artigo de Wang et al. (2012) foram selecionadas para alinhamento contra as sequências genômicas de cana-de-açúcar. Essas sequências tiveram seus IDs atualizados para serem facilmente localizadas no Phytozome (**Tabela 3**).

Tabela 3: Sequências de LTPs de sorgo (*Sorghum bicolor*) foram retiradas do artigo de Wang et al. (2012) e tiveram seus IDs atualizados de acordo com a atual nomenclatura do Phytozome (GOODSTEIN et al., 2012).

Grupo	<i>Sorghum bicolor</i> Wang et al. (2012)	<i>Sorghum bicolor</i> ID atual
I.1	Sb08g002680.1	Sobic.008G030900.2.p
	Sb08g002690.1	Sobic.008G030900.1.p
	Sb08g002670.1	Sobic.008G030700.1.p
	Sb08g002700.1	Sobic.008G031000.1.p
	Sb08g002660.1	Sobic.008G030600.1.p
I.2	Sb03g038280.1	Sobic.003G338700.1.p
I.4	Sb07g002600.1	Sobic.007G029800.1.p
I.5	Sb03g001580.1	Sobic.003G016000.1.p
III	Sb02g030420.1	Sobic.002G270400.1.p
	Sb07g025160.1	Sobic.007G180700.1.p
V	Sb03g039880.1	Sobic.003G356500.1.p
	Sb06g016160.1	Sobic.006G074200.1.p
	Sb06g016170.1	Sobic.006G074300.1.p
VI	Sb08g005360.1	Sobic.008G064000.2.p
	Sb03g037220.1	Sobic.003G326300.1.p
	Sb03g037210.1	Sobic.003G326200.1.p

4.2. Identificação de defensinas e LTPs em sequências genômicas de cana-de-açúcar

Após seleção das sequências de defensinas e LTPs, foram realizados os alinhamentos contra o genoma da cana-de-açúcar (GRATIVOL et al., 2014). As sequências peptídicas de defensinas foram alinhadas contra o genoma (TBLASTN), e 11 *scaffolds* foram inicialmente identificados como potenciais genes. Após predição da proteína e verificação dos resíduos de cisteína conservados por meio de alinhamento com as demais defensinas, cinco *scaffolds* foram descartados por não possuírem tais resíduos nas posições esperadas. Seis *scaffolds* foram identificados como candidatos a genes de defensinas (**Tabela 4**).

Tabela 4: *Scaffolds* candidatos a defensinas no genoma da cana-de-açúcar.

Grupos de SODEFs	aa	<i>Scaffold</i> de cana-de-açúcar	Proteína predita (aa)	Tamanho do alinhamento	Evalue
		scaffold282041 size489	68	45/49 (80)	3e-20
1	80-83	scaffold57294 size2091	60	43/43 (80)	4e-19
2	80	scaffold520753 size324	92	41/41 (80)	7e-18
3	62-96	scaffold88512 size2077	64	51/52 (96)	4e-24
4	82-102	scaffold2513 size5793	52	52/53 (102)	2e-25
5	93	scaffold323100 size443	49	40/49 (93)	7e-16

Com o baixo número de possíveis genes de defensina identificados em cana-de-açúcar (seis), verificamos a conservação entre os peptídeos de defensinas descritas na literatura (14). A análise da árvore filogenética com as 14 defensinas selecionadas para este trabalho mostrou que defensinas que tiveram os mesmos *scaffolds* como primeiro *hit* no alinhamento contra o genoma se agruparam (**Figura 9**). A SODEF 17 de Belarmino et al. (2010) foi a única a formar um grupo à parte na filogenia. A conservação entre as sequências do mesmo grupo também pode ser observada na **Figura 8A**. Os grupos foram numerados de 1 a 5 e, a partir de então, passamos a considerar variações de sequências entre os grupos.

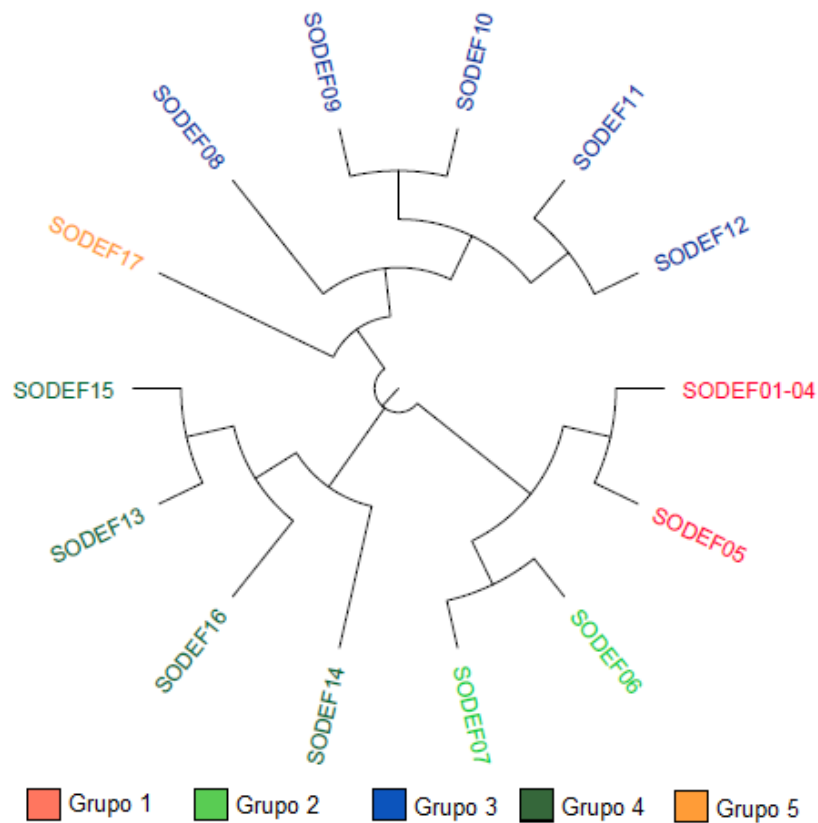


Figura 9: Agrupamentos de defensinas de acordo com suas similaridades quanto à constituição de aminoácidos. Alinhamento das sequências realizado por Jalview e obtenção da árvore filogenética no MEGA 7.0.

As sequências de aminoácidos de LTPs de sorgo foram alinhadas contra o banco de sequências genômicas de cana-de-açúcar. Inicialmente, foram selecionados 14 *scaffolds* como possíveis genes de LTPs. Após predição das proteínas e análise dos resíduos de cisteína conservados, cinco *scaffolds* foram descartados por não apresentarem todos os resíduos característicos de defensinas nas posições esperadas. Foram identificados, portanto, nove candidatos a genes de LTPs (**Tabela 5**).

Tabela 5: *Scaffolds* candidatos de LTPs identificados no genoma da cana-de-açúcar.

Grupo	ID Sobic	<i>Scaffolds</i>
I.1	Sobic.008G030900.2.p	
	Sobic.008G030900.1.p	
	Sobic.008G030700.1.p	scaffold41602 size2134
	Sobic.008G031000.1.p	scaffold20652 size3599
I.2	Sobic.008G030600.1.p	scaffold219457 size599
	Sobic.003G338700.1.p	scaffold31802 size2240
I.4	Sobic.007G029800.1.p	scaffold356482 size414
I.5	Sobic.003G016000.1.p	scaffold88322 size2077
III	Sobic.002G270400.1.p	
	Sobic.007G180700.1.p	
V	Sobic.003G356500.1.p	
	Sobic.006G074200.1.p	scaffold23901 size2930
VI	Sobic.006G074300.1.p	
	Sobic.008G064000.2.p	scaffold84056 size2079
	Sobic.003G326300.1.p	
	Sobic.003G326200.1.p	scaffold61537 size2089

As sequências preditas a partir dos *scaffolds* de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar estão discriminadas no **Apêndice A**.

4.3. Caracterização de transcritos de defensinas e LTPs em bibliotecas de RNA-seq de cana-de-açúcar

As 14 defensinas de cana-de-açúcar e as 16 LTPs de sorgo selecionadas foram alinhadas contra bibliotecas de RNA-seq de cana-de-açúcar e os transcritos identificados como defensinas e LTPs foram contabilizados e apresentados na forma de *heatmaps* de abundância (**Figura 10**). As características dos alinhamentos dos transcritos identificados encontram-se no **Apêndice B**.

A análise da **Figura 10A** mostrou que mais transcritos de LTP1.I.1, LTP2.I.1 e LTP7.V foram identificados em SP70-1143 do que nos outros genótipos, sendo, portanto, as LTPs com mais transcritos identificados. LTP5.I.5, LTP4.I.4 e LTP8.VI, por outro lado, não tiveram transcritos identificados em nenhum transcriptoma. Entre as defensinas, os grupos 1, 2 e 4 tiveram mais transcritos identificados em SP70-1143 do que nos outros. Analisando a **Figura 10B** observamos que, SP70-1143

possui mais transcritos dos grupos 1 e 2 de defensinas do que das outras proteínas. Já *S. officinarum* possui mais transcritos de defensinas dos grupos 3 e 5. Em *S. spontaneum*, foram identificados mais transcritos da LTP1.I.1 do que dos outros peptídeos. Em RB72454 foram identificados mais transcritos do Grupo 5 de defensinas e da LTP2.I.1. Finalmente, em RB857515 identificamos mais transcritos de LTP1.I.1, LTP2.I.1 e LTP3.I.2 do que dos outros peptídeos. A quantidade de transcritos identificados nos diferentes transcriptomas, portanto, variou consideravelmente.

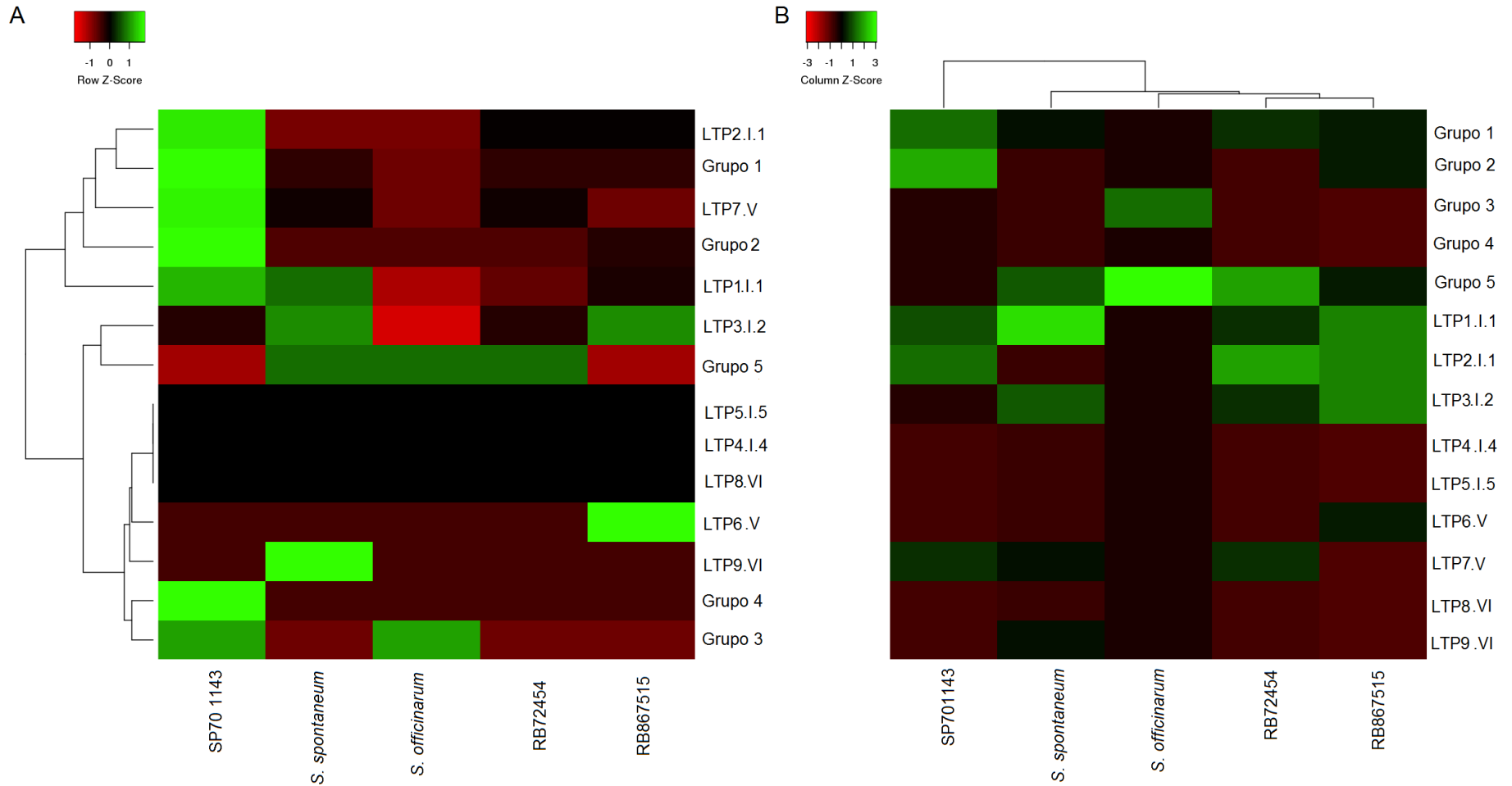


Figura 10: *Heatmaps* de abundância de transcritos de defensinas mostrada em grupos como na **Figura 9** e LTPs identificados em transcriptomas de cana-de-açúcar. Os transcritos identificados como defensinas e LTPs por meio de alinhamentos foram contabilizados e utilizados para geração dos *heatmaps* normalizados por linha **(A)** e por coluna **(B)** por meio do programa Heatmapper.

4.4. Árvores filogenéticas de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar

Defensinas de diferentes espécies de plantas foram selecionadas do SWISS-PROT e do NCBI para estabelecimento de relação filogenética entre as sequências preditas a partir de *scaffolds* e transcritos de cana-de-açúcar e sequências de defensinas de outras monocotiledôneas e, também, eudicotiledôneas (**Tabela 6**).

Tabela 6: Defensinas selecionadas para alinhamento e obtenção de relacionamento filogenético com SODEFs identificadas por Belarmino et al. (2010) e De-Paula et al. (2008) e *scaffolds* genômicos. Sequências foram obtidas do SWISS-PROT, à exceção de *Saccharum officinarum* (GenBank). Tabela adaptada de Carvalho & Gomes (2011).

Espécie	Denominação	Família	Código de acesso
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ath	Brassicaceae	A0A178WVK7
<i>Capsicum annuum</i>	Can	Solanaceae	Q8W4V6
<i>Echinochloa crusgalli</i>	Ecr	Poaceae	P86518
<i>Helianthus annuus</i>	Han1	Asteraceae	P82659
	Han2		Q8LSM8
<i>Hordeum vulgare</i>	Vvu	Poaceae	P20230
<i>Medicago truncatula</i>	Mtr		Q5YLG7
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pvu		F8QXP9
<i>Pisum sativum</i>	Psa	Fabaceae	P81929
	Sof1		CA112870
	Sof2		CA259771
<i>Saccharum officinarum</i>	Sof5	Poaceae	CA297803
	Sbi		P21923
<i>Spinacea oleracea</i>	Sol	Brassicaceae	P81571
<i>Triticum aestivum</i>	Tae		Q8L698
<i>Triticum turgidum</i>	Ttu	Poaceae	P20158
<i>Zea mays</i>	Zma		W5S0Y8

As proteínas preditas a partir dos genes candidatos a defensinas e dos transcritos de cana-de-açúcar foram alinhadas globalmente no programa MUSCLE, juntamente com defensinas de outras espécies de plantas, monocotiledôneas e eudicotiledôneas (**Figura 11**). Os resíduos de cisteína conservados estão

Em seguida foi gerada uma árvore filogenética, onde uma separação entre as defensinas de monocotiledôneas e as de eudicotiledôneas pode ser observada (**Figura 12**). Além disso, as sequências preditas a partir dos *scaffolds* e dos transcritos se agruparam corretamente com as SODEFs a eles anteriormente correlacionadas, reforçando suas identidades de defensinas. SODEF17 e Sof5 (Sd5), sendo a mesma proteína identificada por diferentes autores, se agruparam em um mesmo clado. Sof1 e Sof3 (respectivamente Sd1 e Sd3), as duas defensinas de De-Paula et al. (2008) que apresentam o maior nível de similaridade (61%), estão em um mesmo grupo.

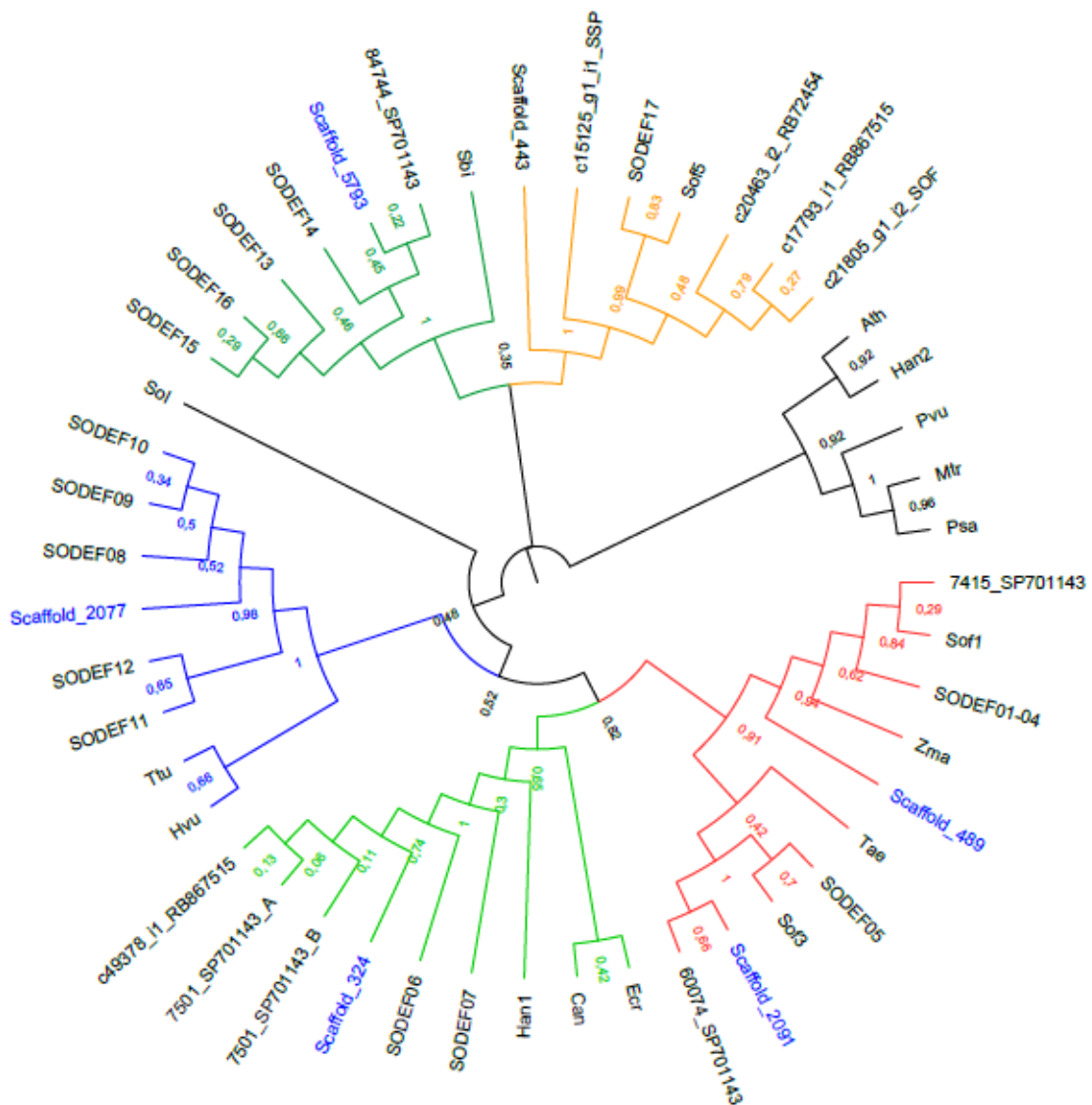


Figura 12: Árvore filogenética de defensinas de cana-de-açúcar e outras defensinas de plantas monocotiledôneas e eudicotiledôneas. A análise filogenética foi conduzida usando o algoritmo *neighbor-joining* com 1.000 repetições de *bootstrap*. *Scaffolds* identificados como genes de defensinas estão destacados em azul.

LTPs de diferentes espécies de plantas foram selecionadas do SWISS-PROT, NCBI e Phytozome (**Tabela 7**) a fim de obtermos um relacionamento filogenético com as proteínas preditas a partir dos *scaffolds* e transcritos identificados como LTPs de cana-de-açúcar. As proteínas preditas e demais LTPs foram alinhadas, evidenciando a presença das oito cisteínas conservadas, o elemento estrutural C-X_n-C-X_nCC-X_n-CXC-X_n-C-X_n-C, presente na grande maioria das LTPs (**Figura 13**). Um resíduo de prolina conservado também pode ser observado destacado em amarelo.

Tabela 7: LTPs de plantas selecionadas para alinhamento e obtenção de relacionamento filogenético com LTPs identificadas no genoma de cana-de-açúcar (LTP de 1 a 9). Sequências foram obtidas do SWISS-PROT, à exceção das LTPs de *Saccharum officinarum* (GenBank) e das LTPs de *Sorghum bicolor* (Phytozome).

