



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO CAMPUS DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL**

MARIA POLIANA MARTINS PEREIRA

**ANOTAÇÃO FUNCIONAL, CLASSIFICAÇÃO E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE
FITOALEXINAS EM CULTIVARES DE *Vitis* spp. INOCULADAS COM
*Xanthomonas citri***

**PETROLINA
2022**

MARIA POLIANA MARTINS PEREIRA

**ANOTAÇÃO FUNCIONAL, CLASSIFICAÇÃO E EXPRESSÃO
DIFERENCIAL DE FITOALEXINAS EM CULTIVARES DE *Vitis* spp.
INOCULADAS COM *Xanthomonas citri***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal do *Campus* de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agronomia – Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo
Co-orientador: Roberta Lane de Oliveira Silva

**PETROLINA
2022**

Pereira, Maria Poliana Martins

P436a Anotação funcional, classificação e expressão diferencial de fitoalexinas em cultivares de *Vitis* spp. inoculadas com *Xanthomonas citri* / Maria Poliana Martins Pereira. – Petrolina-PE, 2023.
xiii, 57 f.: il.; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina-PE, 2023.

Orientador: Prof.º Dr.º Nataniel Franklin de Melo.

Inclui referências.

1. Uva – Doenças e pragas. 2. Cultura da videira. 3. Defesa vegetal. I. Título. II. Melo, Nataniel Franklin de. III. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 634.82

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UNIVASF.
Bibliotecária: Andressa Laís Machado de Matos CRB – 4/2240.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO CAMPUS DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – PRODUÇÃO VEGETAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Poliana Martins Pereira

ANOTAÇÃO FUNCIONAL, CLASSIFICAÇÃO E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE
FITOALEXINAS EM CULTIVARES DE *Vitis* SPP. INOCULADAS COM *Xanthomonas*
citri

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Agronomia –
Produção Vegetal, pela Universidade Federal do Vale
do São Francisco.

Aprovada em: 16 de Dezembro de 2022.

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 NATONIEL FRANKLIN DE MELO
Data: 16/12/2022 12:05:12-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo, Embrapa/UNIVASF (Orientador)

Documento assinado digitalmente
 ROBERTA LANE DE OLIVEIRA SILVA
Data: 16/12/2022 12:25:43-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profª. Drª. Roberta Lane de Oliveira Silva, UNIVASF
(Co-orientadora)

Documento assinado digitalmente
 JOAO JOSE DE SIMONI GOUVEIA
Data: 19/12/2022 11:34:21-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. João José de Simoni Gouveira, UNIVASF

Documento assinado digitalmente
 VESPASIANO BORGES DE PAIVA NETO
Data: 16/12/2022 13:45:36-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Vespasiano Borges de Paiva Neto, UNIVASF

À minha família por todo apoio e incentivo.
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da minha vida e por todas as bençãos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco - FACEPE pela concessão da bolsa de pesquisa.

A Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, onde pude realizar os meus estudos.

A Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias – EMBRAPA SEMIÁRIDO pela infraestrutura para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a Jéssica Barboza da Silva por toda ajuda e incentivo, por abdicar o seu tempo para me ensinar e tirar minhas dúvidas sobre Bioinformática. Jéssica é uma pessoa importante nessa minha caminhada. Muito OBRIGADA!

Ao meu orientador, Nataniel Franklin de Melo por incentivo e apoio e a minha coorientadora, Roberta Lane de Oliveira Silva pelo apoio durante execução o trabalho.

Agradeço a minha família, minha base, tudo de mais precioso que tenho na vida! Principalmente a minha mãe e aos meus irmãos por toda leveza que trazem a minha vida.

Agradeço aos meus eternos colegas e amigos de laboratório de Microbiologia, Luiz Dantas, Lilian Rodrigues, Rayane Oliveira, Tamires Dália, Daniela Nascimento, Karen Menezes, Aline Passos e Valdirene Pedone, pelo cuidado e atenção.