Espécie	Denominação	Família	Código de acesso
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ath1	Brassicaceae	Q8W453
	Ath2		Q9S713
<i>Capsicum annuum</i>	Can	Solanaceae	Q9ZPI9
<i>Helianthus annuus</i>	Han	Asteraceae	P82007
<i>Hordeum vulgare</i>	Hvu		P07597
<i>Oryza sativa</i>	Osa	Poaceae	Q10ST8
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pvu	Fabaceae	O24440
<i>Pisum sativum</i>	Psa		A0A161AT60
<i>Saccharum officinarum</i>	Sof		ALG04466.1
<i>Sorghum bicolor</i>	Sobic	Poaceae	Sobic.008G030900.2.pSobic.008G030900.1.p Sobic.008G030700.1.pSobic.008G031000.1.p Sobic.003G338700.1.pSobic.007G029800.1.p Sobic.003G016000.1.pSobic.006G074200.1.p Sobic.006G074300.1.pSobic.008G064000.2.p Sobic.003G326200.1.p
<i>Spinacia oleracea</i>	Sol	Amaranthaceae	P10976
<i>Triticum aestivum</i>	Tae	Poaceae	P82900
<i>Zea mays</i>	Zma		P19656

```

Sobic.008G030900.2.p C-----GQVSSAI-APCLSYAR--G-QGSAF--SAGCCSGVRSLSAARTTADRRAACNLKNAARGI---SGLNA--GNAASIPSKGVSVPYTISTSTDCSRV--
Sobic.008G030900.1.p C-----GQVSSAI-APCLSYAR--G-QGSAF--SAGCCSGVRSLSAARTTADRRAACNLKNAARGI---SGLNA--GNAASIPSKGVSVPYTISTSTDCSRV--
Sobic.008G030700.1.p C-----GQVNSAI-SPCLAYAR--G-TGTAFA--SAAACSGVRSLSAASSTADRRTACNLKSAAGRV---SGLNA--GNAASIPSKGVNIPYTIASASIDCSR--
Sobic.008G031000.1.p C-----SDVTSSV-APCLGYAM--G-TTAF--SPAACCTGVRSLNSRASSTADRQATCAQLKSMTSRLGGGGVSM--GNAASIPSKGVSVGVPI SPNVDCSKIN--
Sobic.003G338700.1.p C-----STVYSTL-MPLPFVQ--M-GGAMP--PQPCCGGIRSLLAQADNTPDRRTICGLKKNVANGA---NGSGTYINRAAALPSKGVSLPYKISTNVNNTIN--
Sobic.007G029800.1.p C-----ADVDANL-RACVGYVT--G-KEAAFA--GGCCAGVRRIRGMPSTAEERRQACEVVKQAAAGY---QPLNA--DAIRDLPEKGGAPLFPFLTLNFDQTTIP--
Sobic.003G016000.1.p C--SAATLQCAQVAQLM-TFCMPYMT--GAPGMTF--YGI CCNSLGVLNQLAATRDRVAACSVVKAAGAF---PAVDF--ARAAGLPAAGLSISFTISPNMDCNQVTEE
Sobic.006G074200.1.p CGAT--PPDRMALKL-APCASAQA--N-PSSAFA--SSSCSAVHSIGKQSP-----KCLCAVMLSKTAKS-AGIKA--EVAITIPKRONL---VDRPIGYKGGDYTLF
Sobic.006G074300.1.p CGAT--PPDMALKL-APCASAQA--D-PSSAFA--SSSCSAVHSIGKQSP-----KCLCAVMLSNTAKS-AGIKA--EVAITIPKRONL---VDRPVGYKGGDYTLF
Sobic.008G064000.2.p C-----AKDAEAMKQECCKFEVFPVNPKLCF--SPAACCAVWQR-----ADIPCLCKRVTPVEKLV---WCM--EKVVVYVANYCKK---PFTPGYKGGSYTVP
Sobic.003G326200.1.p C-----NQDLNQLITNQDYVRFPPDPKIFP--SAAACCGVILQG-----ANIPCLCKSVTPTVETL---ISM--DKVVVYVASYGGR---PLKPGSGGGSYHVP
LTP1.1.1 C-----GQVTSAI-SPCLSYAR--G-QGSAF--SSGCCSGVRSLSAARTSADRRTACNLKSAARSI---SGLNA--GNAASIPSKGVNVPYTIISTSTDCSKYVHI
LTP2.1.1 C-----GEVTSV-APCLGYAM--G-TASSFA--SAAACNGVRSLSNRATSTADRQAAACQLKSMTSRLGGGGVSM--GNAASIPGKGGVTGVPI SPNVDCSKYVGR
LTP3.1.2 C-----STVYSTL-MPLPFVQ--M-GGAMP--PQPCCGGIRSLLAQADNTPDRRTICGLKKNVANGA---NGSGTYISRAAALPSKGVSLPYKISTNVNNTYVYV
LTP4.1.4 C-----ADVDENL-RPCVGYVT--G-KEAAFA--AAECVGVKIRAMPSTADRQACEVVKQAAAKY---QPLNA--DAIRDLPEKGGAPLFPFLTLNFDQTTCVYP
LTP5.1.5 C-----VQVAQLM-APCMPYLT--GAPGMTF--YGI CCNSLGVLNQLAATRDRVAACSVVKAAGAF---PAVDF--ARAAGLPAAGLSISFTISPNMDCNQVTEE
LTP6.V CGAT--PPDRMALKL-APCASAQA--N-PSSAFA--SSSCSAVHSIGKQSP-----KCLCAVMLSKTAKS-AGIKP--EVAITIPKRONL---VDRPIGYKGGKQNN
LTP7.V CGAT--PPDTMALKL-APCASAQA--D-PSSAFA--SSSCSAVHSIGKQSP-----KCLCAVMLSNTAKS-AGIKA--EVAITIPKRONL---VDRPVGYKGGGR---
LTP8.VI C-----DKDAEAMKQECCKFEVFPANPKLEF--SPAACCAVWQR-----ADIPCLCKRVTPPEAKL-----WCM--EKVVVYVANYC-----
LTP9.VI C-----NQDLQDLITNQDYVRFPPDPKIFP--SAAACCGVILHRV-----IPCLCKSVTPTVETI---VCM--DKVVVYVASYGKR---PLKPGSGGGSK---
1722-SP70 C-----GQVSSAI-APCLSYAR--G-QGSAF--SAGCCSGVRSLSAARTSADRRTACNLKSAARSI---SGLNA--GNAASIPSKGVSVPYTISTSTDCSRV--
2260-SP70 CGAT--PPDTMALKL-APCASAQA--D-PSSAFA--SSSCSAVHSIGKQSP-----KCLCAVMLSKTAKS-AGIKP--EVAITIPKRONL---VDRPIGYKGGDYTLF
c33168_g3_i1-RB72454 C-----GQVTSAI-SPCLSYAR--G-QGSAF--SSGCCSGVRSLSAARTSADRRTACNLKSAAGRI---SGLNA--GNAASIPSKGVSIPTISTSTDCSRLS--
c29561_g3_i2-RB72425 C-----GDVTSV-APCLGYAM--G-TASSFA--SAAACNGVRSLSNRATSTADRQATCAQLKSMTSRLGGGGVSM--GNAASIPGKGGVTGVPI SPNVDCSKIN--
c25117_g1_i1-RB72454 C-----STVYSTL-MPLPFVQ--M-GGAMP--PQPCCGGIRSLLAQADNTPDRRTICGLKKNVANGA---NGSGTYISRAAALPSKGVSLPYKISTNVNNTIN--
c24526_g1_i1-RB72454 CGRA--SADRVALRL-APCISAAD--D-PQSTF--TSSCSAVHAI GQSPS-----KCLCAVMLSGTARA-AGIKP--EVAITIPKRONMA---DRPVGYKGGDYTLF
c29056_g1_i1-RB867515 C-----GQVTSAI-SPCLSYAR--G-QGSGF--SAAACSGVRSLSAASSTADRRTACNLKSAAGRI---SGLNA--GNAASIPSKGVSIPTISTSTDCSRLS--
c26252_g1_i2-RB867515 C-----GEVTSV-APCLGYAM--G-TASSFA--SAAACNGVRSLSNRATSTADRQATCAQLKSMTSRLGGGGVSM--GNAASIPGKGGVTGVPI SPNVDCSKIN--
c23126_g1_i2-RB867515 C-----STVYSTL-MPLPFVQ--M-GGAMP--PQPCCGGIRSLLAQADNTPDRRTICGLKKNVANGA---NGSGTYISRAAALPSKGVSLPYKISTNVNNTIN--
c21070_g1_i1-RB867515 CGRA--SADRVALRL-APCVSAAD--D-PQSTF--TSSCSAVHAI GQSPS-----KCLCAVMLSGTARA-AGIKP--EVAITIPKRONMA---DRPVGYKGGDYTLF
c25554_g1_i1-SSP C-----GQVSSAI-APCLSYAR--G-QGSAF--SAGCCSGVRSLSAASSTADRRTACNLKSAARGI---SGLNA--GNAASIPSKGVSVPYTISTSTDCSRV--
c13059_g1_i2-SSP C-----STVYSTL-MPLPFVQ--M-GGAMP--PQPCCGGIRSLLAQADNTPDRRTICGLKKNVANGA---NGSGTYISRAAALPSKGVSLPYKISTNVNNTIN--
c16862_g1_i1-SSP CGAT--PPDTMALKL-APCASAQA--D-PSSAFA--SSSCSAVHSIGKQSP-----KCLCAVMLSNTAKS-AGIKA--EVAITIPKRONL---VDRPVGYKGGDYTLF
LTP C-----GMANEDF-KLQPAASVND-PTDSF--SAAEC AALGK-----ADLGCICRY-KGVAGIWMRIYHIDPSRAMALPGKGLTMP-----SNCS-----
Ath1 C-----GMSQDEL-NECKPAVS--KENPTSF--SQPCCTALQH-----ADFACLGGYKNSPWLGS-FGVDP--ELASALPKQGL-----ANAPTC-----
Ath2 C-----QASQLAV---CASAIL---SGAKF--SGECCGNLR-----AQQGFQYAKDPTYG--QYIRS--PHARDTLTSGLAVP-----HG-----
Hvu C-----GQVDSKM-KPLTYVQ---GGPGF--SGECCNGVRDLHNQAQSSGDRQTVNCLKGIARGI---HNLNL--NNAASIPSKGVNVPYTI SPDIDCSRIY--
Osa C-----NAGQLTV---CTGAIA---GGARF--TAAACSSLR-----AQQGFQFAKDPRYG--RYVNS--PNARKAVSSGIALP-----TG-----
Psa C-----GTVSADM-APCVTYLQ--APNNASF--PPCCAGVKKLLAAATTTDRQAAACNLKSAAGSI---PKLNT--NNAALPGKGGVSIPTISTSTNNTVRF--
Zma C-----GQVASAI-APCISYAR--G-QGSGF--SAGCCSGVRSLSAARTTADRRAACNLKNAAGV---SGLNA--GNAASIPSKGVSIPTISTSTDCSR--
Han C-----NDVTGN*-TCLPYLR---SGGKF--TPACAGAKKLLGATRTQADRRTACKAKTAAAPQL---KVRP--DMASSLPGKGGISTSIPIPNVNTIP--
Can C-----GQIQGV-VNCLPYL---QNRGF--LGRCCGVIKDLKLLCKTIPHERRSCKRVKTAANI---KGI DF--GKTAGLSGVGVKIPSEI SPSSVDCSKVK--
Pvu C-----GQVTSAL-ASGINKLFLT---KGGAVF--ASCCSGVRSLSAASKTTPDRQV--NCLKSAAGA I---PGFNA--NNAGILPGKGGVSIHYNIISTSTDCATIKF--
* * * * *

```

Figura 13: Alinhamento comparativo de seqüências de aminoácidos de LTPs preditas a partir de *scaffolds* e de transcritos identificados no genoma de cana-de-açúcar (LTPs de 1 a 9) e LTPs de outras espécies de plantas, excluindo os aminoácidos do peptídeo sinal e do domínio C-terminal. Seqüências foram obtidas do SWISS-PROT, à exceção das LTPs de *Saccharum officinarum* (GenBank) e das LTPs de *Sorghum bicolor* (Phytozome). Resíduos conservados assinalados com (*). Prolina destacada em verde. Os resíduos conservados de cisteína estão destacados em vermelho. *Scaffolds* e transcritos de cana-de-açúcar destacados pelo retângulo preto.

Após o alinhamento, foi gerada uma árvore filogenética relacionando as LTPs identificadas em cana-de-açúcar e outras LTPs de plantas (**Figura 14**). As proteínas preditas a partir dos *scaffolds* e dos transcritos alinharam corretamente com as LTPs de sorgo utilizadas como referência. Diferentemente das defensinas, que se agrupam formando clados distintos de eudicotiledôneas e monocotiledôneas, as LTPs não parecem ter o mesmo perfil de conservação. Ath1, de *Arabidopsis*, por exemplo, agrupou-se com Sof, uma LTP de cana-de-açúcar, encontrada no banco de dados do NCBI. Ath2, por outro lado, agrupou-se com LTPs de outras eudicotiledôneas (*Spinacea oleracea* e *Pisum sativum*). Ou seja, embora se tratem de LTPs de um mesmo organismo, parecem ser menos conservadas entre eudicotiledôneas ou monocotiledôneas.

4.5. Análise de expressão de defensinas e LTPs em bibliotecas de RNA-seq

Transcritos de defensinas e LTPs identificados no transcriptoma TR-7 foram utilizados para análise de expressão em bibliotecas de RNA-seq construídas a partir de plantas de cana-de-açúcar submetidas à infecção pela bactéria *Acidovorax avenae* (uma bactéria patogênica Gram-negativa) (**Figura 15A**) e, em condição de seca e em presença de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (**Figura 15B**). Defensinas e LTPs cujos transcritos não foram identificados no TR-7 não tiveram suas expressões analisadas.

Durante infecção pela bactéria *Acidovorax avenae* (**Figura 15A**), as defensinas (Grupos 1, 2 e 3) apresentaram um aumento de expressão em comparação com o controle. As LTPs demonstraram um perfil de expressão similar às defensinas. À exceção da LTP1.I.1, que se mostrou altamente expressa tanto nas plantas infectadas por *A. avenae* como no respectivo controle, as demais LTPs analisadas (LTP2.I.1, LTP3.I.2 e LTP7.V) foram mais expressas nas plantas infectadas por *A. avenae*, sugerindo uma participação destas LTPs no combate a patógenos. LTP2.I.1 também demonstrou uma expressão considerável no controle.

Em condição de déficit hídrico e em presença de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, cana-de-açúcar não apresentou expressão das defensinas dos Grupos 4 e 5 (**Figura 15B**) porém, os mesmos grupos apresentaram discreta expressão quando as plantas foram submetidas ao tratamento combinado de déficit hídrico e *G. diazotrophicus* tanto na parte aérea, quanto na raiz, sugerindo que a combinação dos dois possa influenciar na expressão destas defensinas. O Grupo 2 não apresentou expressão na parte aérea de plantas submetidas somente à *G. diazotrophicus*, mas apresentou discreta expressão nas raízes de plantas submetidas ao mesmo tratamento, além de discreto aumento de expressão quando submetido somente ao déficit hídrico. A expressão do Grupo 1 variou pouco em relação aos controles e aos diferentes tratamentos, e pareceu diminuir nos tratamentos em que as defensinas do Grupo 2 se mostraram mais expressas (déficit hídrico e *G. diazotrophicus*, isoladamente). Nestas mesmas condições, o perfil de expressão das LTPs se mostra bem diferente (**Figura 15B**). LTP1.I.1 é altamente expressa, tanto nas plantas submetidas aos tratamentos quanto nos controles. LTP2.I.1 também se apresentou altamente expressa na parte aérea de plantas controle e submetidas ao déficit hídrico, diminuindo a expressão em *G.*

diazotrophicus isoladamente e em déficit hídrico mais *G. diazotrophicus*. A expressão de LTP2.I.1 se mostrou oposta nas raízes com relação ao observado na parte aérea. LTP3.I.2 se mostrou altamente expressa na parte aérea de plantas submetidas ao déficit hídrico, tendo menor expressão quando combinados os tratamentos de seca e *G. diazotrophicus*. O contrário foi observado nas raízes. LTP7.V também parece ser responsiva ao déficit hídrico, pois apresenta alta expressão na parte aérea e raízes de plantas submetidas a esse tratamento, tanto na ausência quanto na presença de *G. diazotrophicus*.

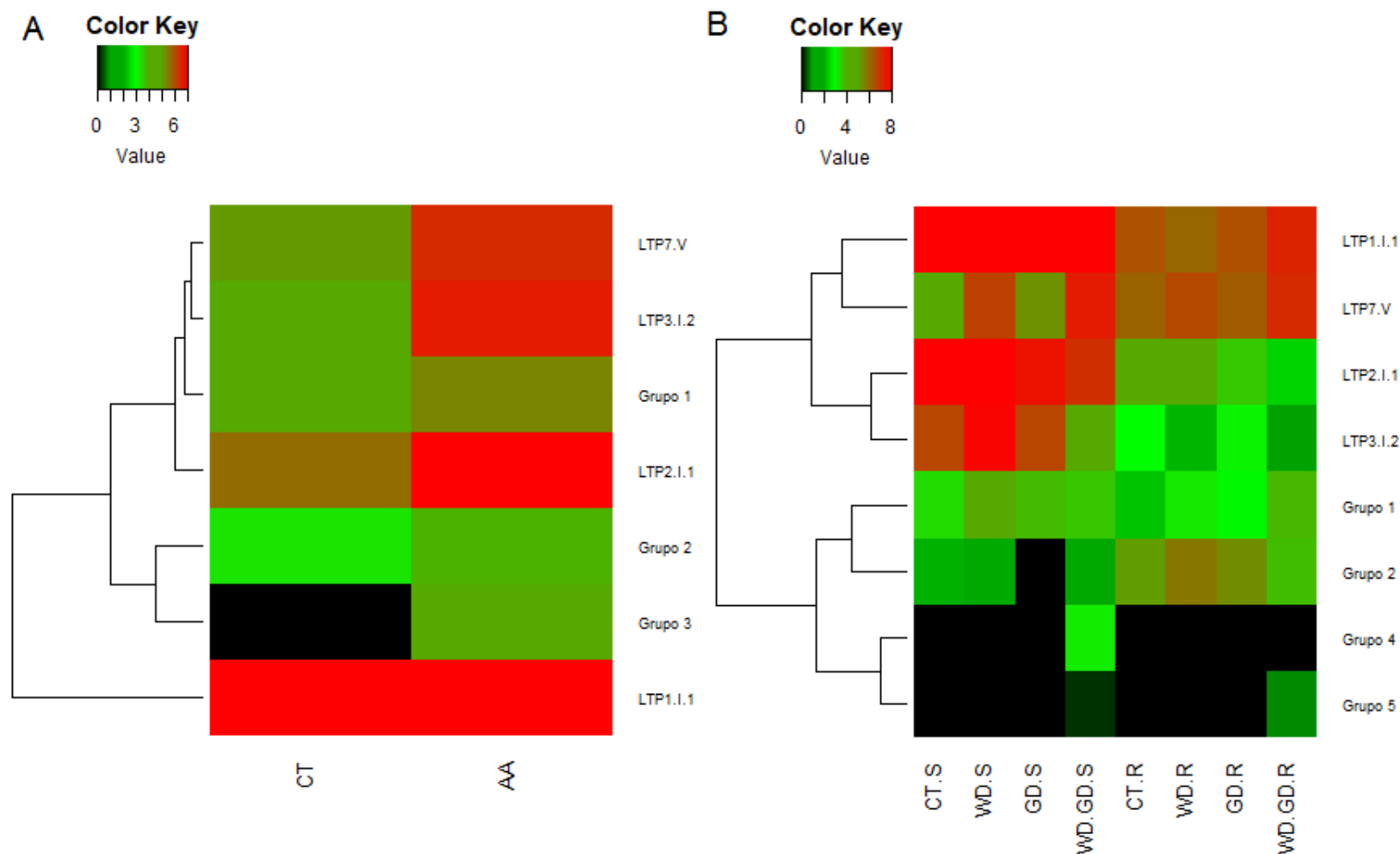


Figura 15: Heatmaps de expressão de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar. Transcritos de defensinas e LTPs foram alinhados contra transcriptomas de plantas submetidas a bactérias patogênicas **(A)** e déficit hídrico e bactérias benéficas **(B)**. CT = controle; WD = seca; GD = *Gluconacetobacter diazotrophicus*; AA = *Acidovorax avenae*; S= shoot; R= root.

4.6. Análise da região promotora dos genes de defensinas e LTPS

Análise das regiões promotoras dos genes identificados como defensinas e LTPs de cana-de-açúcar permitiu identificar diversos fatores de transcrição. As características da região promotora destas proteínas estão listadas na **Tabela 8**. Alguns fatores de transcrição, presentes nos genes de defensinas e LTPs identificados em cana-de-açúcar, já foram caracterizados em genes de proteínas PR (Kaur et al., 2017), tais como: ABRE, elemento responsivo a ácido abscísico; MBS, sítio de ligação à MYB e responsivo à seca; TGACG-motif, responsivo ao MeJA e ao ácido salicílico e G-box, responsivo à luz.

Tabela 8: Fatores de transcrição identificados nas regiões promotoras de genes de defensinas e LTPs por meio dos programas TSSP (SOLOVYEV; SHAHMURADOV; SALAMOV, 2010) e PlantCARE (LESCOT, 2002).

Promotor	Fator de transcrição	Função atribuída	Referência
A-box	Diferentes fatores bZIP, RITA-1	Elemento regulatório comum	(IZAWA et al., 1994)
ABRE	ABF1	Elemento associado à resposta ao ácido abscísico	(CHOI et al., 2000)
ACE	bZIP	Parte de elemento associado à resposta à luz	(MEHRTENS et al., 2005)
AE-box	52-kDa (b3-domain) TF	Elemento associado à resposta à luz	(ROY et al., 2012)
Alfin1 BS1o	Alfin1	Elemento associado à regulação da expressão gênica na raiz e tolerância à salinidade	(WINICOV, 2000)
AT1-motif	AT-1	Parte do módulo de resposta à luz	(TERZAGHI, 1995)
AtMYB77 BS	AtMYB77	Elemento associado à resposta a auxinas	(AMBAWAT et al., 2013)
BS1	bHLH	Resposta à luz, a giberelinas e a brassinosteróides	(WANG et al., 2009)
CARG3 (AGL3)	AGL3	Elemento associado ao desenvolvimento floral	(JETHA; THEISSE; MELZER, 2014)

(Tabela 8) continuação

Promotor	Fator de transcrição	Função atribuída	Referência
CAAT/CCAAT-box	MYBHv1	Elemento comum da região promotora e regiões potencializadoras	(LIU et al., 2015)
CCA1	CCA1	Elemento associado ao controle do ritmo circadiano	(ANDRONIS et al., 2008)
CGTCA-motif	bZIP	Elemento associado à resposta ao MeJA	(ROUSTER et al., 1997)
CCGTCC-box	Desconhecido.	Elemento associado à ativação específica de meristema	(LOGEMANN; PARNISKE; HAHLBROCK, 1995)
C-repeat	CBF1	Elemento associado aos ritmos circadianos e tolerância ao frio	(FOWLER, 2005)
C2b-BS	root-specific nuclear factor (ERN)	Elemento associado à regulação transcricional na raiz	(ANDRIANKAJA et al., 2007)
Dof1 BSopt	Dof1	Elemento associado à expressão de genes envolvidos com o metabolismo do carbono	(YANAGISAWA, 2000)
DRE	CBF1	Elemento associado à resposta à seca	(KIZIS; PAGES, 2002)
E1	DPBF-1	Elemento associado à resposta ao ABA	(KIM; CHUNG; THOMAS, 1997)
Em2	EmBP-1	Elemento associado à resposta a ácido abscísico	(NIU; GUILTINAN, 1994)
E-region	CCA1	Elemento associado ao ritmo circadiano	(FUJIMORI et al., 2005)
ERE1	EIN3	Elemento associado à resposta ao etileno	(PUGA-FREITAS; BLOUIN, 2015)
SEF4 BScons	SEF4	Elemento associado à mobilização de reservas da semente	(FUJIWARA; BEACHY, 1994)
G-box	GBF	Elemento associado à capacidade de resposta à luz	(MENKENS; SCHINDLER; CASHMORE, 1995)
GCN4_motif	RISBZ1	Elemento associado à expressão do endosperma (armazenamento de proteínas)	(YAMAMOTO et al., 2006)
Motif g	Fator nuclear específico do epicótilo (ESNF)	Elicitor	(KATO et al., 1995)
MRE	PcMYB1	Sítio de ligação de MYB associado à resposta à luz	(FELDBRÜGGE et al., 1997)

(Tabela 8) conclusão

Promotor	Fator de transcrição	Função atribuída	Referência
MBS	MYB	Sítio de ligação de MYB envolvido na indutibilidade à seca	(CHEN et al., 2002)
OBP1 BS	OBP1	Elemento associado a resposta à auxina e ao ácido salicílico	(KANG; SINGH, 2000)
ocs-element	OCSTF	Elemento associado ao controle de choque térmico em soja	(ELLIS et al., 1993)
OBF5 BS	OBF5	Elemento associado à resposta a auxinas e ácido salicílico	(ZHANG et al., 1999)
Skn-1_motif	Desconhecido.	Elemento associado à expressão no endosperma	(BLACKWELL et al., 1994)
Sp1	Desconhecido.	Elemento associado à resposta à luz	(XU et al., 2013)
TGACG-motif	TGA1	Elemento associado à resposta ao MeJA e ao ácido salicílico	(KIM; KIM; AN, 1993)
O2-site	Opaque	Elemento associado ao armazenamento em sementes	(MOREAU et al., 2004)
P-box	Opaque2	Elemento associado à expressão de genes de armazenamento em semente	(VICENTE-CARBAJOSA et al., 1997)
RAV1a	RAV1	Elemento associado à resposta à seca e salinidade	(FU et al., 2014)
RY	ABI3	Elemento associado à regulação específica de semente e da cascata de sinalização por ABA	(FENG et al., 2014)
S-box	ABI4	Elemento associado à resposta ao ácido abscísico (ABA)	(ACEVEDO-HERNÁNDEZ; LEÓN; HERRERA-ESTRELLA, 2005)
TGA-element	TGA1	Elemento associado à resposta a auxina	(KESARWANI; YOO; DONG, 2007)
W box	WRKY41	Elemento associado à resposta a elicitores fúngicos e dormência em sementes	(DING et al., 2014)

Os possíveis elementos de ligação de fatores de transcrição identificados na região promotora dos genes caracterizados como defensinas estão representados na **Figura 16**, e das LTPs estão representados na **Figura 17**. Em apenas três defensinas (scaffold28204|size489 - Grupo 1, scaffold520753|size324 - Grupo 2 e scaffold88512|size2077 - Grupo 3) foi possível identificar a região promotora (**Figura**

16), e em seis LTPs (LTP1.I.1, LTP2.I.2, LTP5.I.5, LTP6.V, LTP7.V e LTP8.VI) (Figura 17). Nos demais *scaffolds* a região promotora não foi identificada.