Agradeço aos meus amigos Wendel Júnior, Alana Juliete, Tullyus Rubens e Luiz Henrique pela amizade.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Amanda Alencar, Álef Franklen, Letícia Yonara, Renata Amariz, Isabela Amariz e Jiovanna Amando e Francisco Nogueira.

Aos meus sobrinhos Enzo e Ian Martins pela alegria que trazem aos meus dias.

*Nada é tão nosso como os nossos
sonhos”*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

A região do Vale do São Francisco destaca-se como o maior polo nacional produtor de fruticultura irrigada, tendo como um dos destaques, o cultivo da videira. No entanto, o cancro bacteriano da videira causado pela bactéria *X. citri* pv. *Viti cola* (Xcv), tem afetado a produtividade e a qualidade da cultura. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar, caracterizar e analisar as fitoalexinas envolvidas no processo de defesa em videira infectada por *X. citri* para avaliação de seu potencial para o melhoramento genético ou biotecnologia da espécie. O experimento foi conduzido em casa de vegetação visando a geração de bibliotecas de RNA-Seq a partir de clones de videira da cultivar Red Globe (susceptível a Xcv) e do híbrido IAC-572 (moderadamente resistente a Xcv). As plantas foram inoculadas com uma suspensão bacteriana e tiveram seus tecidos foliares coletados após 90 minutos de inoculação com a bactéria. O RNA total foi extraído, purificado e enviado para a construção das bibliotecas de RNA-Seq e sequenciado. Foi realizada a identificação das sequências candidatas das famílias gênicas Estilbenes Sintases (STS) e Resveratrol O-metiltransferases (ROMT) e calculados o peso molecular (pM) e o ponto isoelétrico (pI), e realizada a localização subcelular. Os motivos conservados foram identificados pelo MEME-Suit e as localizações cromossômicas foram extraídas do Phytozome v13 e NCBI. Foi realizada a localização dos genes e identificação das estruturas gênicas de STS e ROMT. As proteínas caracterizadas foram submetidas a um alinhamento múltiplo pelo ClustalW e as árvores genéticas foram construídas no MEGA X. A maioria das sequências STS e ROMT apresentaram características ácidas, pM variável e localização subcelular predominante no citoplasma. Os dados de Ontologia Gênica das proteínas STS das duas espécies de videira apresentaram Processo Biológico (PB) relacionado aos processos biossintéticos, metabólicos, respostas a estímulos, resposta a estresses e defesa vegetal. A Função Molecular indicou a participação das proteínas em atividades de triidroxiestilbene sintase, transferase, acetiltransferase e catalítica. O fenograma demonstrou a formação de sete *clusters* para a família STS e três para ROMT. O *heatmap* gerado para os transcritos STS demonstrou a formação de dois *clusters*, sendo um para cada cultivar de videira estudada. Os dados de expressão *in silico* indicaram que o *cluster* do híbrido IAC-572 reuniu três transcritos STS reprimidos e um induzido, enquanto o *cluster* da cultivar Red Globe reuniu um transcrito induzido. Para ROMT foi observado a formação de dois *clusters*, sendo um para cada cultivar. No *cluster* do híbrido IAC-572 nenhum transcrito foi induzido e no *cluster* da Red Globe foram verificados dois transcritos induzidos. A inoculação com *X. citri* após 90 minutos de estresse resultam na indução de poucos transcritos das famílias de genes STS e ROMT no híbrido IAC-572, no entanto, fica evidente que as cultivares apresentam estratégias de defesa contrastantes frente ao estresse ocasionado pelo agente bacteriano.

Palavras-chave: Videira; Cancro bacteriano; Defesa vegetal; RNA-Seq; Estilbene sintase, Resveratrol O-metiltransferase.

ABSTRACT

The region of Vale do São Francisco stands out as the largest national producer of fruit growing in an irrigated regime and has as one of its highlights, the cultivation of the vine. However, bacterial canker of grapevine caused by the bacterium *X. citri* pv. *viticola* (Xcv), has affected productivity and crop quality. The objective of this work was to identify, characterize and analyze phytoalexins involved in the defense process in grapevine infected by *X. citri* to evaluate its potential for genetic improvement or biotechnology of the species. Thus, an experiment was carried out in a greenhouse aiming at the generation of RNA-Seq libraries from vine clones of the cultivar Red Globe (susceptible to Xcv) and the hybrid IAC-572 (moderately resistant to Xcv). The plants were inoculated with a bacterial suspension and had their leaf tissues collected after 90 minutes of inoculation with the bacteria. Total RNA was extracted, purified and sent to the construction of RNA-Seq libraries and sequenced. Candidate sequences of the Stilbenes Synthases (STS) and Resveratrol O-methyltransferases (ROMT) gene families were identified and isoelectric point (pI) were calculated, and subcellular localization was performed. Conserved motifs were identified by MEME-Suit and chromosomal locations were extracted from Phytozome v13 and NCBI. The localization of the genes and identification of the gene structures of STS and ROMT were carried out. The characterized proteins were submitted to a multiple alignment by ClustalW and the phenetic trees were built in MEGA X. Most of the STS and ROMT sequences showed acidic characteristics, variable pI and predominant subcellular location in the cytoplasm. The data from the Gene Ontology of the STS proteins of the two grapevine species showed Biological Process (BP) related to biosynthetic and metabolic processes, responses to stimuli, response to stress and plant defense. Molecular Function indicated the participation of proteins in trihydroxystilbene synthase, transferase, acetyltransferase and catalytic activities. The phenogram showed the formation of seven clusters for the STS family and three for ROMT. The heatmap generated for the STS transcripts demonstrated the formation of two clusters, one for each grapevine cultivar studied. In silico expression data indicated that the IAC-572 hybrid cluster assembled three repressed and one induced STS transcripts, while the Red Globe cluster assembled one induced transcript. For ROMT, the formation of two clusters was observed, one for each cultivar. In the hybrid IAC-572 cluster no transcript was induced and in the Red Globe cluster two induced transcripts were verified. Inoculation with *X. citri* after 90 minutes of stress resulted in the induction of few transcripts of the STS and ROMT gene families in the hybrid IAC-572, however, it is evident that the cultivars have contrasting defense strategies against the stress caused by the bacterial agent.