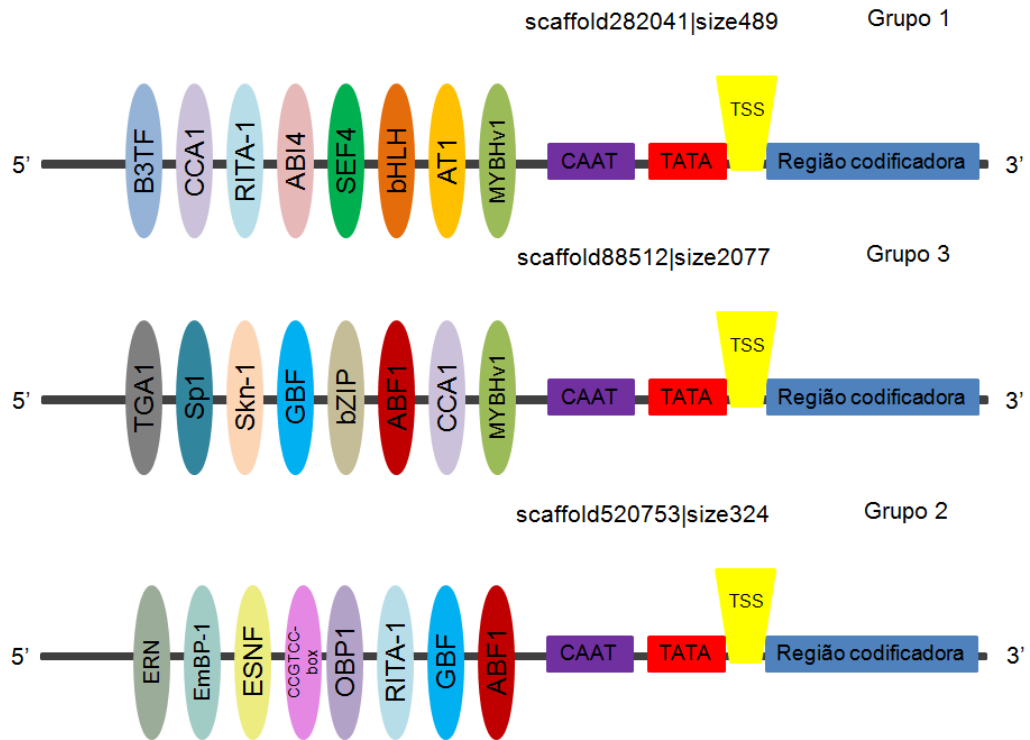


Figura 16: Representação esquemática da região promotora de genes de defensinas sobrepostos com os fatores de transcrição que reconhecem regiões específicas da região promotora. CAAT = Sinaliza o local de ligação para o fator de transcrição de RNA; TATA = Sítio de ligação da enzima RNA polimerase II; TSS = Sítio de início da transcrição.

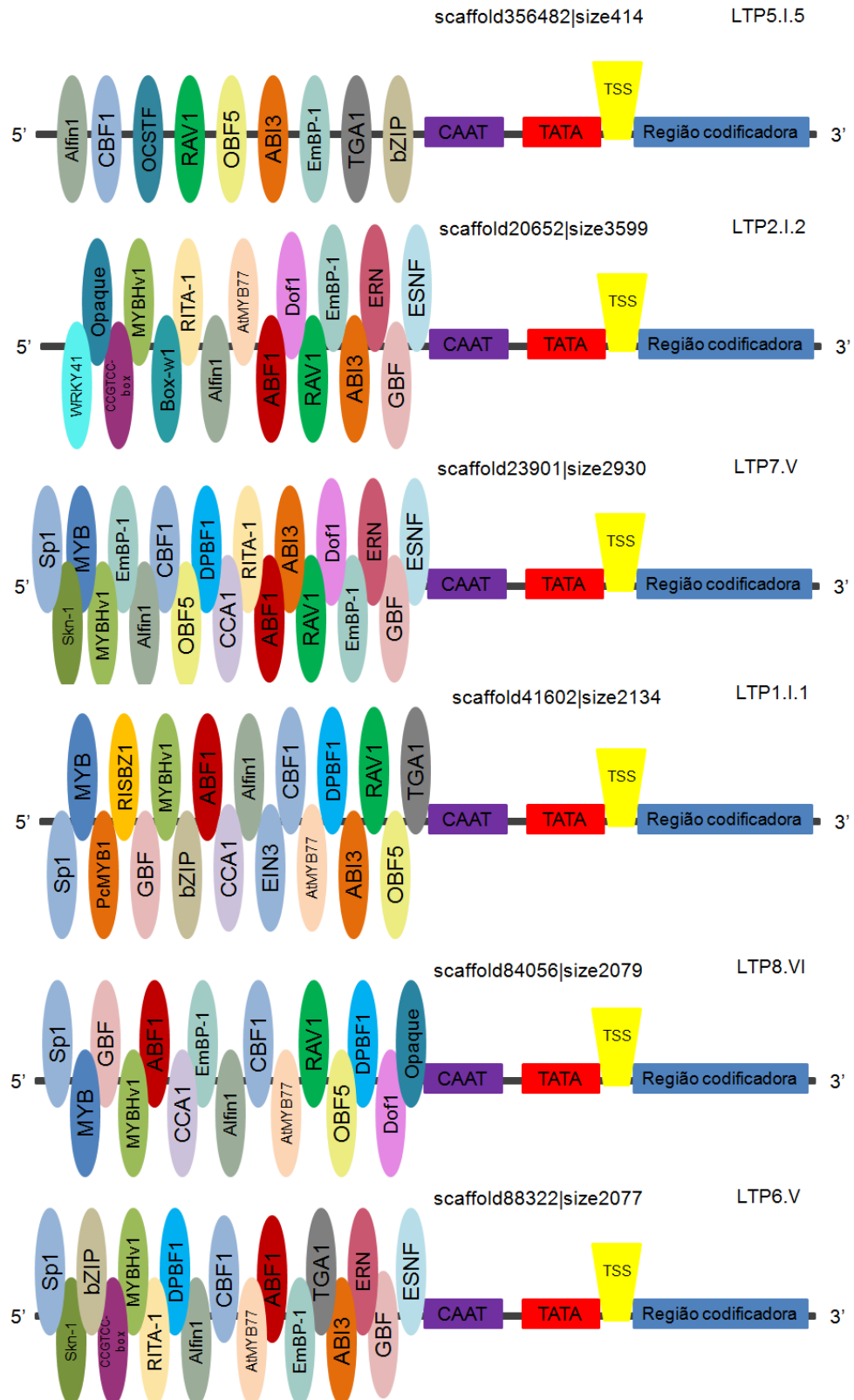


Figura 17: Representação esquemática da região promotora de genes de LTPs sobrepostos com os fatores de transcrição que reconhecem regiões específicas da região promotora. CAAT = Sinaliza o local de ligação para o fator de transcrição de RNA; TATA = Sítio de ligação da enzima RNA polimerase II; TSS = Sítio de início da transcrição.

4.7. Modelagem tridimensional de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar

Primeiramente, as sequências de aminoácidos preditas a partir dos *scaffolds* identificados como genes de defensinas foram alinhadas com suas proteínas de referência, usando somente as sequências dos peptídeos maduros, desconsiderando os peptídeos sinais. O alinhamento revelou que os peptídeos maduros preditos estão completos, à exceção da SODEF 17 (scaffold323100|size443) (**Tabela 9**).

Tabela 9: Comparação entre as defensinas preditas a partir dos *scaffolds* e aquelas usadas como referência. Porcentagem de cobertura calculada com MUSCLE (foram usados somente os peptídeos maduros, desconsiderando os peptídeos sinais).

Grupo	Referência	Proteína predita (a partir do <i>scaffold</i>)	% de cobertura
1	SODEF 1-4	scaffold282041 size489	100
	SODEF 5	scaffold57294 size2091	100
2	SODEF 6	scaffold520753 size324	100
3	SODEF 8	scaffold88512 size2077	100
4	SODEF 14	scaffold2513 size5793	100
5	SODEF 17	scaffold323100 size443	90

O Grupo 5 (scaffold323100|size443) foi escolhido para comparação entre as espécies selvagens e os diferentes cultivares, pois foram identificados transcritos que codificam para peptídeos maduros completos em todos os genótipos de cana-de-açúcar. As proteínas preditas a partir do *scaffold* e de um transcrito identificado para cada cultivar foram alinhadas com a respectiva SODEF, e verificamos uma pequena variação entre os resíduos (**Figura 18A**), revelando uma alta conservação das estruturas primárias de uma mesma defensina quando comparada entre os cultivares e as espécies selvagens.

As sequências peptídicas foram modeladas e demonstraram possuir a estrutura terciária conservada típica das defensinas, constituída de uma α -hélice e três fitas- β antiparalelas (**Figura 18B**). Diagramas de Ramachandran foram gerados a partir dos modelos obtidos (**Apêndice C**). A maioria apresentou mais de 75% dos resíduos em regiões muito favoráveis, e menos de 3% deles (1 ou 2 deles) em

regiões não-permitidas, consistindo em bons modelos (HOLLINGSWORTH; ANDREW, 2010).

As defensinas de *S. spontaneum*, *S. officinarum* e SP70-1143 (aqui denominada scaffold_443) foram selecionadas por apresentarem maiores divergências entre suas estruturas primárias, uma vez que as defensinas dos cultivares RB867515 e RB72454 se mostraram 100% idênticas. Essas defensinas tiveram suas estruturas terciárias sobrepostas no programa Chimera (**Figura 18C**). A sobreposição das estruturas revelou diferenças apenas na região N-terminal das defensinas, com SP70-1143 divergindo das espécies selvagens. Observando o alinhamento da **Figura 18A**, percebemos que SP70-1143, possui alguns aminoácidos diferentes das demais. No entanto, esses aminoácidos não parecem interferir na estrutura tridimensional da defensina de SP70-1143.

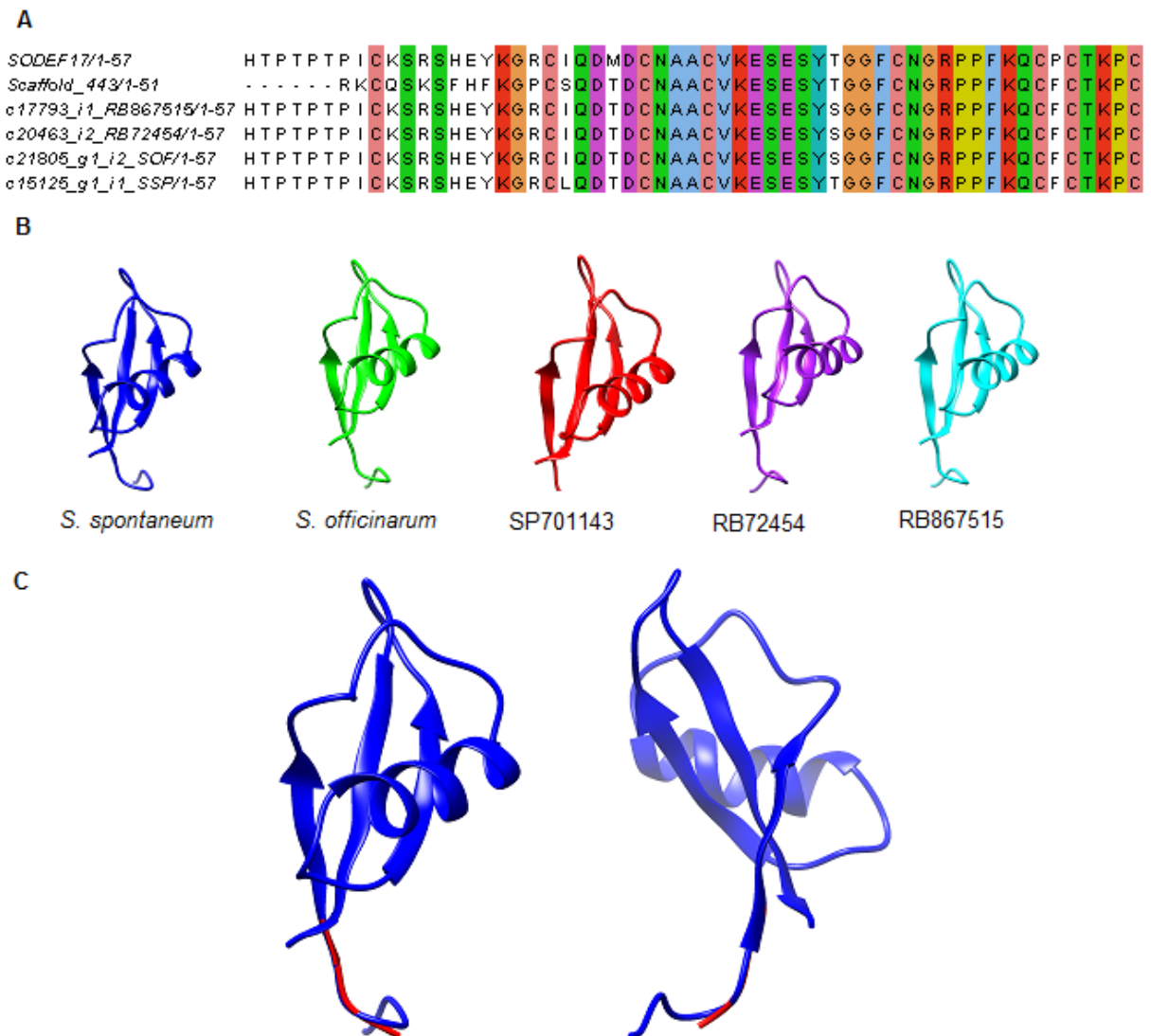


Figura 18: Comparação entre defensinas de diferentes cultivares de cana-de-açúcar (SP70-1143, RB867515 e RB72454) e as espécies selvagens (*Saccharum spontaneum* e *Saccharum officinarum*). **(A)** Alinhamento para comparação da sequência primária das defensinas. **(B)** Modelos tridimensionais das defensinas identificadas mostrando a conservação das estruturas terciárias típicas destas proteínas. **(C)** Estruturas tridimensionais de três defensinas selecionadas (*S. spontaneum*, *S. officinarum* e SP70-1143) sobrepostas por meio do programa Chimera.

As sequências de aminoácidos preditas a partir dos *scaffolds* identificados como genes de LTPs foram alinhadas com suas proteínas de referência. O alinhamento revelou que os peptídeos maduros preditos estão parcialmente completos, com uma cobertura maior que 87% (**Tabela 10**). A tabela também mostra a classificação de cada LTP de acordo com Boutrot et al. (2008) e a identificação de

LTPs de cana-de-açúcar em três grupos (I, V e VI). No alinhamento foram utilizados apenas os peptídeos maduros.

Tabela 10: Comparação entre as LTPs preditas a partir dos *scaffolds* e aquelas usadas como referência. Porcentagem de cobertura referente à quantidade de aminoácidos preditos em relação à proteína de referência usando MUSCLE (foram usados somente os peptídeos maduros, desconsiderando os peptídeos sinais). Classificação segundo Boutrot et al. (2008) com base em resíduos conservados e número de resíduos entre as cisteínas conservadas.

Referência	Proteína predita	% de cobertura	Classificação Boutrot et al., 2008
Sobic.008G030900.2.p	LTP1.I.1	93	I
Sobic.008G031000.1.p	LTP2.I.1	100	I
Sobic.003G338700.1.p	LTP3.I.2	100	I
Sobic.007G029800.1.p	LTP4.I.4	96	I
Sobic.003G016000.1.p	LTP5.I.5	92	I
Sobic.006G074200.1.p	LTP6.V	96	V
Sobic.006G074300.1.p	LTP7.V	91	V
Sobic.008G064000.2.p	LTP8.VI	87	VI
Sobic.003G326200.1.p	LTP9.VI	98	VI

Para comparação entre LTPs de genótipos de cana-de-açúcar, foi escolhida a LTP1.I.1, que teve transcritos identificados em três cultivares e na espécie selvagem *S. spontaneum*. Não foi identificado transcrito de LTP no transcriptoma da espécie selvagem *S. officinarum*, o que inviabilizou a modelagem de LTP desta espécie para comparação.

O alinhamento entre as LTPs selecionadas para comparação revelou variação de aminoácidos na estrutura primária das LTPs (**Figura 19A**), à exceção das cisteínas que constituem seu elemento estrutural característico. As proteínas foram modeladas, e demonstraram possuir a estrutura terciária característica das LTPs (**Figura 19B**). Diagramas de Ramachandran foram gerados a partir dos modelos obtidos, e a maioria apresentou 90% dos aminoácidos em regiões favoráveis e a quantidade máxima de 1,6% dos resíduos (1 deles) em regiões não permitidas, constituindo, portanto, excelentes modelos (HOLLINGSWORTH; ANDREW, 2010) (**Apêndice C**).

Por possuírem estruturas primárias mais divergentes, as estruturas das LTPs de *S. spontaneum*, RB72454 e SP70-1143 (scaffold41602_LTP1.I.1) tiveram suas estruturas terciárias sobrepostas (**Figura 19C**). A sobreposição das estruturas

revelou uma conservação geral entre os três peptídeos, com diferenças em regiões de *loop*.

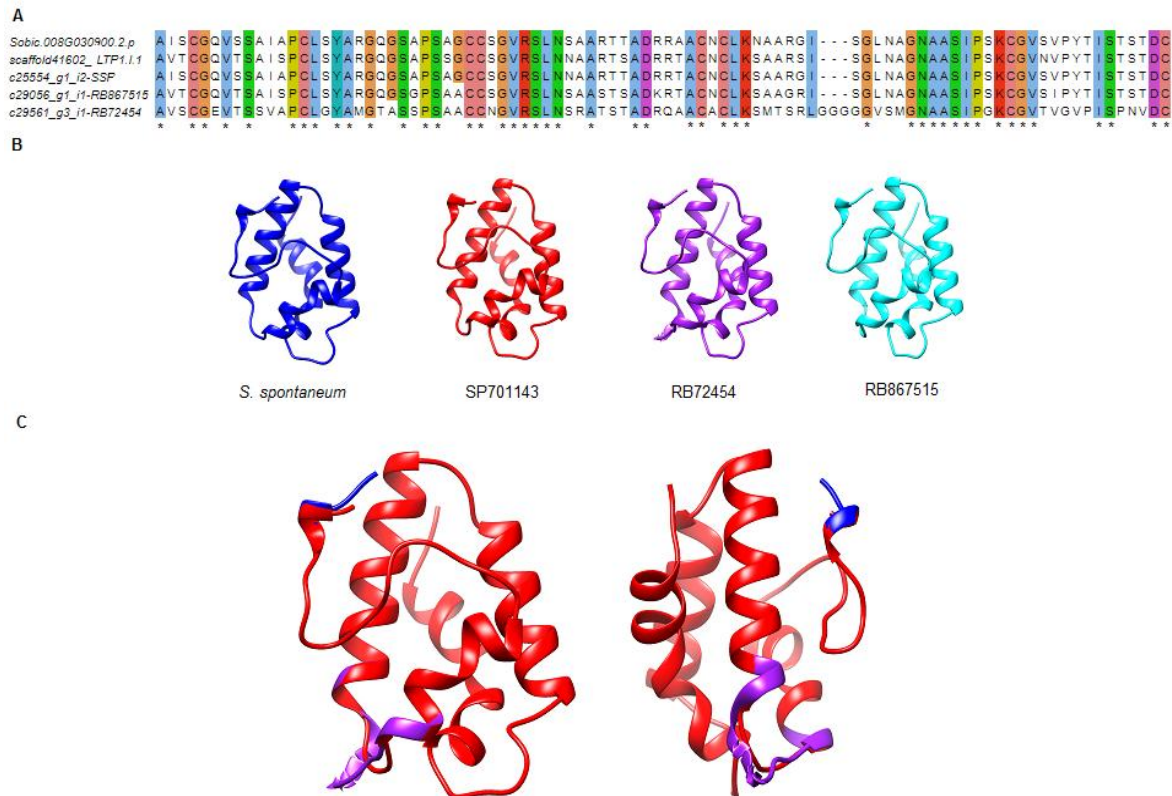


Figura 19: Comparação entre LTPs de diferentes cultivares de cana-de-açúcar (SP701143, RB867515 e RB72454) e as espécies selvagens (*Saccharum spontaneum* e *Saccharum officinarum*). **(A)** Alinhamento para comparação da sequência primária das LTPs. **(B)** Estruturas tridimensionais de quatro LTPs identificadas mostrando a conservação das estruturas terciárias típicas destas proteínas. **(C)** Estruturas tridimensionais das três LTPs selecionadas (espécie selvagem *S. spontaneum* e de dois cultivares (SP70-1143 e RB72454) sobrepostas por meio do programa Chimera.

4.8. Identificação de peptídeos de defensinas e LTPs em folhas de cana-de-açúcar

Após a caracterização *in silico* das defensinas e LTPs de cana-de-açúcar, verificamos a presença desses peptídeos em folhas de cana-de-açúcar cultivada em condições controle. Uma grande gama de patógenos que infectam cana-de-açúcar tem como tecido-alvo as folhas. Assim, a acumulação constitutiva de defensinas e

LTPs em folhas pode, talvez, contribuir com a resistência de cultivares de cana-de-açúcar a alguns patógenos.

Primeiramente, foram testados três protocolos de extração de proteínas: extração alcoólica (CLAESON et al., 1998); extração em tampão fosfato (AGIZZIO et al., 2003) e extração ácida (EGOROV et al., 2005). Para a extração foram utilizadas folhas do cultivar SP70-1143 previamente maceradas em nitrogênio líquido. A dosagem protéica dos extratos, realizada pelo método BCA (dados não mostrados), confirmou a presença de proteínas, atestando a eficiência da extração. O perfil eletroforético dos extratos obtidos pelos três protocolos permitiu identificar bandas de massa molecular compatível com os peptídeos antimicrobianos entre 6-10 kDa, somente no processo de extração ácida (**Figura 20A**).

Como a extração ácida se mostrou mais adequada, ela foi empregada para extração de proteínas de folhas das duas espécies selvagens (*S. spontaneum* e *S. officinarum*) e dos três cultivares (SP70-1143, RB867515 e RB72454) selecionados para este estudo. Os perfis eletroforéticos destas extrações mostraram bandas com massa molecular compatíveis com as de defensinas e LTPs (entre 6-10 kDa) somente nas extrações do cultivar RB72454 e de *S. spontaneum* (**Figura 20B**).

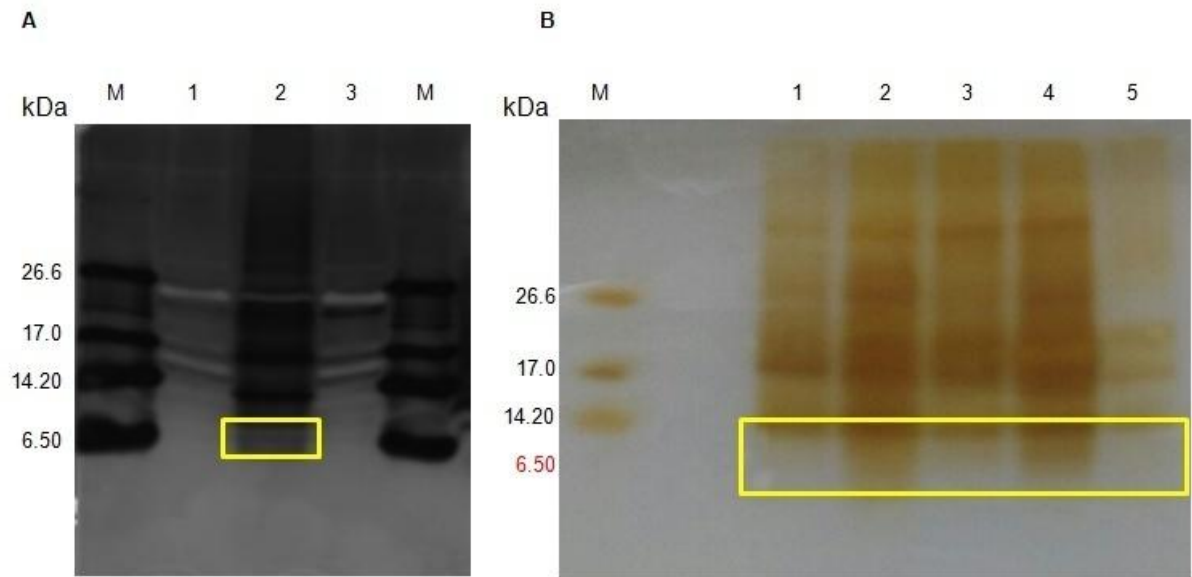


Figura 20: Perfil eletroforético em gel unidimensional SDS-Tricina-PAGE dos extratos de folha de cana-de-açúcar. Bandas com massa molecular compatível com defensinas e LTPs marcadas por um retângulo amarelo. Coloração do gel por precipitação de nitrato de prata. **(A)** Perfil eletroforético dos extratos alcoólico, tampão ácido e tampão fosfato de folhas de *Saccharum* spp. Marcador de baixa massa molecular (kDa). 1- Extração alcoólica (CLAESON et al., 1998); 2 - Extração ácida (EGOROV et al., 2005); 3 - Extração em tampão fosfato (AGIZZIO et al., 2003). **(B)** Perfil eletroforético dos extratos tampão ácido de diferentes cultivares de cana-de-açúcar. 1 - RB867515; 2 - RB72454; 3 - *S. officinarum*; 4 - *S. spontaneum*; 5 - SP701143.

5. DISCUSSÃO

Desde o início dos anos 90 diversos AMPs ricos em cisteína têm sido identificados e caracterizados nas mais diferentes espécies de plantas, e esse número só aumenta. No caso específico dos AMPs, o pequeno tamanho e suas sequências primárias divergentes, dificultavam a identificação de novos grupos e famílias, sendo estes peptídeos subestimados nas anotações de genomas (SILVERSTEIN et al., 2007). Contudo, com a identificação e caracterização de um número cada vez maior de AMPs foi possível determinar suas assinaturas (DIAS; FRANCO, 2015; YOUNT; YEAMAN, 2004), facilitando o trabalho de pesquisadores e possibilitando, enfim, categorizar os novos peptídeos descobertos em genomas e transcriptomas provenientes de diversas espécies (GRABOWSKI et al., 2007). Com o desenrolar da Era Genômica, o avanço das técnicas de Bioinformática nos permitem descobrir um pouco mais sobre os genes e proteínas (o que inclui a estrutura terciária e possíveis mecanismos de ação), principalmente daqueles que apresentam maiores dificuldades de anotação (SCHWEDE et al., 2000).