Keywords: Vine; Bacterial cancer; Plant Defense; RNA-Seq; Stilbene synthase, Resveratrol O-methyltransferase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sintomas característicos da videira infectada pela <i>X. citri</i> em tecido. A) Pontos necróticos na folha, B) Manchas escuras longitudinais nos pecíolos e ramos, C) Lesões escuras e arredondadas nas bagas (Embrapa, 2015).	20
Figura 2- Rotas biossintéticas e metabólitos da formação de fitoalexinas. Adaptado de Großkinsky et al., (2012).	23
Figura 3- Técnica RNA-Seq. Adaptado de Lowe (2017).	27
Figura 4- Distribuição dos genes STS e ROMT nos cromossomos de a) <i>Vitis vinifera</i> e b)36	36
Figura 5- Anotação funcional das proteínas STS e ROMT de <i>V. vinifera</i> e <i>V. riparia</i> . Função Molecular (A) e (B) Processos biológicos das sequências proteicas VvSTS e VrSTS. Função Molecular (C) e Processos Biológicos (D) das sequências proteicas VvROMT e VrROMT.	44
Figura 6- A) Fenograma dos genes STS de <i>V. vinifera</i> e <i>V. riparia</i> . B) Composições de motivos proteicos. C) Estrutura gênica de STS. As sequências foram alinhadas usando ClustalW e a árvore fenética foi construída usando MEGA 10.0 com 1000 repetições (bootstrap).	45
Figura 7- A) Fenograma da árvore filogenética dos genes ROMT de <i>V. vinifera</i> e <i>V. riparia</i> . B) Composições de motivos proteicos; C) Estrutura gênica de ROMT. As sequências foram alinhadas usando ClustalW e a árvore fenética foi construída usando MEGA 10.0 com 1000 repetições (bootstrap).	46
Figura 8- Motivos conservados das sequências dos genes STS (1 a 5) e ROMT (6 a 10) de <i>V. vinifera</i> e <i>V. riparia</i> . E= Glutamato, T= triptofano, L= leucina, P= prolina, S= serina, N= asparagina, K= lisina, F= fenilalanina, G=glicina, R= arginina, D= ácido aspártico, V= valina, Y= tirosina, H= histidina, C= cisteína, M= metionina, W= triptofano.	47
Figura 9- Expressão gênica das famílias STS (A) e ROMT (B) em tecidos foliares de <i>V. vinifera</i> cv. Red Globe e híbrido IAC-572 sob estresse bacteriano. Os tratamentos são exibidos verticalmente acima de cada coluna. Os genes são exibidos a esquerda de cada linha e evidenciado por cores diferentes. Os níveis de expressão são indicados por um gradiente de cor, baixo (Verde) negativos, alto (Vermelho) induzidos ou expressos e constitutivos ou não expressos (Cinza).	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais ferramentas utilizadas em análises de Bioinformática.	25
Tabela 2- Família de genes STS em <i>V. vinifera</i> e <i>V. riparia</i>	37
Tabela 3- Família de genes ROMT em <i>V. vinifera</i> e <i>V. riparia</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST	Ferramenta Básica de Busca por Alinhamento Local, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	DNA Complementar, <i>Complementary DNA</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
MEGA	Análises Genéticas da Evolução Molecular, <i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>
ROMT	Resveratrol O-metiltransferase
RT-qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real, <i>Quantitative Real Time PCR</i>
STS	Estilbene Sintase
VSF	Vale do São Francisco
VrSTS	<i>Vitis riparia</i> Estilbene Sintase
VrROMT	<i>Vitis riparia</i> Resveratrol O-metiltransferase
VvSTS	<i>Vitis vinifera</i> Estilbene Sintase
VvROMT	<i>Vitis vinifera</i> Resveratrol O-metiltransferase
Xcv	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i>

SUMÁRIO

DEDICO	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.2 Cultivar Red Globe e o Híbrido IAC-572	18
2.3 Cancro bacteriano da videira: origem, ocorrência, disseminação, sintomas e controle	19
2.4 Mecanismos de defesa vegetal	21
2.5 Fitoalexinas	22
2.6. Bioinformática aplicada às ômicas	24
2.7. Transcriptoma e o sequenciamento do RNA (RNA-Seq)	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.2. Propriedades proteicas de STS e ROMT	32
3.3. Localização cromossômica, duplicação e classificação fenética de STS e ROMT	32
3.4. Ensaio experimental e transcriptômica	33
3.5. Extração de RNA, síntese de cDNA, construção das bibliotecas de RNA-seq e sequenciamento	34
4. RESULTADOS	34
4.2. Localização cromossômica dos genes STS e ROMT	34
4.3. Características físico-química e localização subcelular	36
4.4. Anotação funcional das proteínas STS e ROMT – Ontologia gênica (GO)	43
4.5. Análise fenética, motivos conservados e estrutura gênica dos genes STS e ROMT	44
4.6 Padrão de expressão <i>in silico</i> de genes STS e ROMT	48
5. DISCUSSÃO	50
5.1 Identificação e caracterização dos genes STS e ROMT de <i>V. vinifera</i> e <i>V. riparia</i>	50
5.1. Localização dos genes STS e ROMT nos cromossomos	50
5.2. Características físico-químicas	50
5.3. Localização subcelular das proteínas STS e ROMT	51
5.4. Análises fenéticas	51
5.5. Padrões de expressão <i>in silico</i> de genes STS e ROMT	52
6. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