Defensinas são AMPs encontrados nos mais diferentes seres vivos, pertencentes ao grupo das mais antigas moléculas de defesa não-específica (NAWROT et al., 2014). Diversos ensaios comprovam que elas são importantes componentes da defesa de plantas (SELITRENNIKOFF, 2001), além de exercerem muitas outras atividades biológicas (CARVALHO; GOMES, 2011). LTPs têm demonstrado as mais variadas atividades biológicas *in vitro*, inclusive atividade antimicrobiana (SALMINEN; BLOMQVIST; EDQVIST, 2016). Defensinas e LTPs podem constituir, portanto, moléculas-chave no entendimento de uma parte do intrincado sistema de defesa vegetal.

Neste exato momento plantas e microorganismos travam uma batalha silenciosa, uma verdadeira corrida armamentista em zigue-zague (JONES; DANGL, 2006), onde arsenais bioquímicos de ataque e de defesa tentam se sobrepujar. Não é preciso viajar para uma “galáxia muito, muito distante”, para acompanhar esta história, pois ela está acontecendo agora mesmo, bem diante dos nossos olhos. Mas, para tentar entendê-la, talvez seja preciso lembrar de que nós também lutamos essa guerra.

O presente trabalho buscou caracterizar, *in silico*, defensinas e LTPs no genoma e em transcriptomas de cana-de-açúcar, assim como suas relações

filogenéticas com defensinas e LTPs de outras espécies de monocotiledôneas e eudicotiledôneas; estudar os padrões de expressão dos peptídeos caracterizados em bibliotecas de transcriptoma e, também, testar protocolos de extração de proteínas que permitissem obter AMPs de cana-de-açúcar.

Iniciamos o trabalho com a seleção das sequências protéicas a serem empregadas para identificação de genes de defensinas e LTPs em cana-de-açúcar. Sequências peptídicas de defensinas identificadas em bibliotecas de ESTs por De-Paula et al. (2008) e Belarmino et al. (2010) foram avaliadas quanto à sua similaridade (**Tabela 2**). Inicialmente, foram selecionadas 14 defensinas de cana-de-açúcar, devido à correspondência entre as sequências identificadas por De-Paula et al. (2008) e Belarmino et al. (2010). Destas, quatro sequências (Sd1, Sd3, Sd5 e Sd6) foram anotadas por De-Paula et al. (2008) como defensinas, após clonagem, expressão em sistema heterólogo e purificação. Testes antifúngicos foram realizados com Sd1, Sd3 e Sd5, revelando atividade antimicrobiana. Como Sd6 mostrou ser 100% homóloga à defensina γ 2-z, de *Zea mays*, já bem caracterizada por outros grupos, isso reforça sua identidade de defensina. Sd2 revelou ser 95% idêntica a uma defensina de *Z. mays* já caracterizada, também foi considerada uma defensina de cana-de-açúcar. Sd4, por outro lado, permanece anotada como uma defensina hipotética.

As 14 defensinas identificadas em cana-de-açúcar mostraram a presença dos elementos estruturais característicos destes peptídeos (**Figura 8A**), dentre eles: o elemento estrutural γ -core, comum a muitos AMPs, como descrito por Yount & Yeman (2004). Além das 8 cisteínas, também é possível identificar uma serina, uma glicina e um ácido glutâmico conservados em posições características de defensinas, como descrito por Broekaert et al. (1995). A divergência das sequências primárias (tanto dos peptídeos maduros quanto das sequências sinais) parece não influenciar a estrutura terciária de defensinas. Como apenas um pequeno número de aminoácidos é essencial para a atividade antimicrobiana, presume-se que as defensinas sejam altamente tolerantes a mutações, o que constitui uma estratégia para combater a resistência dos patógenos (DE-PAULA et al., 2008).

Para LTPs, o artigo de Wang et al. (2012) foi utilizado para selecionar 16 sequências de sorgo que serviram como referência para anotação deste grupo de moléculas em cana-de-açúcar. De acordo com Jannoo et al. (2007), cana-de-açúcar

e sorgo divergiram há 8-9 milhões de anos, sendo que milho e sorgo divergiram há 20 milhões de anos, e o arroz divergiu do último antepassado comum dos Andropogonae entre 50 e 70 milhões de anos atrás. Logo, sorgo foi escolhido por ser a espécie mais próxima filogeneticamente da cana-de-açúcar e que possui genoma completamente sequenciado.

A identificação de defensinas nas sequências genômicas de cana-de-açúcar (GRATIVOL et al., 2014) mostrou seis *scaffolds* como potenciais genes de defensinas (**Tabela 4**). Como a quantidade de possíveis genes de defensina identificados em cana-de-açúcar (seis) é bem menor do que o número de defensinas relatadas na literatura (14), o *splicing* alternativo de transcritos oriundos do mesmo gene poderia explicar a diversidade de peptídeos observada. A análise filogenética das 14 defensinas selecionadas para este trabalho (**Figura 9**) reforça a nossa hipótese de que grupos de peptídeos tiveram origem a partir dos mesmos genes, sofrendo posterior *splicing*.

A SODEF 17 de Belarmino et al. (2010) corresponde à Sd5 identificada por De-Paula et al. (2008) e, curiosamente, forma um grupo à parte na filogenia. Segundo De-Paula et al. (2008), Sd5, por apresentar alta homologia apenas com uma defensina de dentro da tribo Andropogonae (74% idêntica a uma proteína de *Zea mays*) e nenhuma defensina fora, pode representar um ganho recente de função nessa tribo. A menor semelhança entre as defensinas de De-Paula et al. (2008) é de 27% (Sd5 e Sd3) e a maior é de 61% (Sd1 e Sd3).

Com relação às LTPs, inicialmente foram identificados 14 *scaffolds* como possíveis genes de LTPs. A análise mais acurada da estrutura dos peptídeos preditos a partir dos *scaffolds*, resultou em 9 possíveis genes de LTPs (tipos I, V e VI) com estrutura característica de LTPs em cana-de-açúcar (**Tabela 5**).

Os transcritos de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar foram identificados em transcriptomas e contabilizados em cada genótipo (**Figura 10**). Apesar dos transcriptomas dos cultivares RB867515 e RB72454 e, das espécies selvagens *S. officinarum* e *S. spontaneum*, terem sido construídos a partir de folhas jovens de plantas cultivadas em condições controle, conseguimos identificar transcritos expressos nesse tecido de forma constitutiva. O transcriptoma de referência TR7 possui uma grande gama de bibliotecas de RNA-seq em sua montagem, incluindo aquelas de plantas de cana-de-açúcar submetidas a bactérias benéficas e

patogênicas (SANTA-BRÍGIDA et al., 2016). Esse fato pode explicar o grande número de transcritos de defensinas e LTPs identificados neste cultivar.

A separação entre as defensinas de monocotiledôneas e as de eudicotiledôneas observada na árvore filogenética (**Figura 12**) é condizente com o estudo de De-Paula et al. (2008), que aponta para uma possível conservação evolutiva entre as defensinas da família Poaceae, o que as torna mais semelhantes dentro desta família do que com outras famílias de plantas. Shahzad et al. (2013), estudando defensinas PDF1 de *A. thaliana*, *A. hallerie* e *A. lyrata*, demonstraram haver uma conservação entre estas defensinas dentro da família Brassicaceae. As LTPs, por outro lado, parecem exibir um perfil diferente das defensinas, não se agrupando claramente em clados distintos de monocotiledôneas e eudicotiledôneas (**Figura 14**). Isso é justificado diante do fato das LTPs serem proteínas de uma família multigênica, com diversas funções aparentemente oriundas de um evento de duplicação (FINKINA et al., 2016). Jang et al. (2008), estudando LTPs de arroz, sugeriram que estas sofreram uma rápida evolução, com eventos de duplicação independente seguidos de ganho de função, o que pode ajudar a entender porque são tão divergentes em suas estruturas primárias. Em LTPs de *Triticum aestivum*, por exemplo, genes de LTPs parecem ter surgido a partir de eventos de poliploidização seguidos de diversificação de funções (JANG et al., 2008).

Até a conclusão deste trabalho, apenas quatro artigos que fazem referência a LTPs em cana-de-açúcar haviam sido publicados: Rodrigues et al. (2011), Oloriz et al. (2012), Chen et al. (2016) e o artigo de revisão de Souza et al. (2017). Chen et al. (2016) testaram as respostas de uma nsLTP (GenBank: KR259657.1) em cana-de-açúcar submetida a diferentes tipos de estresse abiótico (estresse hídrico, frio e salinidade) e dois hormônios (MeJA e SA). A proteína predita de Chen et al. (2016) foi alinhada com as LTPs por nós identificadas, e não apresentou homologia significativa com nenhuma delas, assim como com nenhuma LTP de sorgo utilizada como referência no nosso estudo, tratando-se, portanto de uma LTP diferente. Esta sequência foi incluída em nossa análise filogenética com a denominação de Sof. Oloriz et al. (2012) estudaram a expressão de vários genes de cana-de-açúcar em resposta à infecção pelo fungo *Puccinia melanocephala*, dentre eles um classificado como nsLTP (NCBI: XM_002442731.2). A sequência peptídica desta LTP foi alinhada contra as LTPs de sorgo usadas por nós como referência e apresentou

99% de identidade com a Sobic.008G030900.2.p, e aproximadamente 87% de identidade com LTP1.I.1, por nós identificada. Rodrigues et al. (2011) estudaram a expressão diferencial de genes em cana-de-açúcar submetida a estresse hídrico, entre eles a expressão de uma LTP (GenBank: CA119309.1). A proteína predita foi alinhada contra as LTPs de sorgo e apresentou 61% de identidade com a Sobic.008G030900.2.p e 48% de identidade com a LTP1.I.1. Esta sequência não foi incluída em nossa análise filogenética devido a baixa homologia com a LTP1.I.1.

Na análise de expressão de transcritos de defensinas e LTPs em bibliotecas de transcriptoma de cana-de-açúcar submetida à infecção pela bactéria *Acidovorax avenae*, causadora de doença estria vermelha nas folhas de cana-de-açúcar (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011), observamos que as defensinas (Grupos 1 e 2) foram pouco expressas. Esses resultados são consistentes com o trabalho de De-Paula et al. (2008) que demonstraram a atividade antifúngica das defensinas Sd1 e Sd3 (Grupo 1) e Sd5 (Grupo 5), porém uma ausência de atividade antibacteriana das mesmas (tanto para as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila* e *Bacillus megaterium* quanto para a Gram-negativa *Escherichia coli*). Como estes grupos de defensinas não exibem atividade antibacteriana, seria esperado um perfil de baixa expressão. Diferente disso temos, por exemplo, a defensina Cp-thionin II estudada por Franco et al. (2006) que demonstrou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente). O Grupo 3, por outro lado, apresentou um aumento de expressão em comparação com o controle. A defensina Sd2 de De-Paula et al. (2008) se encontra neste grupo, e não foi por eles testada quanto à atividade antimicrobiana porque sua subclonagem falhou. Nossos resultados sugerem que esse grupo parece responder à infecção por *A. avenae*.

Durante infecção por *A. avenae* todas as LTPs demonstraram um aumento de expressão em relação do controle, com exceção da LTP1.I.1, que se mostrou altamente expressa em ambas as condições. Gizatullina et al. (2013) demonstraram atividade antibacteriana *in vitro* de uma LTP de *Lens culinaris* (Lc-LTP2 de lentilha) contra *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* e *Pseudomonas syringae*, e atividade de inibição do crescimento dos fungos *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*, entre outros e Safi et al. (2015) demonstraram que a LTP de *Triticum aestivum* (TdLTP de trigo) é capaz de promover maior tolerância a estresse

abiótico e também biótico (representado pelos fungos *Botrytis cinerea* e *Alternaria solani*) quando expressa em *Arabidopsis thaliana*. Esses e outros estudos mostram que é possível associar a atividade de LTPs ao combate de patógenos. Nossos resultados sugerem, portanto, que LTPs de cana-de-açúcar também podem estar associadas ao combate a patógenos.

Nos ensaios de cana-de-açúcar submetida ao déficit hídrico e inoculada com *G. diazotrophicus*, a expressão de defensinas dos Grupos 4 e 5 aumentou somente quando as plantas foram submetidas ao tratamento combinado de déficit hídrico e *G. diazotrophicus*, sugerindo que a combinação dos dois possa influenciar na expressão destas defensinas. O Grupo 1 e 2 parecem responder ao déficit hídrico, aumentando a sua expressão em raízes nessa condição. No entanto, somente o Grupo 1 parece responder à inoculação com *G. diazotrophicus* em raízes de cana-de-açúcar. De uma forma geral, a inoculação com a bactéria benéfica parece aumentar a expressão somente da defensina do Grupo 1. Este resultado corrobora a ideia de ausência de atividade antibacteriana deste grupo, uma vez que a planta deve permitir a colonização desta bactéria endofítica benéfica em suas raízes (BERTALAN et al., 2009).

Nestes mesmos ensaios, a LTP1.I.1 é altamente expressa, tanto nas plantas submetidas aos tratamentos quanto nos controles. Como verificamos anteriormente, LTP1.I.1 também se mostrou altamente expressa nas plantas-controle do experimento com *A. avenae*, o que sugere a participação desta LTP em outros processos não relacionados à patogênese, como, por exemplo, deposição de cera em superfícies. As plantas são dotadas de uma cutícula que as protege da desidratação, e sugere-se que LTPs possam atuar no transporte de monômeros de cera e cutina da membrana para a superfície celular (TAIZ; ZEIGER, 2010). Debono et al. (2009) e Kin et al. (2012), trabalhando com mutantes, demonstraram que duas LTPs altamente expressas em *Arabidopsis* AtLTPg1 (LTPG1) e AtLTPg2 (LTPG2) estavam envolvidas na deposição de cera em hastes de inflorescências. Aparentemente LTP1.I.1 pode estar envolvida na deposição de cera em cana-de-açúcar, o que poderia explicar sua alta expressão nos controles. LTP3.I.2 se mostrou altamente expressa nas plantas submetidas ao déficit hídrico, tendo menor expressão quando combinados os tratamentos de seca e *G. diazotrophicus*. LTP7.V também apresentou alta expressão nas plantas submetidas ao déficit hídrico, tanto

na ausência quanto na presença de *G. diazotrophicus*. O aumento de expressão de LTPs em plantas submetidas a estresse hídrico foi verificado por Rodrigues et al. (2011), que demonstraram que a expressão do gene de LTP de cana-de-açúcar por eles identificado aumentou durante todo o tempo em que a planta ficou submetida à seca; por Chen et al. (2016), que verificaram a expressão da ScNsLTP de cana-de-açúcar, revelando ser uma LTP mais relacionada ao estresse abiótico do que biótico, sendo muito responsiva à seca e, finalmente, por Talame et al. (2007) que, estudando estresse hídrico em cevada, verificaram um aumento de 2,5 vezes nos níveis de transcrição de duas LTPs. Como já foi discutido, o papel das LTPs durante o estresse causado pela seca pode estar associado à formação da cutícula, que tem a função de diminuir a desidratação. Lokko et al. (2007), por exemplo, relatam a prevalência de genes de LTPs em bibliotecas de mandioca submetida à desidratação, reforçando o aparente papel destas proteínas na resposta à seca.

A análise da região promotora dos genes de defensinas e LTPs identificados no genoma da cana-de-açúcar resultou na identificação de diversos promotores e seus respectivos fatores de transcrição (**Tabela 8**). Kaur et al. (2017) analisaram a região promotora de proteínas PR de *Arabidopsis* e de *Oryza sativa*, e identificaram os promotores nelas encontrados. Alguns deles estão presentes nos genes de defensinas e LTPs identificados em cana-de-açúcar, ajudando a corroborar suas identidades de proteínas PR. Dentre eles, estão: ABRE, elemento responsivo a ácido abscísico; MBS, sítio de ligação à MYB e responsivo à seca; TGACG-motif, responsivo ao MeJA e ao ácido salicílico e G-box, responsivo à luz.

O elemento responsivo a ABA (ABRE) tem afinidade por fatores de transcrição MYB e ABF, que sinalizam a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse, e foram identificados na região promotora de defensinas e LTPs de cana-de-açúcar. Segundo Seki et al. (2007), o ABA endógeno tem seus níveis aumentados em situações de déficit hídrico (SEKI et al., 2007) e, considerando que a expressão de certos hormônios é regulada por ABA, este exerce importante função em situações de estresse (RABBANI et al., 2003). A região promotora de duas das defensinas (Grupos 2 e 3) e de cinco das LTPs (LTP1.I.1, LTP2.I.2, LTP6.V, LTP7.V e LTP8.VI) analisadas possui sítio de ligação para elementos ABF, sugerindo que defensinas e LTPs podem estar relacionadas à resposta ao estresse em cana-de-açúcar. O fator de transcrição MYB, relacionado à resposta à seca, foi

identificado na região promotora de duas defensinas (Grupos 1 e 3) e em 5 LTPs (LTP1.I.1, LTP2.I.2, LTP6.V, LTP7.V e LTP8.VI). Em *Arabidopsis*, Cominelli et al. (2005) relataram uma proteína MYB, específica de células-guarda, envolvida na regulação dos estômatos. Em raízes de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico, observamos um aumento da expressão da defensina do Grupo 1 (**Figura 15B**), o que reforça nossa hipótese do envolvimento das defensinas e LTPs na resposta da cana-de-açúcar à seca.

Os fatores de transcrição CBF1 atuam sobre os promotores responsivos à desidratação, porém regulam a expressão em uma via independente de ABA (AGARWAL; JHA, 2010). O promotor de ligação a CBF1 foi identificado na LTP5.I.5, e o promotor de ligação a ABF1 (ABRE) foi identificado na LTP2.I.2 isoladamente. Ambos os promotores (CBF1 e ABF1) foram encontrados simultaneamente nas demais LTPs (LTP1.I.1, LTP6.V, LTP7.V e LTP8.VI), sugerindo que estas LTPs possam ser reguladas por duas vias (uma dependente e outra independente de ABA).

TGACG-motif, elemento responsivo ao MeJA e regulado pelo fator de transcrição bZIP, foi identificado em uma defensina (Grupo 3) e em três LTPs (LTP5.I.5, LTP1.I.1 e LTP6.V). O fator de transcrição OBF5, envolvido na resposta ao ácido salicílico, (SA, do inglês *salicylic acid*) foi identificado em uma defensina (Grupo 2) e em quatro LTPs (LTP1.I.1, LTP5.I.5, LTP7.V e LTP8.VI). Chen et al. (2016) relataram a responsividade da LTP de cana-de-açúcar (ScNsLTP) por eles estudada, que sofreu indução por MeJA e leve supressão por SA. Mar et al. (2003), trabalhando com a LTP FxaNsLTP de morango submetido a diferentes tipos de estresses abióticos, relataram responsividade ao ABA e ao SA. Portanto, promotores identificados nas LTPs de cana-de-açúcar parecem ser passíveis de regulação por hormônios reconhecidos como ativadores da defesa de plantas, como o MeJA e SA, reforçando seus papéis na atuação contra patógenos.

Outros promotores/fatores de transcrição identificados estão associados a diferentes papéis e regulações em cana-de-açúcar, dentre eles: Box-w1, um promotor associado à resposta a elicitores fúngicos, foi identificado em LTP2.I.2, sugerindo que essa LTP possa atuar na defesa contra fungos; SEF4, um fator de transcrição associado à mobilização de reservas em sementes foi identificado em uma defensina (Grupo 1), assim como Opaque, a quem se atribui a mesma função,

foi identificado na LTP2.I.2, sugerindo a possibilidade de expressão destas proteínas em sementes; CCA1, elemento envolvido na regulação do ritmo circadiano aparece em diferentes defensinas e LTPs; RAV1, fator de transcrição relacionado à resposta à seca e salinidade foi identificado em cinco LTPs (LTP1.I.1, LTP2.I.2, LTP5.I.5, LTP7.V e LTP8.VI), reforçando nossa hipótese de envolvimento das LTPs na resposta ao estresse. ABI é um fator de transcrição específico de sementes, e foi identificado em uma defensina (Grupo 1) e em cinco LTPs (LTP1.I.1, LTP2.I.2, LTP5.I.5, LTP6.V e LTP7.V). Também foram identificados fatores de transcrição associados à regulação por auxinas, etileno, giberelinas e brassinosteróides, colocando defensinas e LTPs (especialmente estas últimas) como potenciais alvos de uma possível regulação hormonal.

Continuando com as análises, sequências peptídicas preditas a partir dos *scaffolds* de defensinas e LTPs foram alinhadas com suas respectivas proteínas de referência, desprezando os peptídeos sinais, a fim de descobrir se os peptídeos maduros preditos estavam completos (**Tabela 9**). A modelagem dos peptídeos de defensinas do Grupo 5 preditos a partir de transcritos/*scaffolds* de espécies selvagens e dos diferentes cultivares, revelou uma alta conservação das estruturas terciárias deste grupo de defensinas quando comparadas entre cultivares e espécies selvagens (**Figura 18**). A estrutura primária da defensina de SP70-1143 se mostrou muito variável em comparação com as espécies selvagens, mas essas variações parecem não ter influência sobre a estrutura tridimensional da defensina. Essas diferenças observadas podem estar relacionadas ao potencial de combate a patógenos de SP70-1143. Defensinas possuem alta tolerância quanto à alteração de aminoácidos, como demonstraram Yang et al. (2009) que, ao substituírem resíduos de cisteína da defensina VrD1 (*Vigna radiata*) observaram manutenção das estruturas secundárias, ainda que com significativas alterações nas atividades inibitórias. Esse experimento sugere certo grau de liberdade da estrutura protéica de defensinas, que assumem novas funções para sobrepujar os patógenos.

De forma similar, as LTP1.I.1 dos cultivares e de *S. spontaneum* apresentaram grande variação na sua estrutura primária, à exceção das cisteínas que constituem seu elemento estrutural característico. A modelagem dos peptídeos revelou estruturas terciárias características das LTPs e conservação na estrutura tridimensional, com diferenças em regiões de volta.

Por fim, verificamos a presença de defensinas e LTPs em folhas de cana-de-açúcar cultivadas em condições controle. O protocolo de extração ácida de proteínas foi o mais eficiente para a identificação de bandas de massas moleculares compatíveis com a massa molecular dos AMPs procurados (entre 6-10 kDa). Pereira (2015) já havia testado os três protocolos quanto à eficiência na extração de AMPs de raízes e folhas de *C. annuum* L, e concluiu que a extração ácida permitia obter bandas majoritárias entre 6 e 10 kDa, compatíveis com a massa molecular pequena dos peptídeos antimicrobianos e, portanto, mais eficiente para este fim, o que foi por nós confirmado para a extração de proteínas de folhas de cana-de-açúcar.

A extração ácida de proteínas de folhas das duas espécies selvagens (*S. spontaneum* e *S. officinarum*) e dos três cultivares (SP70-1143, RB867515 e RB72454) revelou bandas com massa molecular compatível com as de defensinas e LTPs (entre 6-10 kDa) somente no cultivar RB72454 e em *S. spontaneum* (**Figura 20B**). A ausência de bandas de baixa massa molecular nas demais extrações pode estar associada, por exemplo, às diferenças de expressão constitutiva dos AMPs entre as espécies selvagens e os cultivares. Algumas defensinas, por exemplo, não são expressas constitutivamente, ou são expressas em quantidades muito baixas, inviabilizando sua detecção (SELS et al., 2008). Como já foi demonstrado, diferentes cultivares possuem diferentes resistências a patógenos (DE SOUZA et al., 2013) e, portanto, expressam diferentes proteínas de defesa. Oloriz et al. (2012), estudando o perfil de expressão de genes em cana-de-açúcar infectada com o fungo *Puccinia melanocephala*, causador da ferrugem, demonstraram que os níveis de expressão de *Nsltp* (nsLTP de cana-de-açúcar) aumentaram gradativamente de 4-7 dias após a infecção do mutante resistente IBP8518 com o patógeno, quando em comparação com genótipo suscetível B4362. Ou seja, no mutante resistente, LTPs podem estar sendo empregadas pela planta para combate ao patógeno.

A caracterização de defensinas e LTPs contribuiu para uma maior compreensão dos papéis desempenhados por estes componentes do sistema de defesa de plantas, de forma geral, e da cana-de-açúcar, em específico, possibilitando um novo olhar sobre essas proteínas.

6. CONCLUSÕES

- As defensinas identificadas em cana-de-açúcar podem ser resultantes de *splicing* alternativo, com diferentes transcritos oriundos de um mesmo gene, uma vez que na literatura são relatadas 14 diferentes genes de defensinas e, contudo, identificamos apenas 6 genes;
- Foram identificadas 9 LTPs em cana-de-açúcar (LTP1.I.1, LTP2.1.I, LTP3.I.2, LTP4.I.4, LTP5.I.5, LTP6.V, LTP7.V, LTP8.VI e LTP9.VI), pertencentes a três diferentes classes (I, V e VI);
- O relacionamento filogenético entre defensinas de cana-de-açúcar e demais defensinas previamente caracterizadas revelou que esses AMPs se agrupam em dois clados distintos, eudicotiledôneas e monocotiledôneas. Já as LTPs não apresentaram esse perfil e parecem ser menos conservadas entre eudicotiledôneas ou monocotiledôneas;
- Os Grupos 1, 2 e 3 de defensinas exibiram aumento de expressão na cana-de-açúcar, parecendo responder à infecção por *A. avenae*. As do Grupo 1, no entanto, parecem responder menos ao patógeno e mais a inoculação por *G. diazotrophicus*. Isso parece ser condizente com o fato de que uma defensina do mesmo grupo (Sd1) não possui atividade antimicrobiana e que a planta deve permitir a colonização de suas raízes por bactérias endofíticas, como a *G. diazotrophicus*. O Grupo 1 de defensinas pode estar relacionado a uma resposta à colonização por bactérias benéficas em raízes de cana-de-açúcar.
- Os Grupos 1 e 2 de defensinas parecem responder ao estresse hídrico, pois aumentaram suas expressões em raízes submetidas a essa condição. No tratamento combinado de déficit hídrico e *G. diazotrophicus*, os Grupos 4 e 5 de defensinas apresentaram aumento de expressão, sugerindo que os tratamentos combinados têm efeito sobre elas;
- As LTPs apresentaram aumento de expressão em condições de patogênese, sugerindo um papel desses peptídeos na defesa da planta. Além disso, LTPs foram mais responsivas ao déficit hídrico do que a inoculação por *G. diazotrophicus* em cana-de-açúcar;
- Promotores típicos de proteínas PR (ABRE, MBS, TGACG-motif e G-box) corroboram a identidade dos genes de defensinas e LTPs identificados em

cana-de-açúcar. Sítios de ligação a fatores de transcrição associados ao estresse (ABRE) e à seca (MYB) reforçam a hipótese de envolvimento das defensinas e LTPs identificadas em cana-de-açúcar na resposta a estresse abiótico;

- A defensina SODEF17 e a LTP1.I.1 de cana-de-açúcar apresentaram variação de aminoácidos em suas estruturas primárias entre selvagens e cultivares de cana-de-açúcar. Contudo, apesar desta divergência, também demonstraram alta conservação das estruturas terciárias;
- A metodologia de extração protéica em meio ácido se mostrou mais eficiente no processo de obtenção de extratos com proteínas de baixa massa molecular a partir de folhas de *Saccharum* spp., apresentando um perfil eletroforético onde é possível visualizar bandas de baixa massa molecular (6-10 kDa), compatíveis com defensinas e LTPs. A presença de bandas de baixa massa molecular somente no cultivar RB867515 e em *S. spontaneum* pode estar relacionada às diferentes expressões constitutivas destes peptídeos entre as espécies selvagens e os cultivares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H. T. et al. Laboratory evaluation of fungicides and plant extracts against different strains of *Colletotrichum falcatum* the cause of red rot of sugarcane. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 53, n. 01, p. 181–186, 2016.
- ABU AHMAD, Y. et al. Variation in virus populations and growth characteristics of two sugarcane cultivars naturally infected by Sugarcane yellow leaf virus in different geographical locations. **Plant pathology**, v. 56, n. 5, p. 743–754, 2007.
- ACEVEDO-HERNÁNDEZ, G. J.; LEÓN, P.; HERRERA-ESTRELLA, L. R. Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 43, n. 4, p. 506–519, 2005.
- ADAMS, K. L. Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants. **The Journal of heredity**, v. 98, n. 2, p. 136–141, 2007.
- ADAMS, K. L.; WENDEL, J. F. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 2, p. 135–141, 2005.
- AERTS, A. M. et al. Level of M(IP)2C sphingolipid affects plant defensin sensitivity, oxidative stress resistance and chronological life-span in yeast. **FEBS letters**, v. 580, n. 7, p. 1903–1907, 2006.
- AERTS, A. M. et al. The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from raphanus sativus, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 243–247, 2007.
- AERTS, A. M. et al. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 65, n. 13, p. 2069–2079, 2008.
- AERTS, A. M. et al. The Antifungal Plant Defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* Induces Apoptosis in *Candida albicans*. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 47, 2011.
- AGARWAL, P. K.; JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. **Biologia plantarum**, v. 54, n. 2, p. 201–212, 2010.
- AGIZZIO, A. P. et al. A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 416, n. 2, p. 188–195, 2003.
- AL-JANABI, S. M. et al. A genetic linkage map of *Saccharum spontaneum* L. “SES 208”. **Genetics**, v. 134, n. 4, p. 1249–1260, 1993.
- ALMEIDA, M. S. et al. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 378, n. 2, p. 278–286, 2000.
- ALTSCHUL, S. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ALZOHAIRY, A. M. BioEdit: An important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Biosciences**, v. 2, n. 1, p. 60–61, 2011.
- AMBAWAT, S. et al. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. **Physiology and molecular biology of plants: an international journal of**

functional plant biology, v. 19, n. 3, p. 307–321, 2013.

ANDRIANKAJA, A. et al. AP2-ERF Transcription Factors Mediate Nod Factor Dependent Mt ENOD11 Activation in Root Hairs via a Novel cis-Regulatory Motif. **The plant cell online**, v. 19, n. 9, p. 2866–2885, 2007.

ANDRONIS, C. et al. The clock protein CCA1 and the bZIP transcription factor HY5 physically interact to regulate gene expression in Arabidopsis. **Molecular plant**, v. 1, n. 1, p. 58–67, 2008.

AYLIFFE, M. A. Molecular Genetics of Disease Resistance in Cereals. **Annals of botany**, v. 94, n. 6, p. 765–773, 2004.

BABICKI, S. et al. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W147–53, 2016.

BELARMINO, L. C. et al. EST-database search of plant defensins - an example using sugarcane, a large and complex genome. **Current protein & peptide science**, v. 11, n. 3, p. 248–254, 2010.

BENKO-ISEPPON, A. M. et al. Overview on Plant Antimicrobial Peptides. **Current protein & peptide science**, v. 11, n. 3, p. 181–188, 2010.

BERECZ, B. et al. Structural stability and surface activity of sunflower 2S albumins and nonspecific lipid transfer protein. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 10, p. 6490–6497, 2010.

BERTALAN, M. et al. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC genomics**, v. 10, p. 450, 2009.

BIRCH, R. G.; PATIL, S. S. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 30, n. 2, p. 207–214, 1987.

BISON, O. et al. Inbreeding depression in Eucalyptus clones. **Cropps Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 459–464, 2004.

BLACKWELL, T. K. et al. Formation of a monomeric DNA binding domain by Skn-1 bZIP and homeodomain elements. **Science**, v. 266, n. 5185, p. 621–628, 1994.

BLANC, G.; WOLFE, K. H. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. **The Plant cell**, v. 16, n. 7, p. 1667–1678, 2004.

BOLLER, T.; HE, S. Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 742–744, 2009.

BONNETT, G. D. et al. Identifying the Risks of Transgene Escape from Sugarcane Crops to Related Species, with Particular Reference to *Saccharum spontaneum* in Australia. **Tropical plant biology**, v. 1, n. 1, p. 58–71, 2008.

BONTEMS, F. et al. Three-dimensional structure of natural charybdotoxin in aqueous solution by 1H-NMR. Charybdotoxin possesses a structural motif found in other scorpion toxins. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 196, n. 1, p. 19–28, 1991.

BOUTROT, F.; CHANTRET, N.; GAUTIER, M.-F. Genome-wide analysis of the rice and

- Arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining. **BMC genomics**, v. 9, p. 86, 2008.
- BOWLES, D. Defense-Related Proteins In Higher Plants. **Annual review of biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 873–907, 1990.
- BROEKAERT, W. F. et al. A Chitin-Binding Lectin from Stinging Nettle Rhizomes with Antifungal Properties. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1100–1102, 1989.
- BROEKAERT, W. F. et al. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant physiology**, v. 108, n. 4, p. 1353–1358, 1995.
- BROWN, K. L.; WHANCOCK, R. E. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current opinion in immunology**, v. 18, n. 1, p. 24–30, 2006.
- BRUIX, M. et al. Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. **Biochemistry**, v. 32, n. 2, p. 715–724, 1993.
- BUKHARI, K. A. I. M. et al. Detection of *Colletotrichum falcatum* causing red rot of sugarcane by enzyme-linked immunosorbent assay. **Archives Of Phytopathology And Plant Protection**, v. 45, n. 7, p. 823–830, 2012.
- BULET, P. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and comparative immunology**, v. 23, n. 4-5, p. 329–344, 1999.
- BULL, T. A.; GLASZIOU, K. T. The Evolutionary Significance of Sugar Accumulation in *Saccharum*. **Australian journal of biological sciences**, v. 16, n. 4, p. 737, 1963.
- CARSON, D.; BOTHA, F. Genes expressed in sugarcane maturing internodal tissue. **Plant cell reports**, v. 20, n. 11, p. 1075–1081, 2002.
- CARVALHO, A. et al. Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. **Physiologia plantarum**, v. 122, n. 3, p. 328–336, 2004.
- CARVALHO, A. DE O.; GOMES, V. M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-a concise review. **Peptides**, v. 28, n. 5, p. 1144–1153, 2007.
- CARVALHO, A. DE O.; GOMES, V. M. Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 38, p. 4270–4293, 2011.
- CHAE, K. et al. A multifaceted study of stigma/style cysteine-rich adhesin (SCA)-like Arabidopsis lipid transfer proteins (LTPs) suggests diversified roles for these LTPs in plant growth and reproduction. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 15, p. 4277–4290, 2010.
- CHAPOLA, R. G.; HOFFMANN, H. P.; MASSOLA, N. S. Reaction of sugarcane varieties to orange rust (*Puccinia kuehni*) and methods for rapid identification of resistant genotypes. **Tropical plant pathology**, v. 41, n. 3, p. 139–146, 2016.
- CHARLET, M. et al. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 36, p. 21808–21813, 1996.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. et al. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference

Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical plant biology**, v. 4, n. 1, p. 62–89, 2011.

CHENG, C.-S. et al. Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defense. **Biochemistry**, v. 43, n. 43, p. 13628–13636, 2004.

CHEN, W. et al. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. **The Plant cell**, v. 14, n. 3, p. 559–574, 2002.

CHEN, Y. et al. A Novel Non-specific Lipid Transfer Protein Gene from Sugarcane (NsLTPs), Obviously Responded to Abiotic Stresses and Signaling Molecules of SA and MeJA. **Sugar Tech**, v. 19, n. 1, p. 17–25, 2016.

CHEN, Z. J. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. **Trends in plant science**, v. 15, n. 2, p. 57, 2010.

CHOI, H. et al. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 3, p. 1723–1730, 2000.

CLAESON, P. et al. Fractionation Protocol for the Isolation of Polypeptides from Plant Biomass. **Journal of natural products**, v. 61, n. 1, p. 77–81, 1998.

COLILLA, F. J.; ROCHER, A.; MENDEZ, E. γ -Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. **FEBS letters**, v. 270, n. 1-2, p. 191–194, 1990.

COMINELLI, E. et al. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. **Current biology: CB**, v. 15, n. 13, p. 1196–1200, 2005.

Conab. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_12_19_09_49_08_cana_dezembro.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2017.

CORNET, B. et al. Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. **Structure**, v. 3, n. 5, p. 435–448, 1995.

COTTA, M. G. et al. Lipid transfer proteins in coffee: isolation of *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, expression during coffee fruit development and promoter analysis in transgenic tobacco plants. **Plant molecular biology**, v. 85, n. 1-2, p. 11–31, 2014.

CUI, L. et al. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. **Genome research**, v. 16, n. 6, p. 738–749, 2006.

DAL-BIANCO, M. et al. Sugarcane improvement: how far can we go? **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 265–270, 2012.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826–833, 2001.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. **Taxonomy and evolution**. p. 7–84. In D.J. Heinz (ed.) Sugarcane improvement through breeding. Elsevier, New York, 1987

DE BEER, A.; VIVIER, M. A. Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity. **BMC plant biology**, v. 8, p. 75, 2008.

- DEBIBAKAS, S. et al. Prospecting sugarcane resistance to Sugarcane yellow leaf virus by genome-wide association. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 127, n. 8, p. 1719–1732, 2014.
- DEBONO, A. et al. Arabidopsis LTPG Is a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Required for Export of Lipids to the Plant Surface. **The plant cell online**, v. 21, n. 4, p. 1230–1238, 2009.
- DELANEY, T. P. et al. A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. **Science**, v. 266, n. 5188, p. 1247–1250, 1994.
- DELANO, W. L. PyMOL: An Open-Source Molecular Graphics Tool. **CCP4 Newsletter On Protein Crystallography**, v. 40, p. 82–92, 2002.
- DE-PAULA, V. S. et al. Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensins. **Plant molecular biology**, v. 68, n. 4-5, p. 321–335, 2008.
- DE PAULA, V. S. et al. Portrayal of complex dynamic properties of sugarcane defensin 5 by NMR: multiple motions associated with membrane interaction. **Structure**, v. 19, n. 1, p. 26–36, 2011.
- DE SOUZA, A. P. et al. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. **Plant, cell & environment**, v. 31, n. 8, p. 1116–1127, 2008.
- DE SOUZA, J. R. et al. Genetic divergence of sugar cane cultivars for resistance to *Diatraea saccharalis*. **Semina**, v. 34, n. 6Supl1, p. 3367–3376, 2013.
- DEWANTI, P. et al. Elimination of SCMV (Sugarcane Mozaik Virus) and Rapid Propagation of Virus-free Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Using Somatic Embryogenesis. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 96–102, 2016.
- D'HONT, A. et al. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular & general genetics: MGG**, v. 250, n. 4, p. 405–413, 1996.
- D'HONT, A. et al. Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. **Genome / National Research Council Canada**, v. 41, n. 2, p. 221–225, 1998.
- D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and genome research**, v. 109, n. 1-3, p. 27–33, 2005.
- DIAS, R. DE O.; FRANCO, O. L. Cysteine-stabilized $\alpha\beta$ defensins: From a common fold to antibacterial activity. **Peptides**, v. 72, p. 64–72, 2015.
- DILLON, S. L. et al. Domestication to crop improvement: genetic resources for Sorghum and *Saccharum* (Andropogoneae). **Annals of botany**, v. 100, n. 5, p. 975–989, 2007.
- DINARDO-MIRANDA, L. L. Hospedabilidade de oito variedades de cana-de-açúcar a *Pratylenchus brachyurus* e *P. zeae*. **Nematologia brasileira**, v. 18, 1994.
- DING, Z. J. et al. WRKY41 controls Arabidopsis seed dormancy via direct regulation of ABI3 transcript levels not downstream of ABA. **The Plant journal: for cell and molecular**

biology, v. 79, n. 5, p. 810–823, 2014.

DIZ, M. S. et al. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel α -amylase inhibitory properties. **Physiologia plantarum**, v. 142, n. 3, p. 233–246, 2011.

DUCKERT, P.; BRUNAK, S.; BLOM, N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. **Protein engineering, design & selection: PEDS**, v. 17, n. 1, p. 107–112, 2004.

DUFFORT, O. A. et al. Immunoassay to quantify the major peach allergen Pru p 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 26, p. 7738–7741, 2002.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

EDMÉ, S. J. et al. Genetic Contribution to Yield Gains in the Florida Sugarcane Industry across 33 Years. **Crop science**, v. 45, n. 1, p. 92, 2005.

EDSTAM, M. M. et al. Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins. **Molecular plant**, v. 4, n. 6, p. 947–964, 2011.

EDSTAM, M. M. et al. Characterization of the GPI-anchored lipid transfer proteins in the moss *Physcomitrella patens*. **Plant physiology and biochemistry: PPB / Societe francaise de physiologie vegetale**, v. 75, p. 55–69, 2014.

EGGER, M. et al. The role of lipid transfer proteins in allergic diseases. **Current allergy and asthma reports**, v. 10, n. 5, p. 326–335, 2010.

EGOROV, T. A. et al. Diversity of wheat anti-microbial peptides. **Peptides**, v. 26, n. 11, p. 2064–2073, 2005.

EHRET-SABATIER, L. et al. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 47, p. 29537–29544, 1996.

ELLIS, J.; DODDS, P.; PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Current opinion in plant biology**, v. 3, n. 4, p. 278–284, 2000.

ELLIS, J. G. et al. Does the ocs-element occur as a functional component of the promoters of plant genes? **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 4, n. 3, p. 433–443, 1993.

EMBRAPA.

Disponível

em:

<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/VarietadesRB_2008+apostila_000fxga3a3302wyiv80soht9hctswek2.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2018.

EVTUSHENKO, L. I. et al. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of “*Corynebacterium aquaticum*” Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 50 Pt 1, p. 371–380, 2000.

FALLOON, T. et al. First Report of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, Causal Agent of Ratoon Stunting of Sugarcane, in Jamaica. **Plant disease**, v. 90, n. 2, p. 245–245, 2006.

FELDBRÜGGE, M. et al. PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promoter unit. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 11, n. 5, p. 1079–1093, 1997.

FELIX, G. et al. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 18, n. 3, p. 265–276, 1999.

FENG, C.-Z. et al. Arabidopsis RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of ABI3, ABI4, and ABI5 during seed germination and early seedling development. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 80, n. 4, p. 654–668, 2014.

FERREIRA, F. M. et al. Effects of inbreeding on the selection of sugar cane clones. **Cropp Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 174–182, 2005.

FERREIRA, S. S. et al. Co-expression network analysis reveals transcription factors associated to cell wall biosynthesis in sugarcane. **Plant molecular biology**, v. 91, n. 1-2, p. 15–35, 2016.

FINKINA, E. I. et al. Lipid Transfer Proteins As Components of the Plant Innate Immune System: Structure, Functions, and Applications. **Acta naturae**, v. 8, n. 2, p. 47–61, 2016.

FLOR, H. H. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. **Annual review of phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 275–296, 1971.

FOWLER, S. G. Low Temperature Induction of Arabidopsis CBF1, 2, and 3 Is Gated by the Circadian Clock. **Plant physiology**, v. 137, n. 3, p. 961–968, 2005.

FRANCO, O. L. et al. Identification of a cowpea gamma-thionin with bactericidal activity. **The FEBS journal**, v. 273, n. 15, p. 3489–3497, 2006.

FUJIMORI, T. et al. PRR5 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5) plays antagonistic roles to CCA1 (CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1) in *Arabidopsis thaliana*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 426–430, 2005.

FUJIWARA, T.; BEACHY, R. N. Tissue-specific and temporal regulation of a beta-conglycinin gene: roles of the RY repeat and other cis-acting elements. **Plant molecular biology**, v. 24, n. 2, p. 261–272, 1994.

FU, M. et al. A subset of Arabidopsis RAV transcription factors modulates drought and salt stress responses independent of ABA. **Plant & cell physiology**, v. 55, n. 11, p. 1892–1904, 2014.

GACHOMO, E. W. et al. Structural characterization of plant defensin protein superfamily. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 4, p. 4461–4469, 2012.

GAMES, P. D. et al. Isolation, characterization and cloning of a cDNA encoding a new antifungal defensin from *Phaseolus vulgaris* L. seeds. **Peptides**, v. 29, n. 12, p. 2090–2100, 2008.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. - PubMed - NCBI. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 710–720, 2003.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. **Comptes rendus biologiques**, v. 327, n. 6, p. 539–549, 2004.

- GAO, B. et al. AdDLP, a bacterial defensin-like peptide, exhibits anti-Plasmodium activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 387, n. 2, p. 393–398, 18 2009.
- GASTEIGER, E. et al. ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3784–3788, 2003.
- GIZATULLINA, A. K. et al. Recombinant production and solution structure of lipid transfer protein from lentil *Lens culinaris*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 439, n. 4, p. 427–432, 2013.
- GLYNN, N. C. et al. Transmission of a Sugarcane yellow leaf virus resistance transgene to sexual progeny and screening by kanamycin inoculation. **Field crops research**, v. 119, n. 2-3, p. 308–313, 2010.
- GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy policy**, v. 36, n. 6, p. 2086–2097, 2008.
- GOODSTEIN, D. M. et al. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic acids research**, v. 40, n. Database issue, p. D1178–86, 2012.
- GRABOWSKI, M. et al. Structural genomics: keeping up with expanding knowledge of the protein universe. **Current opinion in structural biology**, v. 17, n. 3, p. 347–353, 2007.
- GRATIVOL, C. et al. Sugarcane genome sequencing by methylation filtration provides tools for genomic research in the genus *Saccharum*. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 79, n. 1, p. 162–172, 2014.
- GRIVET, L. et al. A Review of Recent Molecular Genetics Evidence for Sugarcane Evolution and Domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, v. 2, p. 009, 2004.
- GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current opinion in plant biology**, v. 5, n. 2, p. 122–127, 2002.
- HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Ethanolic fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysates. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 28-29, p. 131–144, 1991.
- HARRISON, S. J. et al. An Antimicrobial Peptide from the Australian Native *Hardenbergia violacea* Provides the First Functionally Characterised Member of a Subfamily of Plant Defensins. **Australian journal of plant physiology**, v. 24, n. 5, p. 571, 1997.
- HASSAN, M. N.; AFGHAN, S.; HAFEEZ, F. Y. Biological Suppression Of Sugarcane Red Rot By *Bacillus* Spp. Under Field Conditions. **Journal of plant pathology: an international journal of the Italian Phytopathological Society**, v. 94, n. 2, p. 325–329, 2012.
- HAYES, B. M. E. et al. Identification and mechanism of action of the plant defensin NaD1 as a new member of the antifungal drug arsenal against *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3667–3675, 2013.
- HEATH, M. C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. **Current opinion in plant biology**, v. 3, n. 4, p. 315–319, 2000.
- HECHT, A. Chromosomal Evolution in Higher Plants G. Ledyard Stebbins. **The American biology teacher**, v. 34, n. 5, p. 290–290, 1972.
- HEGARTY, M. J. et al. Transcriptome shock after interspecific hybridization in senecio is

- ameliorated by genome duplication. **Current biology: CB**, v. 16, n. 16, p. 1652–1659, 2006.
- HEGEDÜS, N.; MARX, F. Antifungal proteins: More than antimicrobials? **Fungal biology reviews**, v. 26, n. 4, p. 132–145, 2013.
- HEIL, M. Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. **Annals of botany**, v. 89, n. 5, p. 503–512, 2002.
- HITCHCOCK, A. S. Type Species of the First 100 Genera of Linnaeus' Species Plantarum. **American journal of botany**, v. 10, n. 9, p. 510, 1923.
- HOARAU, J.-Y. et al. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). I. Genome mapping with AFLP markers. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 103, n. 1, p. 84–97, 2001.
- HOH, F. et al. Structure of a liganded type 2 non-specific lipid-transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 61, n. Pt 4, p. 397–406, 2005.
- HOLLINGSWORTH, S. A.; ANDREW, K. P. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. **Biomolecular concepts**, v. 1, n. 3-4, 2010.
- IBGE. **Condições climáticas desfavoráveis podem afetar safra de 2018**. Disponível em: <<http://3.agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/17904-condicoes-climaticas-desfavoraveis-podem-afetar-safra-de-2018.html>>. Acesso em: 17 nov. 2017.
- IZAWA, T. et al. The rice bZIP transcriptional activator RITA-1 is highly expressed during seed development. **The Plant cell**, v. 6, n. 9, p. 1277–1287, 1994.
- JANEWAY, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 54 Pt 1, p. 1–13, 1989.
- JANG, C. S. et al. Evolution of non-specific lipid transfer protein (nsLTP) genes in the Poaceae family: their duplication and diversity. **Molecular genetics and genomics: MGG**, v. 279, n. 5, p. 481–497, 2008.
- JANNOO, N. et al. Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 99, n. 1-2, p. 171–184, 1999.
- JANNOO, N. et al. Orthologous comparison in a gene-rich region among grasses reveals stability in the sugarcane polyploid genome. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 50, n. 4, p. 574–585, 2007.
- JANSSEN, B. J. C. et al. Structure of *Petunia hybrida* defensin 1, a novel plant defensin with five disulfide bonds. **Biochemistry**, v. 42, n. 27, p. 8214–8222, 2003.
- JETHA, K.; THEISSE, G.; MELZER, R. Arabidopsis SEPALLATA proteins differ in cooperative DNA-binding during the formation of floral quartet-like complexes. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 17, p. 10927–10942, 2014.
- JONES, A. M.; THOMAS, K. C.; MICHAEL INGLEDEW, W. Ethanollic Fermentation of Blackstrap Molasses and SugarCane Juice Using Very High Gravity Technology. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1242–1246, 1994.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323, 2006.