INTRODUÇÃO

A região do Vale do São Francisco (VSF) destaca-se como o maior polo nacional produtor de frutas em regime irrigado e seu desenvolvimento econômico tem como destaque a produção de manga e uva (MOUCO, 2008). A viticultura na região apresenta um grande volume de exportações de uvas de mesa, vinhos e espumantes, evidenciando sua importância em comparação a outros polos de fruticultura do país (IBGE, 2018). Isso se deve a possibilidade de obter até duas safras e meia ao ano de uva, obtendo assim produção durante todo ano, visto como um grande atrativo para investimentos (GAMA, 2020). No entanto, o ataque de microrganismos patogênicos, como *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, causadora do cancro bacteriano na videira, tem afetado a produtividade e a qualidade da cultura e acarretado perdas significativas de produção, apesar das tecnologias envolvidas em seu cultivo (BARBOSA et al., 2016; MALAVOLTA JR. et al., 2003).

A bactéria *X. citri* sobrevive cerca de 80 dias nos tecidos de órgãos da parte aérea de plantas infectadas de videira, disseminando-se a partir de mudas e bacelos infectados (SILVA et al., 2012; NAUE et al., 2014). Os sintomas incluem pequenas manchas escuras alongadas e irregulares nas nervuras e pecíolos, nos ramos presencia-se a formação de cancos e rachaduras longitudinais, apresentando fissuras, fendas necróticas e lesões escuras nos cachos (EMBRAPA, 2003). A intensidade desses sintomas varia de acordo com o tipo de cultivar infectada, sendo que a cultivar Red Globe foi a primeira a ser detectada com os sintomas da doença e se mostra altamente susceptível, por outro lado o híbrido IAC-572 'Jales' é considerado uma fonte moderadamente resistente contra o cancro bacteriano (LIMA, 2000; NASCIMENTO et al., 2006). No entanto, até o momento não existem fontes definidas de resistência e todas as cultivares de videira já testadas apresentaram alta sensibilidade a doença, diferindo apenas no nível de severidade dos sintomas (LOPES; NASCIMENTO, 2004).

Constantemente expostas a situações de estresses, as plantas desenvolveram ao longo de sua evolução diversos mecanismos de defesa. Tais mecanismos podem ser constituintes morfofisiológicos inatos da planta ou serem produzidos (induzidos) em função da detecção do microrganismo na planta (HEATH, 2000). Esses mecanismos podem ser divididos em estruturais e bioquímicos podendo atuar antes (barreiras pré-formadas) ou depois (barreiras pós-formadas) da interação planta-patógeno (FREEMAN; BEATTIE, 2008).

Entre os mecanismos bioquímicos pós-formados, têm-se as fitoalexinas, que são

compostos químicos de baixo peso molecular, produzidos pelos vegetais como mecanismos de defesa, contendo propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, sendo induzidas em resposta a estresses bióticos (JEANDET et al., 2013; SOARES, 2007). As fitoalexinas de videira constituem um grupo pequeno de metabólitos pertencentes à família estilbene, entre eles o resveratrol (3,5,4-triidroxi-trans- estilbeno), que é o composto da videira mais estudado por apresentar propriedades farmacológicas, podendo prevenir ou retardar uma variedade de doenças, incluindo câncer e doenças cardiovasculares.

O resveratrol é encontrado em várias frutas além da videira, incluindo o cranberry (*Vaccinium oxycoccus*), mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), amora (*Morus alba*), amendoim (*Prunus dulcis*) e jaca (*Artocarpus heterophyllus*) (ARÚS et al., 2017; HASAN; BAE, 2017). Além do resveratrol, os complexos derivados de sua modificação, como cis-transpiceideo (WATERHOUSE et al., 1994; GATTO, 2008), viniferinas e o pterostilbeno (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-trans-stilbene) (LANGCAKE, 1981; BAVARESCO et al., 2002) compõem as principais fitoalexinas da videira. Os genes estilbenes sintases (STS) são responsáveis pela biossíntese do resveratrol, enquanto os genes resveratrol O-metiltransferase (ROMT) são responsáveis pela metilação do resveratrol para formar o pteroestilbene, que é um metilado do resveratrol VALETA et al., 2021).