J.-P.DOULIEZ et al. Mini Review: Structure, Biological and Technological Functions of Lipid Transfer Proteins and Indolines, the Major Lipid Binding Proteins from Cereal Kernels. **Journal of cereal science**, v. 32, n. 1, p. 1–20, 2000.

JUNG, Y.J. et al. Application of Antimicrobial Peptides for Disease Control in Plants. **Plant Breeding and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1–13, 2013.

KADER, J. C. Lipid-Transfer Proteins In Plants. - PubMed - NCBI. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 627–654, 1996.

KANG, H. G.; SINGH, K. B. Characterization of salicylic acid-responsive, arabidopsis Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 21, n. 4, p. 329–339, 2000.

KATO, H. et al. Characterization of nuclear factors for elicitor-mediated activation of the promoter of the pea phenylalanine ammonia-lyase gene 1. **Plant physiology**, v. 108, n. 1, p. 129–139, 1995.

KATO, Y.; KOMATSU, S. ASABF, a novel cysteine-rich antibacterial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. Purification, primary structure, and molecular cloning of cDNA. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 48, p. 30493–30498, 1996.

KAUR, A. et al. In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. **PLoS one**, v. 12, n. 9, p. e0184523, 2017.

KELLEY, L. A. et al. The Phyre² web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015.

KESARWANI, M.; YOO, J.; DONG, X. Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 144, n. 1, p. 336–346, 2007.

KIHARA, H.; ONO, T. Chromosomenzahlen und systematische Gruppierung der Rumex-Arten. **Zeitschrift for Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 4, n. 3, p. 475–481, 1926.

KIM, H. et al. Characterization of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein 2 (LTPG2) and Overlapping Function between LTPG/LTPG1 and LTPG2 in Cuticular Wax Export or Accumulation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant & cell physiology**, v. 53, n. 8, p. 1391–1403, 2012.

KIM, S. R.; KIM, Y.; AN, G. Identification of methyl jasmonate and salicylic acid response elements from the nopaline synthase (nos) promoter. **Plant physiology**, v. 103, n. 1, p. 97–103, 1993.

KIM, S. Y.; CHUNG, H. J.; THOMAS, T. L. Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 11, n. 6, p. 1237–1251, 1997.

KIZIS, D.; PAGES, M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 30, n. 6, p. 679–689, 2002.

- KOIKE, M. et al. A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 298, n. 1, p. 46–53, 2002.
- KRAGH, K. M. et al. Characterization and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris*. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 8, n. 3, p. 424–434, 1995.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- LACERDA, A. F. et al. Antifungal defensins and their role in plant defense. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2014.
- LAI, R. et al. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 295, n. 4, p. 796–799, 2002.
- LAKSHMANAN, P. et al. Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 41, n. 4, p. 345–363, 2005.
- LAMB, C. J. et al. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, v. 56, n. 2, p. 215–224, 1989.
- LAM, H. Q. et al. Production of paper grade pulp from bagasse by a novel pulping process. **Appita Journal**, v. 57, n. 1, p. 26–29, 2004.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012.
- LASKOWSKI, R. A. PDBsum: summaries and analyses of PDB structures. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 1, p. 221–222, 2001.
- LAY, F. T. Isolation and Properties of Floral Defensins from Ornamental Tobacco and Petunia. **Plant physiology**, v. 131, n. 3, p. 1283–1293, 2003.
- LAY, F. T.; ANDERSON, M. A. Defensins: components of the innate immune system in plants. **Current protein & peptide science**, v. 6, n. 1, p. 85–101, 2005.
- LEITCH, A. R.; LEITCH, I. J. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. **Science**, v. 320, n. 5875, p. 481–483, 2008.
- LESCOT, M. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 1, p. 325–327, 2002.
- LI, J. et al. Genome-wide survey and expression analysis of the putative non-specific lipid transfer proteins in *Brassica rapa* L. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e84556, 2014.
- LINDORFF-LARSEN, K.; WINTHER, J. R. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. **FEBS letters**, v. 488, n. 3, p. 145–148, 2001.
- LINTHORST, H. J. et al. Analysis of acidic and basic chitinases from tobacco and petunia and their constitutive expression in transgenic tobacco. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 3, n. 4, p. 252–258, 1990.

LIPKA, U.; FUCHS, R.; LIPKA, V. Arabidopsis non-host resistance to powdery mildews. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 404–411, 2008.

LIU, J. et al. Functional Analysis of the Maize C-Repeat/DRE Motif-Binding Transcription Factor CBF3 Promoter in Response to Abiotic Stress. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 6, p. 12131–12146, 2015.

LIU, Y.J. et al. Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 63, n. 4, p. 777–786, 2006.

LOBO, D. S. et al. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. **Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 987–996, 2007.

LOGEMANN, E.; PARNISKE, M.; HAHLBROCK, K. Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 13, p. 5905–5909, 1995.

LOKKO, Y. et al. Characterization of an 18,166 EST dataset for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) enriched for drought-responsive genes. **Plant cell reports**, v. 26, n. 9, p. 1605–1618, 2007.

LOTAN, T.; ORI, N.; FLUHR, R. Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers. **The Plant cell**, v. 1, n. 9, p. 881–887, 1989.

LUTZ, A. M. A Preliminary Note On The Chromosomes Of *Oelignothera Lamarckiana* And One Of Its Mutants, O. GIGAS. **Science**, v. 26, n. 657, p. 151–152, 1907.

MADALENO, L. L. et al. Use of antimicrobials for contamination control during ethanolic fermentation. **Científica**, v. 44, n. 2, p. 226, 2016.

MALATHI, P.; VISWANATHAN, R. Variation in *Colletotrichum falcatum*-Red Rot Pathogen of Sugarcane in Relation to Host Resistance. **Sugar Tech**, v. 14, n. 2, p. 181–187, 2012.

MALDONADO, A. M. et al. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. **Nature**, v. 419, n. 6905, p. 399–403, 2002.

MALLET, J. Hybridization as an invasion of the genome. **Trends in ecology & evolution**, v. 20, n. 5, p. 229–237, 2005.

MANNERS, JM. Functional genomics of sugarcane. **Adv Bot Res**. 60, p. 89–168, 2011

MARCHELO, P. W.; AHMED, A. O.; BUKHARI, K. A. Evaluation of some sugarcane genotypes, *Saccharum* spp. for resistance to the whip smut disease of sugarcane incited by the fungus *Ustilago scitaminea* Syd. **Gezira Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 2, 2008.

MAR, E.-M. Y.-S. et al. Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. **Journal of experimental botany**, v. 54, n. 389, p. 1865–1877, 2003.

MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 421–424, 1994.

MCCLINTOCK, B. The significance of responses of the genome to challenge. **Science**, v.

226, n. 4676, p. 792–801, 1984.

MEE DO, H. et al. Differential expression and in situ localization of a pepper defensin (CADEF1) gene in response to pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. **Plant science: an international journal of experimental plant biology**, v. 166, n. 5, p. 1297–1305, 2004.

MEHRTENS, F. et al. The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. **Plant physiology**, v. 138, n. 2, p. 1083–1096, 2005.

MENDEZ, E. et al. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 194, n. 2, p. 533–539, 1990.

MENKENS, A. E.; SCHINDLER, U.; CASHMORE, A. R. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. **Trends in biochemical sciences**, v. 20, n. 12, p. 506–510, 1995.

MÉTRAUX, J. P. et al. Increase in salicylic Acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science**, v. 250, n. 4983, p. 1004–1006, 1990.

MEYER, B. et al. Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. Upregulation during ripening and upon wounding. **Plant physiology**, v. 112, n. 2, p. 615–622, 1996.

MIROUZE, M. et al. A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 47, n. 3, p. 329–342, 2006.

MOORE, P. H. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum. **Field crops research**, v. 92, n. 2-3, p. 119–135, 2005.

MOREAU, V. H. et al. The bZIP region of the plant transcription factor opaque-2 forms stable homodimers in solution and retains its helical structure upon subunit dissociation. **Biochemistry**, v. 43, n. 16, p. 4862–4868, 2004.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical biochemistry**, v. 117, n. 2, p. 307–310, 1981.

MUKHERJEE, S. K. Origin and Distribution of Saccharum. **Botanical gazette**, v. 119, n. 1, p. 55–61, 1957.

MYGIND, P. H. et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 975–980, 2005.

MYSORE, K. S.; RYU, C.-M. Nonhost resistance: how much do we know? **Trends in plant science**, v. 9, n. 2, p. 97–104, 2004.

NAWROT, R. et al. Plant antimicrobial peptides. **Folia microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 181, 2014.

NEMNI, A. et al. Barley's lipid transfer protein: a new emerging allergen in pediatric anaphylaxis. **Pediatric allergy and immunology: official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology**, v. 24, n. 4, p. 410–411, 2013.

NIEUWLAND, J. et al. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. **The Plant cell**, v. 17, n. 7, p. 2009–2019, 2005.

NIKI, T. et al. Antagonistic Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis-Related (PR) Protein Genes in Wounded Mature Tobacco Leaves. **Plant & cell physiology**, v. 39, n. 5, p. 500–507, 1998.

NIKS, R. E.; MARCEL, T. C. Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? **The New phytologist**, v. 182, n. 4, p. 817–828, 2009.

NITHYA, K. et al. Molecular detection of *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease of sugarcane (*Saccharum officinarum*) using a SCAR marker. **The Annals of applied biology**, v. 160, n. 2, p. 168–173, 2012.

NIU, X.; GUILTINAN, M. J. DNA binding specificity of the wheat bZIP protein EmBP-1. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 23, p. 4969–4978, 1994.

OARD, S.; KARKI, B. Mechanism of beta-purothionin antimicrobial peptide inhibition by metal ions: molecular dynamics simulation study. **Biophysical chemistry**, v. 121, n. 1, p. 30–43, 2006.

OLIVARES, F. L. et al. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **The New phytologist**, v. 135, n. 4, p. 723–737, 1997.

OLORIZ, M. I. et al. Sugarcane genes differentially expressed in response to *Puccinia melanocephala* infection: identification and transcript profiling. **Plant cell reports**, v. 31, n. 5, p. 955–969, 2012.

OOI, L. S. M. et al. Isolation, characterization, molecular cloning and modeling of a new lipid transfer protein with antiviral and antiproliferative activities from *Narcissus tazetta*. **Peptides**, v. 29, n. 12, p. 2101–2109, 2008.

OSBORN, R. W. et al. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. **FEBS letters**, v. 368, n. 2, p. 257–262, 1995.

OSBORN, T. C. et al. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. **Trends in genetics: TIG**, v. 19, n. 3, p. 141–147, 2003.

PADOVAN, L. et al. A plant-defensin from sugarcane (*Saccharum* spp.). **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 4, p. 430–436, 2009.

PADOVAN, L.; SCOCCHI, M.; TOSSI, A. Structural aspects of plant antimicrobial peptides. **Current protein & peptide science**, v. 11, n. 3, p. 210–219, 2010.

PANCHY, N.; LEHTI-SHIU, M.; SHIU, S.-H. Evolution of Gene Duplication in Plants. **Plant physiology**, v. 171, n. 4, p. 2294, 2016.

PARK, C. B.; KIM, M. S.; KIM, S. C. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 218, n. 1, p. 408–413, 1996.

PARK, S.-Y. et al. A Lipid Transfer-Like Protein Is Necessary for Lily Pollen Tube Adhesion to an in vitro Stylar Matrix. **The Plant cell**, v. 12, n. 1, p. 151, 2000.

PASTORELLO, E. A. et al. Clinical role of a lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 104, n. 5, p. 1099–1106, 1999.

PASTORELLO, E. A. et al. Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 105, n. 2 Pt 1, p. 371–377, 2000a.

PASTORELLO, E. A. et al. The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 106, n. 4, p. 744–751, 2000b.

PASTORELLO, E. A. et al. Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v. 756, n. 1-2, p. 95–103, 2001.

PATTERSON-DELAFIELD, J. et al. Microbicidal cationic proteins of rabbit alveolar macrophages: amino acid composition and functional attributes. **Infection and immunity**, v. 31, n. 2, p. 723–731, 1981.

PATTERSON-DELAFIELD, J.; MARTINEZ, R. J.; LEHRER, R. I. Microbicidal cationic proteins in rabbit alveolar macrophages: a potential host defense mechanism. **Infection and immunity**, v. 30, n. 1, p. 180–192, 1980.

PENNINCKX, I. A. M. A. et al. Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in Arabidopsis Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway. **The Plant cell**, v. 8, n. 12, p. 2309, 1996.

PEREIRA, L. DA S. Peptídeos antimicrobianos de folhas e raízes de *Capsicum annum* L.: caracterização e atividade inibitória sobre microrganismos fitopatogênicos. **Dissertação de Mestrado-UENF**, 2015.

PERSLEY, G. J. Pathogenic Variation in *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, the Causal Agent of Leaf-Scald Disease of Sugar Cane. **Australian journal of biological sciences**, v. 26, n. 4, p. 781, 1973.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PONS, J.-L. et al. Refined solution structure of a liganded type 2 wheat nonspecific lipid transfer protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 16, p. 14249–14256, 2003.

PRATHIMA, P. T. et al. Differential regulation of defense-related gene expression in response to red rot pathogen *Colletotrichum falcatum* infection in sugarcane. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 171, n. 2, p. 488–503, 2013.

PUGA-FREITAS, R.; BLOUIN, M. A review of the effects of soil organisms on plant hormone signalling pathways. **Environmental and experimental botany**, v. 114, p. 104–116, 2015.

RABBANI, M. A. et al. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. **Plant physiology**, v. 133, n. 4, p. 1755–1767, 2003.

RADECKA, D. et al. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 6, 2015.

RAE, A. L. et al. Sucrose accumulation in the sugarcane stem: pathways and control points for transport and compartmentation. **Field crops research**, v. 92, n. 2-3, p. 159–168, 2005.

RAMBAUT. **FigTree Tree Figure Drawing Tool**.
<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.2010.

RFA. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/>>. Acesso em: 21 dez. 2017.

RIDGEN, J.; COUTTS, R. Pathogenesis-related proteins in plants. **Trends in genetics: TIG**, v. 4, n. 4, p. 87–89, 1988.

RODRIGUES, F. A. et al. Sugarcane genes differentially expressed during water deficit. **Biologia plantarum**, v. 55, n. 1, p. 43–53, 2011.

RODRIGUES, M. C. et al. Comparison among Inbreeding Systems in Maize. **Cropp Breeding and Applied Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 105–114, 2001.

ROMBEL, I. T. et al. ORF-FINDER: a vector for high-throughput gene identification. **Gene**, v. 282, n. 1-2, p. 33–41, 2002.

ROSSI, M.; ARAUJO, P. G.; VAN SLUYS, M.-A. Survey of transposable elements in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). **Genetics and molecular biology**, v. 24, n. 1-4, p. 147–154, 2001.

ROTT, P.; CHAGVARDIEFF, P. In vitro reactions of sugarcane (*Saccharum* sp.) plantlets inoculated with 2 strains of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 9, n. 1, p. 9–18, 1987.

ROUSTER, J. et al. Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 11, n. 3, p. 513–523, 1997.

ROY, S. et al. Functional analysis of light-regulated promoter region of AtPol λ gene. **Planta**, v. 235, n. 2, p. 411–432, 2012.

SAFI, H. et al. A wheat lipid transfer protein (TdLTP4) promotes tolerance to abiotic and biotic stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant physiology and biochemistry: PPB / Societe francaise de physiologie vegetale**, v. 89, p. 64–75, 2015.

SAGARAM, U. S. et al. Structural and functional studies of a phosphatidic acid-binding antifungal plant defensin MtDef4: identification of an RGFRRR motif governing fungal cell entry. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e82485, 2013.

SAKSENA, P. et al. Pathological and Molecular Variation in *Colletotrichum falcatum* Went Isolates Causing Red Rot of Sugarcane in the Northwest Zone of India. **Journal of Plant Protection Research**, v. 53, n. 1, 2013.

SALCEDO, G. et al. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1771, n. 6, p. 781–791, 2007.

SALMINEN, T. A.; BLOMQUIST, K.; EDQVIST, J. Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. **Planta**, v. 244, n. 5, p. 971–997, 2016.

SALTZMANN, K. D. et al. Transcript profiles of two wheat lipid transfer protein-encoding genes are altered during attack by Hessian fly larvae. **Plant physiology and biochemistry**:

PPB / Societe francaise de physiologie vegetale, v. 48, n. 1, p. 54–61, 2010.

SAMUEL, D. et al. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35267–35273, 20 2002.

SANTA BRIGIDA, A. B. et al. Sugarcane transcriptome analysis in response to infection caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*. **PloS one**, v. 11, n. 12, p. e0166473, 2016.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368–379, 1987.

SCHEURER, S. et al. Strong allergenicity of Pru av 3, the lipid transfer protein from cherry, is related to high stability against thermal processing and digestion. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 114, n. 4, p. 900–907, 2004.

SCHIBLI, D. J. et al. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 10, p. 8279–8289, 2002.

SCHLUETER, J. A. et al. Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species. **Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada**, v. 47, n. 5, p. 868–876, 2004.

SCHOCKER F, E. AL. Recombinant lipid transfer protein Cor a 8 from hazelnut: a new tool for in vitro diagnosis of potentially severe hazelnut allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 1, p. 141–147, 2004.

SCHRÖDER, J. M. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 56, n. 1-2, p. 32–46, 1999.

SCHUBERT, C. Can biofuels finally take center stage? **Nature biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 777–784, 2006.

SCHULZE-LEFERT, P.; PANSTRUGA, R. A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. **Trends in plant science**, v. 16, n. 3, p. 117–125, 2011.

SCHWEDE, T. et al. Protein structure computing in the genomic era. **Research in microbiology**, v. 151, n. 2, p. 107–112, 2000.

SCHWEIGER, W. et al. Transcriptomic characterization of two major *Fusarium* resistance quantitative trait loci (QTLs), *Fhb1* and *Qfhs.ifa-5A*, identifies novel candidate genes. **Molecular plant pathology**, v. 14, n. 8, p. 772–785, 2013.

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

SEGURA, A. et al. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). **FEBS letters**, v. 435, n. 2-3, p. 159–162, 1998.

SEKI, M. et al. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Current opinion in plant biology**, v. 10, n. 3, p. 296–302, 2007.

- SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal Proteins. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2883, 2001.
- SELS, J. et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant physiology and biochemistry: PPB / Societe francaise de physiologie vegetale**, v. 46, n. 11, p. 941–950, 2008.
- SELSTED, M. E. et al. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. **The Journal of biological chemistry**, v. 258, n. 23, p. 14485–14489, 1983.
- SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. Nonhost resistance against bacterial pathogens: retrospectives and prospects. **Annual review of phytopathology**, v. 51, p. 407–427, 2013.
- SHAHZAD, Z. et al. Plant Defensin type 1 (PDF1): protein promiscuity and expression variation within the Arabidopsis genus shed light on zinc tolerance acquisition in *Arabidopsis halleri*. **The New phytologist**, v. 200, n. 3, p. 820–833, 2013.
- SILVA, G. P. DA et al. Ethanolic fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain ko11 and *Klebsiella oxytoca* strain P2. **Brazilian journal of microbiology: publication of the Brazilian Society for Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 395–404, 2005.
- SILVERSTEIN, K. A. T. et al. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 51, n. 2, p. 262–280, 2007.
- SIMORRE, J. P. et al. Two- and three-dimensional ¹H NMR studies of a wheat phospholipid transfer protein: sequential resonance assignments and secondary structure. **Biochemistry**, v. 30, n. 49, p. 11600–11608, 1991.
- SMITH, G. R. et al. Sugarcane yellow leaf virus: a novel member of the Luteoviridae that probably arose by inter-species recombination. **The Journal of general virology**, v. 81, n. 7, p. 1865–1869, 2000.
- SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.
- SOLOMON, S. Sugarcane By-Products Based Industries in India. **Sugar Tech**, v. 13, n. 4, p. 408–416, 2011.
- SOLOVYEV, V. et al. Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. **Genome biology**, v. 7 Suppl 1, p. S10.1–12, 2006.
- SOLOVYEV, V. V.; SHAHMURADOV, I. A.; SALAMOV, A. A. Identification of Promoter Regions and Regulatory Sites. In: **Methods in Molecular Biology**, 674, p.57-83, 2010
- SOLTIS, P. S. et al. Polyploidy and genome evolution in plants. **Current opinion in genetics & development**, v. 35, p. 119–125, 2015.
- SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. The Role of Hybridization in Plant Speciation. **Annual review of plant biology**, v. 60, n. 1, p. 561–588, 2009.
- SONG, X. et al. Purification, characterization and preliminary crystallographic studies of a novel plant defensin from *Pachyrrhizus erosus* seeds. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 60, n. 6, p. 1121–1124, 2004.

- SONG, X. et al. Ultra-high resolution crystal structure of a dimeric defensin SPE10. **FEBS letters**, v. 585, n. 2, p. 300–306, 2011.
- SOUZA, I. R. P. DE et al. Reaction of sugarcane genotypes to strains of the sugarcane mosaic virus. **Embrapa**, 2017.
- SOUZA, T. P.; DIAS, R. O.; SILVA-FILHO, M. C. Defense-related proteins involved in sugarcane responses to biotic stress. **Genetics and molecular biology**, v. 40, n. 1 suppl 1, p. 360–372, 2017.
- SPELBRINK, R. G. et al. Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins. **Plant physiology**, v. 135, n. 4, p. 2055–2067, 2004.
- STASKAWICZ, B. J. et al. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, v. 268, n. 5211, p. 661–667, 1995.
- STEFAN ROKEM, J.; GREENBLATT, C. L. Making Biofuels Competitive: The Limitations of Biology for Fuel Production. **JSM Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 1023, 2015.
- STOTZ, H. U.; WALLER, F.; WANG, K. Innate Immunity in Plants: The Role of Antimicrobial Peptides. In: **Antimicrobial Peptides and Innate Immunity**, 2012
- STUPAR, R. M.; HERMANSON, P. J.; SPRINGER, N. M. Nonadditive expression and parent-of-origin effects identified by microarray and allele-specific expression profiling of maize endosperm. **Plant physiology**, v. 145, n. 2, p. 411–425, 2007.
- SUN, J.-Y. et al. Characterization and antifungal properties of wheat nonspecific lipid transfer proteins. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 21, n. 3, p. 346–360, 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Sinauer Associates Incorporated, 2010.
- TALAMÈ, V. et al. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 2, p. 229–240, 2007.
- TERRAS, F. R. et al. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 22, p. 15301–15309, 1992.
- TERRAS, F. R. et al. A new family of basic cysteine-rich plant antifungal proteins from Brassicaceae species. **FEBS letters**, v. 316, n. 3, p. 233–240, 1993.
- TERRAS, F. R. et al. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. **The Plant cell**, v. 7, n. 5, p. 573–588, 1995.
- TERZAGHI, W. B. Light-Regulated Transcription. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 46, n. 1, p. 445–474, 1995.
- THEVISSSEN, K. et al. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 25, p. 15018–15025, 1996.
- THEVISSSEN, K. et al. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 17, p. 9531–9536, 2000.
- THEVISSSEN, K. et al. Defensins from insects and plants interact with fungal

glucosylceramides. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 6, p. 3900–3905, 6 2004.

THEVISSSEN, K. et al. The plant defensin RsAFP2 induces cell wall stress, septin mislocalization and accumulation of ceramides in *Candida albicans*. **Molecular microbiology**, v. 84, n. 1, p. 166–180, 2012.

THOMMA, B. P.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K. Plant defensins. **Planta**, v. 216, n. 2, p. 193–202, 2002.

THOMMA, B. P. H. J. et al. 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**, v. 95, n. 25, p. 15107–15111, 1998.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. **Current opinion in plant biology**, v. 6, n. 4, p. 351–357, 2003.

TOMASINSIG, L.; ZANETTI, M. The Cathelicidins - Structure, Function and Evolution. **Current protein & peptide science**, v. 6, n. 1, p. 23–34, 2005.

TOMKINS, J. P. et al. A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. **TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik**, v. 99, n. 3-4, p. 419–424, 1999.

TSUBOI, S. et al. Nonspecific Lipid Transfer Protein in Castor Bean Cotyledon Cells: Subcellular Localization and a Possible Role in Lipid Metabolism¹. **Journal of biochemistry**, v. 111, n. 4, p. 500–508, 1992.

VAN DER WEERDEN, N. L.; ANDERSON, M. A. Plant defensins: Common fold, multiple functions. **Fungal biology reviews**, v. 26, n. 4, p. 121–131, 2013.

VAN DER WEERDEN, N. L.; HANCOCK, R. E. W.; ANDERSON, M. A. Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 48, p. 37513–37520, 2010.

VAN DER WEERDEN, N. L.; LAY, F. T.; ANDERSON, M. A. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 21, p. 14445–14452, 23 maio. 2008.

VAN REE, R. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. **Biochemical Society transactions**, v. 30, n. Pt 6, p. 910–913, 2002.

VARGAS, L. et al. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e114744, 2014.

VETTORE, A. L. et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome research**, v. 13, n. 12, p. 2725–2735, 2003.

VICENTE-CARBAJOSA, J. et al. A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 14, p. 7685–7690, 1997.

VRIENS, K.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. Antifungal plant defensins: mechanisms of

action and production. **Molecules** , v. 19, n. 8, p. 12280–12303, 2014.

WACLAWOVSKY, A. J. et al. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant biotechnology journal**, v. 8, n. 3, p. 263–276, 2010.

WALTERS, D. E. et al. Design and evaluation of new analogs of the sweet protein brazzein. **Chemical senses**, v. 34, n. 8, p. 679–683, 2009.

WANG, F. et al. An environmentally friendly and productive process for bioethanol production from potato waste. **Biotechnology for biofuels**, v. 9, n. 1, 2016.

WANG, H. et al. Regulation of Arabidopsis brassinosteroid signaling by atypical basic helix-loop-helix proteins. **The Plant cell**, v. 21, n. 12, p. 3781–3791, 2009.

WANG, H. W. et al. Insight into the molecular evolution of non-specific lipid transfer proteins via comparative analysis between rice and sorghum. **DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes**, v. 19, n. 2, p. 179–194, 2012.

WANG, S.; RAO, P.; YE, X. Isolation and biochemical characterization of a novel leguminous defense peptide with antifungal and antiproliferative potency. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 79–86, 2009.

WANG, X.-Y. et al. Evaluation of sugarcane introgression lines for resistance to brown rust disease caused by *Puccinia melanocephala*. **Tropical plant pathology**, v. 38, n. 2, p. 97–101, 2013.

WARD, E. R. et al. Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. **The Plant cell**, v. 3, n. 10, p. 1085–1094, 1991.

WATERHOUSE, A. M. et al. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics** , v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 2009.

WEBSTER, R. D.; SHAW, R. B. Taxonomy of the native North American species of *Saccharum* (Poaceae: Andropogoneae). **SIDA**, v. 16, n. 3, p. 551–580, 1995.

WEIGEL, R. R. et al. NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from Arabidopsis that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. **Plant molecular biology**, v. 46, n. 2, p. 143–160, 2001.

WEI, K.; ZHONG, X. Non-specific lipid transfer proteins in maize. **BMC plant biology**, v. 14, p. 281, 2014.

WILMES, M. et al. Antibiotic activities of host defense peptides: more to it than lipid bilayer perturbation. **Natural product reports**, v. 28, n. 8, p. 1350–1358, 2011.

WINICOV, I. Alfin1 transcription factor overexpression enhances plant root growth under normal and saline conditions and improves salt tolerance in alfalfa. **Planta**, v. 210, n. 3, p. 416–422, 2000.

WONG, J. H. et al. A mitogenic defensin from white cloud beans (*Phaseolus vulgaris*). **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2075–2081, 2006.

WONG, J. H.; NG, T. B. Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. **Peptides**,

v. 26, n. 7, p. 1120–1126, 2005a.

WONG, J. H.; NG, T. B. Vulgarinin, a broad-spectrum antifungal peptide from haricot beans (*Phaseolus vulgaris*). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 8, p. 1626–1632, 2005b.

WOOD, N. T. Synthetic promoters illuminate roles of cis-acting elements in plant defence. **Trends in plant science**, v. 7, n. 7, p. 288, 2002.

WOOD, T. E. et al. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 33, p. 13875–13879, 2009.

XU, F. et al. Molecular cloning and characterization of GbDXS and GbGGPPS gene promoters from *Ginkgo biloba*. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 12, n. 1, p. 293–301, 2013.

XU, Y. et al. Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. **The Plant cell**, v. 6, n. 8, p. 1077, 1994.

YAMAMOTO, M. P. et al. Synergism between RPBF Dof and RISBZ1 bZIP activators in the regulation of rice seed expression genes. **Plant physiology**, v. 141, n. 4, p. 1694–1707, 2006.

YANAGISAWA, S. Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 21, n. 3, p. 281–288, 2000.

YANG, Y.-F. et al. Alanine substitutions of noncysteine residues in the cysteine-stabilized $\alpha\beta$ motif. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 18, n. 7, p. 1498–1506, 2009.

YANG, Y. S. et al. Solution structure and activity of the synthetic four-disulfide bond *Mediterranean mussel* defensin (MGD-1). **Biochemistry**, v. 39, n. 47, p. 14436–14447, 2000.

YEATS, T. H.; ROSE, J. K. C. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 17, n. 2, p. 191–198, 2008.

YOUNT, N. Y. et al. The γ -core motif correlates with antimicrobial activity in cysteine-containing kaliocin-1 originating from transferrins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1768, n. 11, p. 2862–2872, 2007.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 19, p. 7363–7368, 2004.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus skin*: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 15, p. 5449–5453, 1987.

ZHANG, Y. et al. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 11, p.

6523–6528,1999.

ZHAO, B. et al. A maize resistance gene functions against bacterial streak disease in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15383–15388, 2005.

ZIMMERLI, L. et al. Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. **The Plant journal: for cell and molecular biology**, v. 40, n. 5, p. 633–646, 2004.

ZIPFEL, C.; FELIX, G. Plants and animals: a different taste for microbes? **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 4, p. 353–360, 2005.

APÊNDICE A – Proteínas preditas a partir dos *scaffolds* de defensinas e LTPs identificados em cana-de-açúcar.

DEFENSINAS	
scaffold282041_size489	MHMLCVRGAELGTTSSVAEARYCLSQSHRFKGLCLSSSNCASVCQ TENFPGGECNVDGATRKCFCCKIC
scaffold57294_size2091	MGTTRVAEARHRHCFSQSHKFGACLSESNENVCCKTEGFPSGE CKWHGIVSKCHCKRIC
scaffold520753_size324	MLLLVATGTYVRAAGWLIYTSICELIWYGRCCAEMGPVAVAEART CQSQSHRFRGPCVRRANCANVCRTEGFDPDGKCRGFRRRFCFTT HCRN
scaffold88512_size2077	MRTYVRAEEAAVPLAEARVCRRRSAGFKGICMSDHNCAQVCLQE GWGGGNCDGIMRQCKCIRQC
scaffold2513_size5793	MVAEARVCMGKSQHHSFPCISDR LCSNECVKEDGGWTAGYCHL RYCRCQKAC
scaffold323100_size443	MYMMCCLVFGFAEMQGPVTMALARKCQSKSFHFKGPCSQD TDC NAACVKESESYTGGFCNGRPPFKQCFCTKPKRERERELLHFG
LTPS	
scaffold41602_size2134	MQLAVAI AVVA AVVLLAATSEAAVT CGQV TSAISPCLSYARGQGS A PSSGCCSGV RSLNNAARTSADRRTACNCLKSAARSISGLNAGNA ASIPSKCGVNV PYTISTSTDCSKYVHIYTCIN YLLHMYIAACMHVLT QIVP
scaffold20652_size3599	MAAPRLALVA AVAVLALLAASKTASAAVSCGEVTSSVAPCLGYAM GTASSPSAACCGV RSLNSRATSTADRQAACACLKSMTSRLGGG GGVSMGNAASIPGKCGVTGVPISPNDCKYVGRSSPLSIN
scaffold219457_size599	MAAPKLATLALAVLLAATVVAPPA AVRAAMSCSTVYSTLMPCLPFV QMGGAMPPQPCCGGIRSLLAQADNTPDRRTICGCLKNVANGANG SGTYISR AALPSKCGVSLPYKISTNVN CNTYVVYTLAPAVFSDST TAAAILVS
scaffold31802_size2240	MMMKKGGATTTVAVAVALLVLLAAAASSVARAHVSCADV DENLR PCVGYVTGKEAAPAAECCVGVKRIRAMP SGTADR RQACECVKQA AAKYQPLNADAIRDLPEKCGAPLPFPLTLNFDCTTCVYPN
scaffold356482_size414	MSSRPPSSALAVLLVAAALAGAASAATLQCVQVAQLMAPCMPYLT GAPGMTPYGICCN SLGVLNQLAATRADRVAACSCV KAAAAGFPA VDFARAAGLPAACGLSISFTISP NMDCNQYV
scaffold88322_size2077	MRGLLVLALVAAAACLVA VRGADGAGECGATPPDRMALKLAPCA SAAQNPSSAPSSSCCNAVHNIGKQSPKCLCAVMLSKTAKSAGIKP EVAITIPKRCNLVDRPIGYKCGGKQNNVCSNCFLLQNCQWYKQNR LIK
scaffold23901_size2930	MRS LFV VALLVAAACLAAPRGADGAGECGATPPDTMALKLAPCAS AAEDPSSAPSSSCSAVHSIGKQSPKCLCAVMLSNTAKSAGIKAE VAITIPKRCNLVDRPVGYKCGGR
scaffold84056_size2079	MAKLV LGLLLVLAII GRTSADNCDKDAEAMKQECKKFQEF PANPKL EPSPACCAVWQRADIPCLCKRVTPEAEKLWCMEKV VYVANY
scaffold61537_size2089	MARLFLACMVLLGLAMAAAARPATTT PEDPPTGDCNQDLQDLIT NCQDYVRF PADPKIPPSAACCGVIHRVNIPCLCSKV TPTVETIVCM DKVVYVASYCKRPLKPGSQCGSK

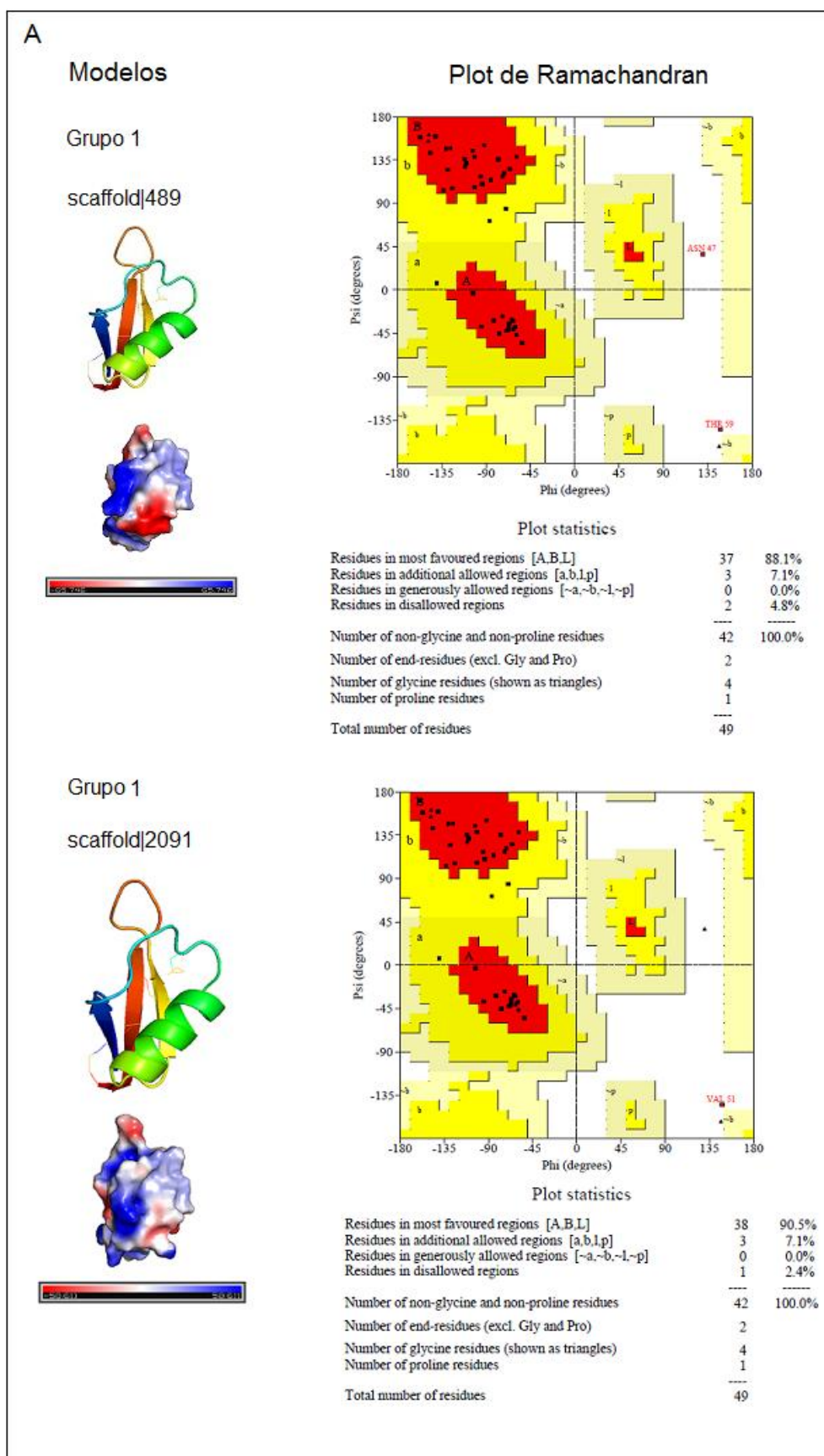
APÊNDICE B – Transcritos identificados em transcriptomas de *Saccharum* spp através de TBLASTN de defensinas e LTPS e alguns parâmetros do alinhamento (porcentagem de identidade, tamanho do alinhamento e *eval*).

SP701143				
QUERY ID	SUBJECT	% IDENTITY	ALIGNMENT LENGTH	E VALUE
SODEF01-04	Locus_7415_Transcript_3/3_Confidence_0.667_Length_501	100.00	80	7,00E-42
SODEF01-04	Locus_7415_Transcript_2/3_Confidence_0.667_Length_497	100.00	80	7,00E-42
SODEF01-04	Locus_7415_Transcript_1/3_Confidence_0.667_Length_489	100.00	80	7,00E-42
SODEF01-04	Locus_7415_Transcript_1/3_Confidence_0.667_Length_489	100.00	80	7,00E-42
SODEF05	Locus_60074_Transcript_3/3_Confidence_0.600_Length_705	97.59	83	6,00E
SODEF05	Locus_60074_Transcript_2/3_Confidence_0.400_Length_597	97.59	83	6,00E
SODEF05	Locus_60074_Transcript_1/3_Confidence_0.600_Length_629	97.59	83	6,00E
SODEF06	Locus_7501_Transcript_4/4_Confidence_0.500_Length_444	100.00	80	3,00E
SODEF06	Locus_7501_Transcript_3/4_Confidence_0.600_Length_474	100.00	80	3,00E
SODEF06	Locus_7501_Transcript_2/4_Confidence_0.600_Length_548	100.00	80	3,00E
SODEF06	Locus_7501_Transcript_1/4_Confidence_0.500_Length_468	90.91	88	5,00E
SODEF07	Locus_7501_Transcript_4/4_Confidence_0.500_Length_444	97.50	80	3,00E
SODEF07	Locus_7501_Transcript_3/4_Confidence_0.600_Length_474	97.50	80	3,00E
SODEF07	Locus_7501_Transcript_2/4_Confidence_0.600_Length_548	97.50	80	3,00E
SODEF07	Locus_7501_Transcript_1/4_Confidence_0.500_Length_468	88.64	88	4,00E
SODEF08	Locus_9619_Transcript_1/1_Confidence_1.000_Length_211	50.94	53	2,00E
SODEF13	Locus_84744_Transcript_1/1_Confidence_1.000_Length_225	98.57	70	2,00E
SODEF17	Locus_25257_Transcript_1/1_Confidence_1.000_Length_301	40.82	49	4,00E
RB72454				
SODEF01-04	c65482_g1_i1	41.25	80	1,00E-11
SODEF17	c20463_g1_i2	96.39	83	7,00E
SODEF17	c20463_g1_i1	91.43	70	3,00E
RB867515				
SODEF05	c38135_g1_i1	97.50	40	2,00E-20
SODEF06	c49378_g1_i1	100.00	80	1,00E
SODEF17	c17793_g1_i1	93.68	95	5,00E
<i>Saccharum officinarum</i>				
SODEF08	c39655_g1_i1	44.64	56	7,00E
SODEF17	c21805_g1_i2	93.68	95	6,00E
SODEF17	c21805_g1_i1	63.12	141	2,00E
<i>Saccharum spontaneum</i>				
SODEF01-04	c2195_g1_i1	41.25	80	2,00E
SODEF17	c15125_g1_i1	95.70	93	8,00E
SODEF17	c15125_g1_i2	90.00	80	9,00E

SP701143				
QUERY ID	SUBJECT	% IDENTIFIED	ALIGNMENT LENGTH	E VALUE
Sobic.008G030900.2	Locus_1722_Transcript_1/4_Confidence_0.643_Length_737	86.55	119	6,00E
Sobic.008G030900.2	Locus_1722_Transcript_4/4_Confidence_0.714_Length_532	90.72	97	1,00E
Sobic.008G030900.2	Locus_1722_Transcript_2/4_Confidence_0.500_Length_538	88.66	97	5,00E
Sobic.008G030700.1	Locus_45117_Transcript_2/2_Confidence_0.857_Length_297	88.78	98	4,00E
Sobic.008G030700.1.	Locus_7784_Transcript_2/2_Confidence_0.571_Length_452	79.82	114	8,00E-47
Sobic.008G031000.1	Locus_1893_Transcript_5/6_Confidence_0.286_Length_717	85.84	113	3,00E
Sobic.008G031000.1	Locus_1893_Transcript_1/6_Confidence_0.214_Length_717	85.84	113	3,00E
Sobic.008G031000.1	Locus_1893_Transcript_3/6_Confidence_0.500_Length_700	85.84	113	3,00E
Sobic.008G031000.1	Locus_1893_Transcript_6/6_Confidence_0.286_Length_590	85.84	113	3,00E
Sobic.008G031000.1	Locus_1893_Transcript_2/6_Confidence_0.357_Length_590	85.84	113	3,00E
Sobic.008G031000.1	Locus_1893_Transcript_4/6_Confidence_0.286_Length_586	85.84	113	3,00E
Sobic.003G338700.1	Locus_218_Transcript_1/1_Confidence_1.000_Length_546	96.69	121	3,00E
Sobic.006G074300.1	Locus_2260_Transcript_5/5_Confidence_0.500_Length_722	94.87	117	3,00E
Sobic.006G074300.1	Locus_2260_Transcript_3/5_Confidence_0.500_Length_659	94.87	117	3,00E
Sobic.006G074300.1	Locus_2260_Transcript_4/5_Confidence_0.300_Length_609	93.16	117	1,00E
Sobic.006G074300.1	Locus_2260_Transcript_2/5_Confidence_0.500_Length_909	94.64	112	7,00E
Sobic.006G074300.1	Locus_2260_Transcript_1/5_Confidence_0.400_Length_768	92.86	112	3,00E-55
RB72454				
Sobic.008G030900.2	c33168_g3_i1	79.83	119	4,00E
Sobic.008G031000.1	c29561_g3_i2	86.51	126	3,00E
Sobic.008G031000.1	c29561_g3_i1	84.92	126	4,00E
Sobic.003G338700.1	c25117_g1_i1	96.75	123	1,00E
Sobic.006G074300.1	c24526_g1_i1	68.38	117	5,00E
RB867515				
Sobic.008G030900.2	c29056_g1_i2	81.36	118	5,00E
Sobic.008G030900.2	c29056_g1_i1	78.99	119	4,00E
Sobic.008G031000.1	c26252_g1_i2	84.92	126	3,00E
Sobic.008G031000.1	c26252_g1_i1	84.13	126	1,00E
Sobic.003G338700.1	c23126_g1_i2	96.75	123	8,00E
Sobic.003G338700.1	c23126_g1_i1	96.75	123	8,00E
Sobic.006G074200.1	c21070_g1_i1	68.38	117	6,00E-40
<i>Saccharum spontaneum</i>				
Sobic.008G030900.2	c25554_g1_i2	89.92	119	3,00E
Sobic.008G030900.2	c25554_g1_i3	88.24	119	4,00E
Sobic.008G030900.2	c25554_g1_i1	88.24	119	4,00E
Sobic.008G030700.1	c14030_g1_i1	77.65	85	2,00E
Sobic.003G338700.1	c13059_g1_i2	96.75	123	8,00E
Sobic.003G338700.1	c13059_g1_i1	96.75	123	8,00E

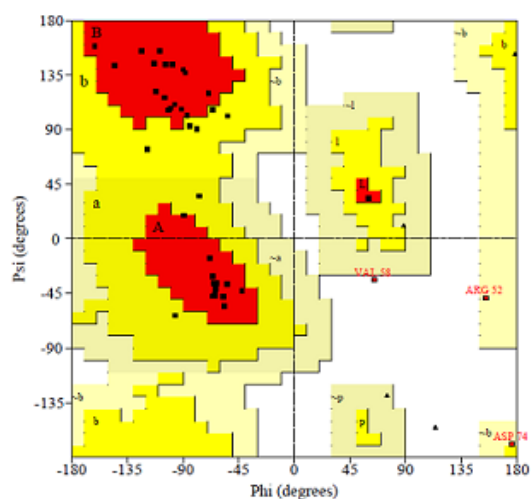
QUERY ID	SUBJECT	% IDENTIFIED	ALIGNMENT LENGTH	E VALUE
Sobic.006G074300.1	c16862_g1_i1	95.73	117	3,00E
Sobic.003G326200.1	c37842_g1_i1	89.66	87	2,00E

APÊNDICE C – Modelagens das defensinas e LTPs identificadas em cana-de-açúcar.



Grupo 2

scaffold|324



Plot statistics

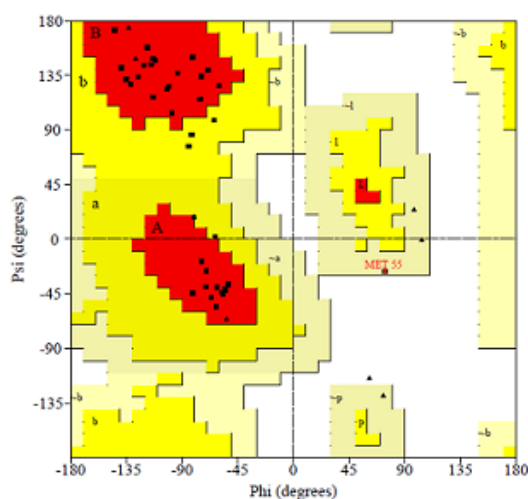
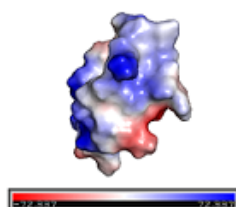
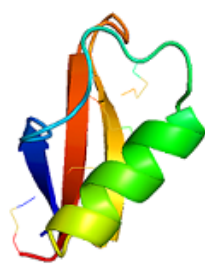
Residues in most favoured regions [A,B,L]	30	76.9%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	6	15.4%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	2	5.1%
Residues in disallowed regions	1	2.6%

Number of non-glycine and non-proline residues	39	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	4	
Number of proline residues	2	

Total number of residues	47	

Grupo 3

scaffold|2077



Plot statistics

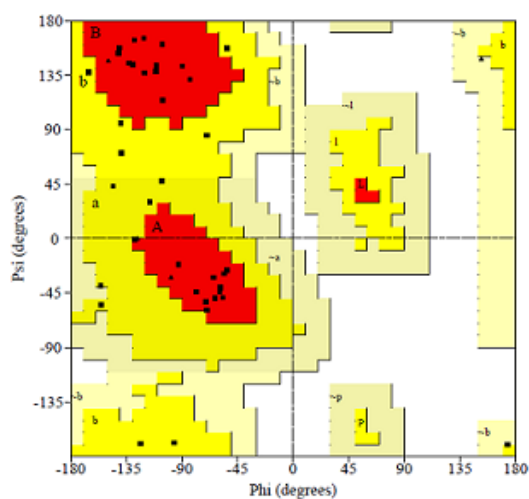
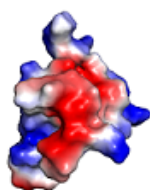
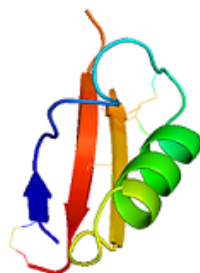
Residues in most favoured regions [A,B,L]	33	86.8%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	4	10.5%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1	2.6%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	38	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	7	
Number of proline residues	0	

Total number of residues	47	

Grupo 4

scaffold|5793



Plot statistics

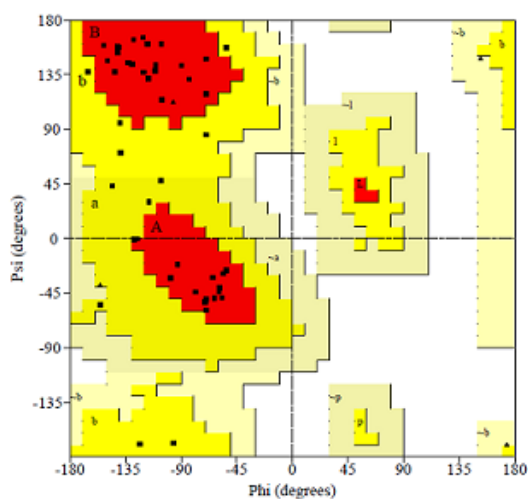
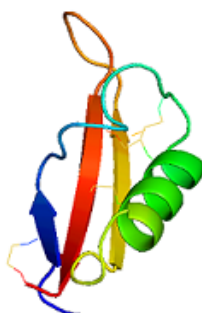
Residues in most favoured regions [A,B,L]	25	67.6%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	12	32.4%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	37	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	4	
Number of glycine residues (shown as triangles)	4	
Number of proline residues	1	

Total number of residues	46	

Grupo 5

scaffold|443



Plot statistics

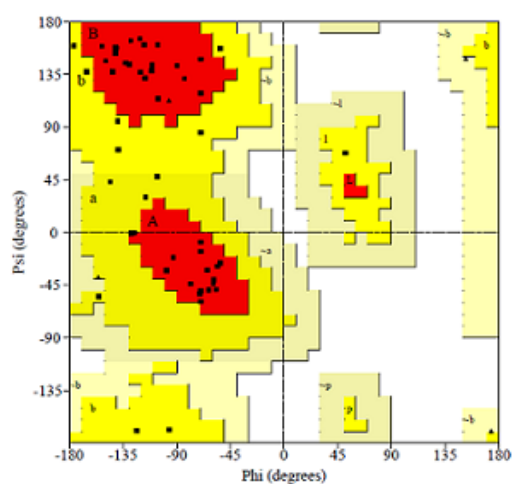
Residues in most favoured regions [A,B,L]	34	79.1%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	9	20.9%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	43	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	4	
Number of proline residues	4	

Total number of residues	53	

Grupo 5

c20463_g1_i_RB72454



Plot statistics

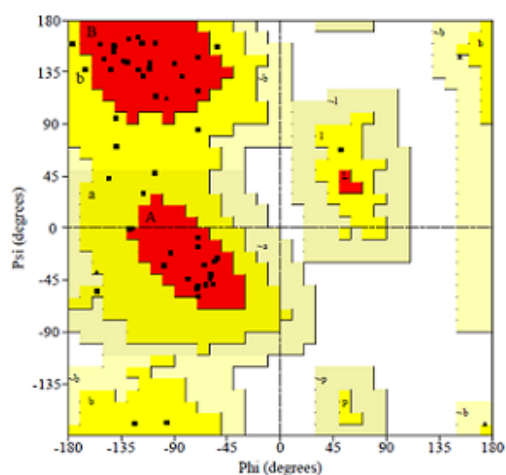
Residues in most favoured regions [A,B,L]	33	73.3%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	12	26.7%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	45	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	4	
Number of proline residues	6	

Total number of residues	57	

Grupo 5

c17793_g1_i1_RB867515



Plot statistics

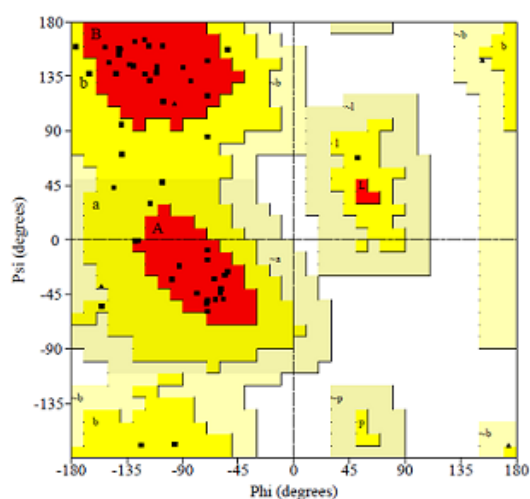
Residues in most favoured regions [A,B,L]	33	73.3%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	12	26.7%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	45	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	4	
Number of proline residues	6	

Total number of residues	57	

Grupo 5

c21805_g1_i2_SOF



Plot statistics

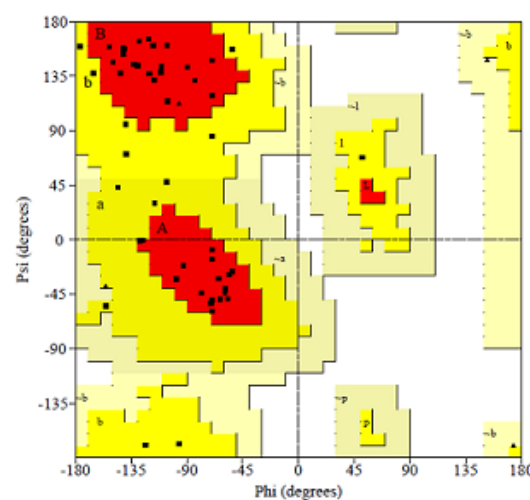
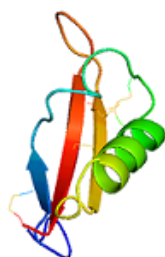
Residues in most favoured regions [A,B,L]	33	73.3%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	12	26.7%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	45	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	4	
Number of proline residues	6	

Total number of residues	57	

Grupo 5

c15125_g1_i1_SSP

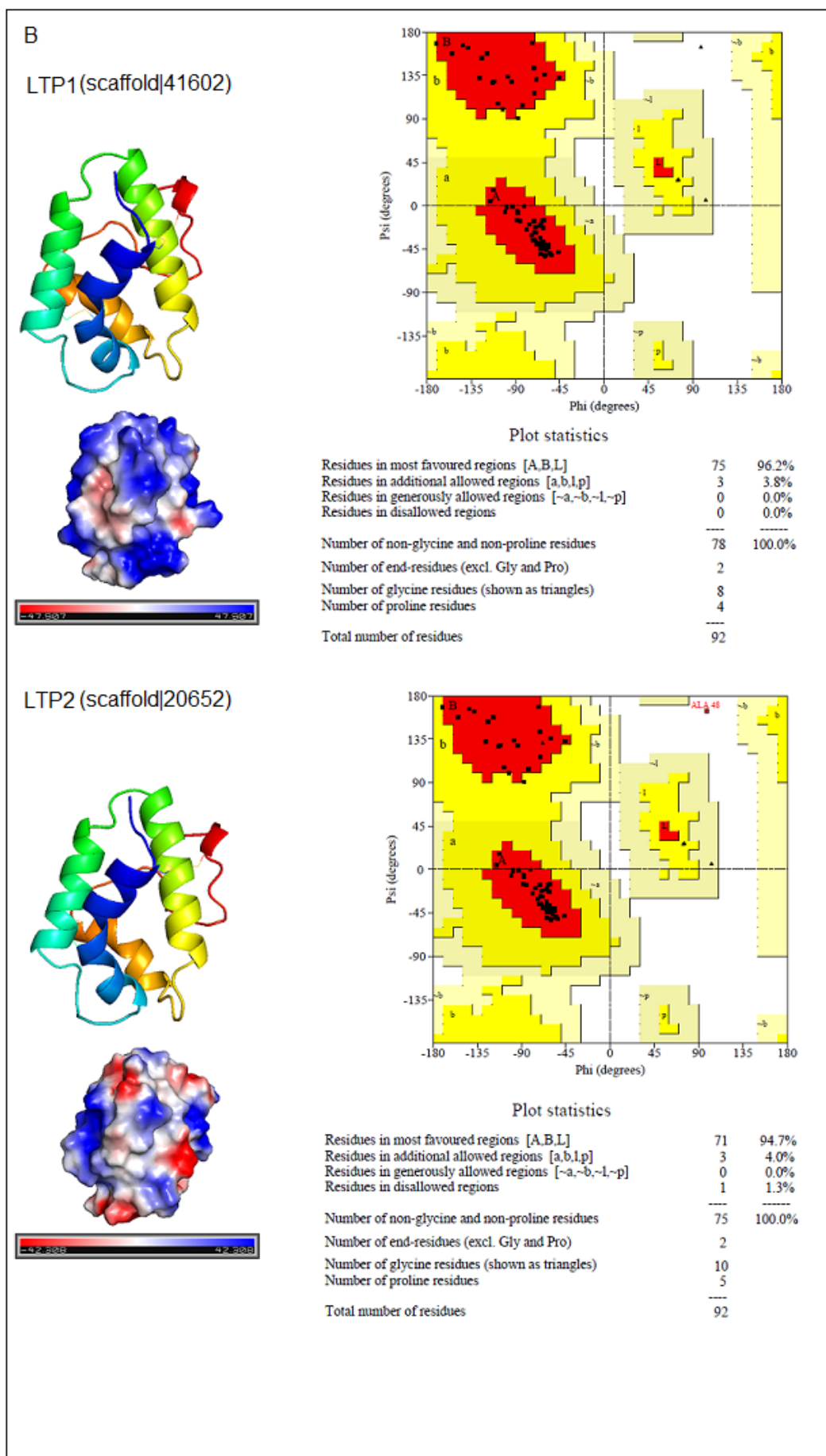


Plot statistics

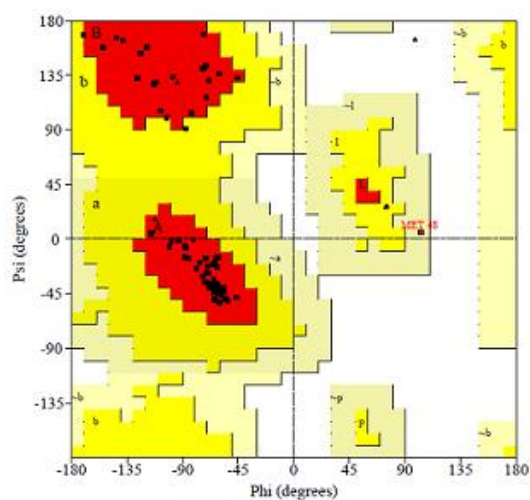
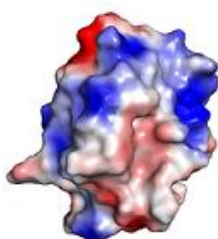
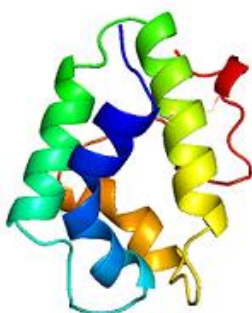
Residues in most favoured regions [A,B,L]	33	73.3%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	12	26.7%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	45	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	4	
Number of proline residues	6	

Total number of residues	57	



LTP3 (scaffold|219457)



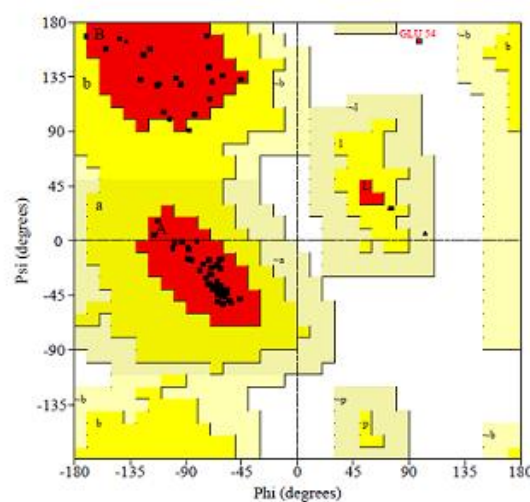
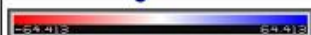
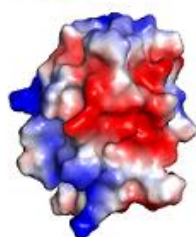
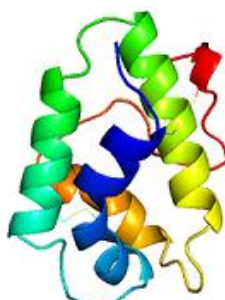
Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	71	94.7%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	3	4.0%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1	1.3%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	75	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	8	
Number of proline residues	8	

Total number of residues	93	

LTP4 (scaffold|31802)

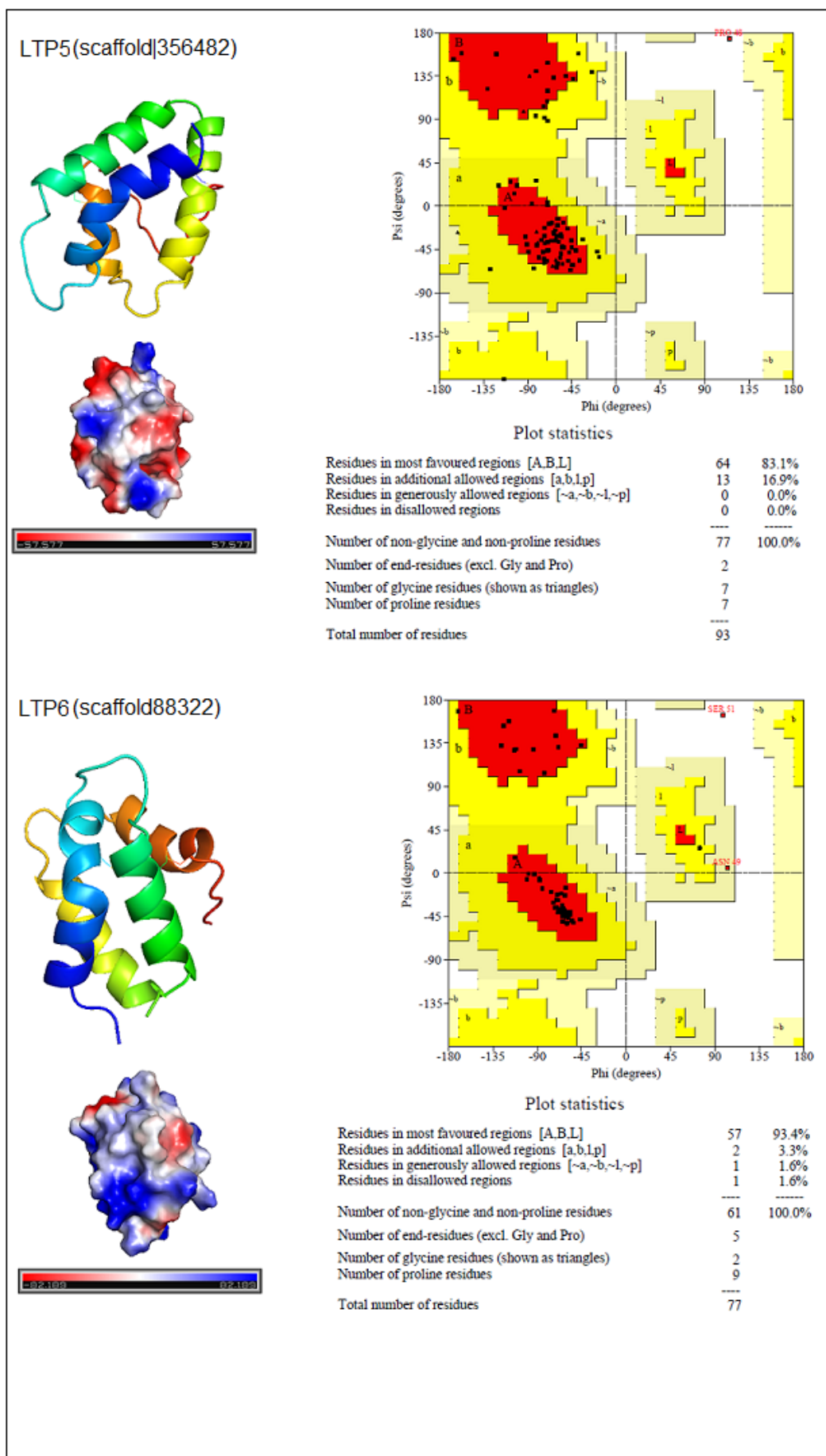


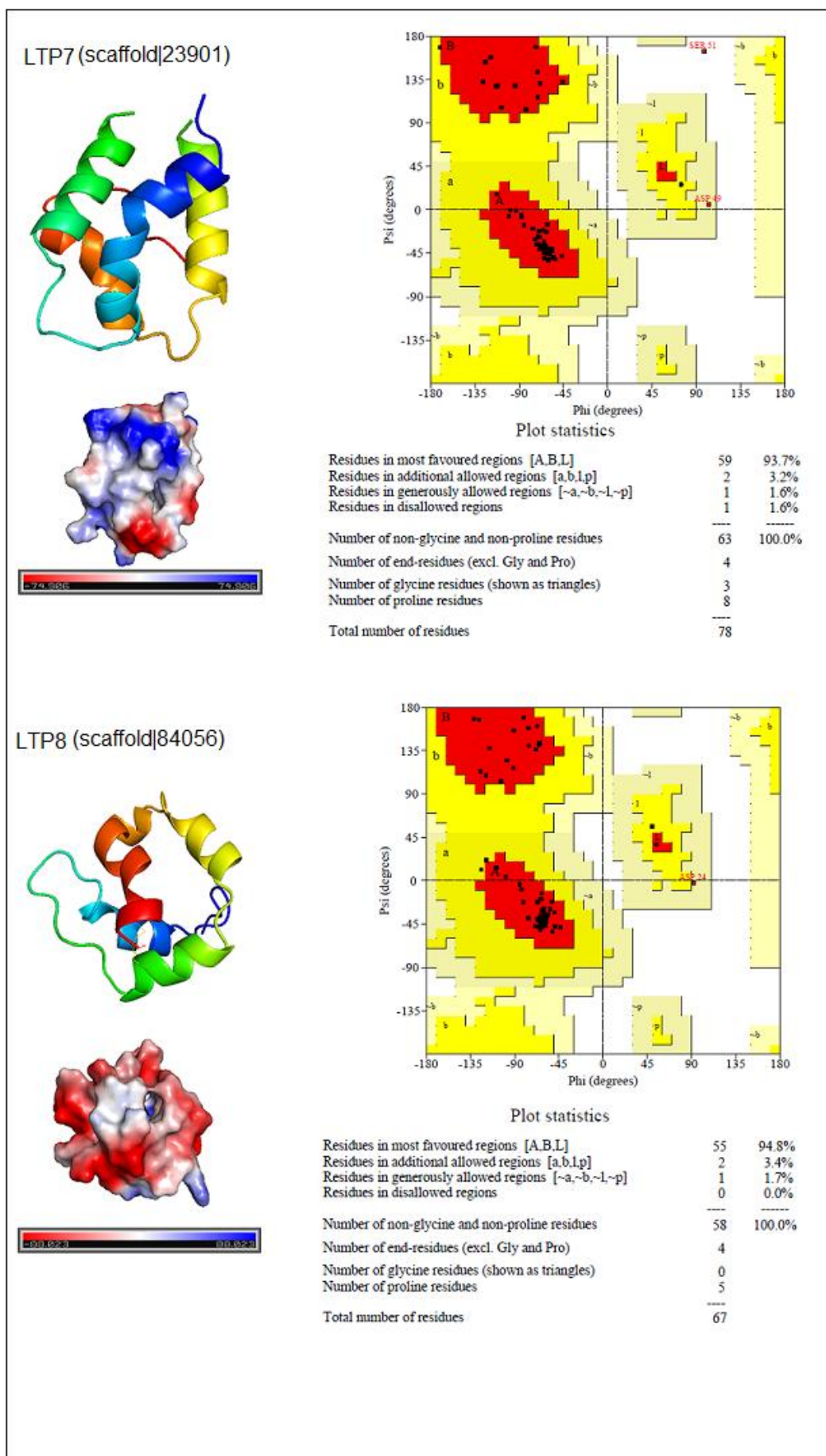
Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	74	96.1%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	2	2.6%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	1	1.3%

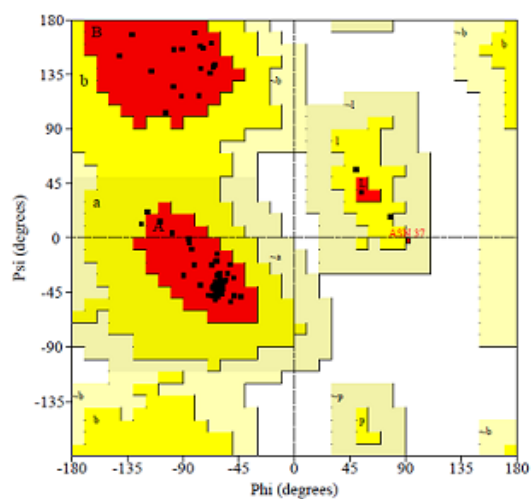
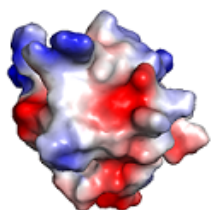
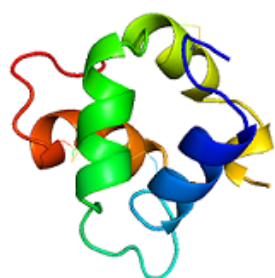
Number of non-glycine and non-proline residues	77	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	5	
Number of proline residues	8	

Total number of residues	92	





LTP9 (scaffold|1537)

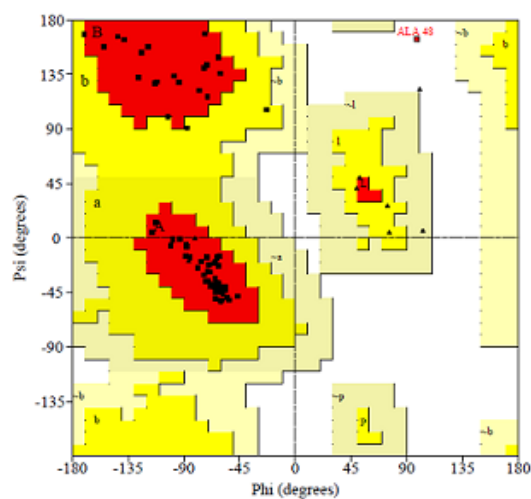
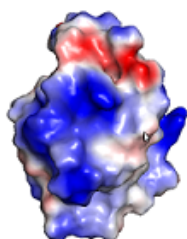


Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	55	93.2%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	3	5.1%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	1	1.7%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
<hr/>		
Number of non-glycine and non-proline residues	59	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	3	
Number of glycine residues (shown as triangles)	2	
Number of proline residues	7	
<hr/>		
Total number of residues	71	

LTP1

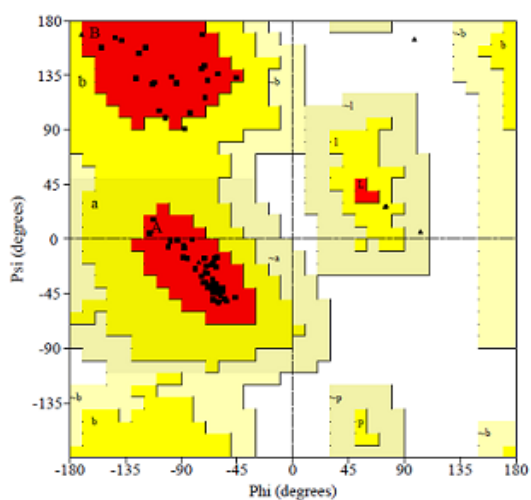
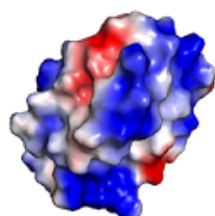
c29561_g3_i1-RB72454



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	71	93.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	4	5.3%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	1	1.3%
<hr/>		
Number of non-glycine and non-proline residues	76	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	13	
Number of proline residues	5	
<hr/>		
Total number of residues	96	

LTP1
c29056_g1_i1-RB867515



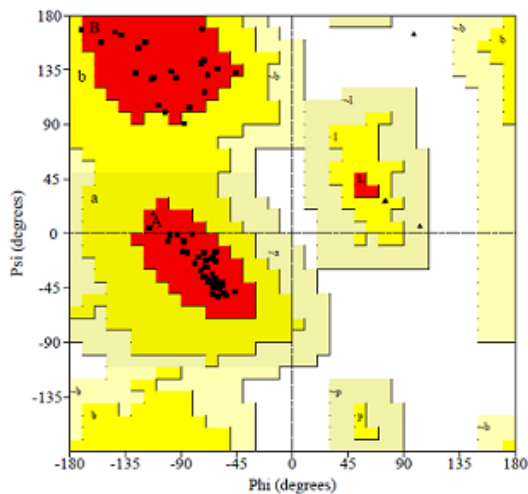
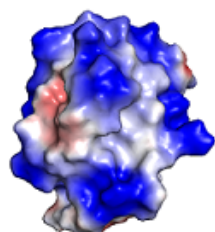
Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	76	97.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	2	2.6%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	78	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	9	
Number of proline residues	4	

Total number of residues	93	

LTP1
c25554_g1_i2-SSP



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	75	96.2%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	3	3.8%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	78	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	9	
Number of proline residues	4	

Total number of residues	93	