Na videira, tanto a expressão gênica STS quanto a síntese de estilbenos são induzidas após a infecção por diferentes fungos fitopatogênicos como *Botrytis cinerea* (mofo cinzento) (JEANDET et al., 1995; BAVARESCO et al., 1997; BÉZIER et al., 2002), *Plasmopara viticola* (VANNOZI et al., 2012; ADRIAN et al., 2000), *Erysiphe necator* (FUNG et al., 2008; SCHNEE et al., 2008), *Rhizopus stolonifer* (SARING et al., 1997), *Aspergillus* spp. (BAVARESCO et al., 2003; Vezzulli et al., 2007) e *Phaeomoniella chlamydospora* (MARTIN et al., 2009), resultado do aumento da transcrição de seus genes biossintéticos.

Na videira, os dados sobre o impacto da infecção bacteriana na biossíntese de estilbeno ainda são escassos. Alguns trabalhos buscando avaliar os efeitos indutivos de fungos e bactérias na biossíntese estilbenóide, usaram duas cepas fúngicas fitopatogênicas (*Botryodiplodia theobromae* LBBT HC6-1 e *B. cinerea* FCBC TN1) e duas cepas bacterianas fitopatogênicas Gram-negativas (*Xanthomonas campestris* pv. *citri* | XW24 e *Pseudochrobactrum asaccharolyticum*) foram utilizados para tratar calos de amendoim (YANG et al., 2015). Os tratamentos de elicitação foram realizados com microrganismos viáveis ou inviáveis (autoclavados).

Os resultados mostraram que a elicitação fúngica é muito mais eficaz na indução da

biossíntese de trans-resveratrol e *trans-piceatannol* do que a elicitação bacteriana, independentemente da espécie e viabilidade (YANG et al., 2015).

Com os avanços em estudos moleculares houve uma atenção para a compreensão da função desses compostos de defesa dos vegetais (GROBKINSKY et al., 2012). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na biossíntese e regulação de fitoalexinas em plantas sob ataque de patógenos ainda são pouco conhecidos, principalmente os efeitos da interação da videira com a bactéria *X. citri* pv *viticola* (AHUJA; KISSEN; BONES, 2012).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi selecionar sequências protéicas da família gênica de fitoalexinas no genoma da videira e identificar fitoalexinas candidatas no transcriptoma de *Vitis* spp visando realizar uma caracterização estrutural e funcional, bem como validar a expressão das sequências selecionadas através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos botânicos e importância econômica da videira

A videira conhecida cientificamente por *Vitis vinifera* L. pertence à ordem Vitales, família Vitaceae e ao gênero *Vitis*, e este último, é composto por cerca de 70 espécies entre silvestres e viníferas distribuídas nos trópicos e subtropicais dos continentes americano, asiático e europeu (TERRAL et al., 2010; TROPICOS, 2016; APG IV, 2016).

A espécie *Vitis vinifera* é a mais cultivada em nível mundial e tem origem na Eurásia, sendo a principal espécie para elaboração de vinhos e seus derivados (VIDALES, 2020). Outra espécie muito difundida é a *Vitis labrusca* L., originária da costa leste dos Estados Unidos, muito utilizada na produção de sucos, além de apresentar o aroma e o sabor aframboesado que são característicos da espécie (GIOVANNINI, 2014).

De forma geral, as espécies de *Vitis* apresentam-se como arbusto perene de tronco lenhoso contorcido que se divide em dois ramos, podendo chegar a 30 cm de comprimento. São trepadeiras que necessitam de um sistema de suporte para condução do crescimento dos ramos e que permita uma boa penetração de luz no seu dossel (PEREIRA; FERRO, 2008). As folhas são alternas pecioladas, simples ou compostas e apresentam inflorescência do tipo panícula com flores branco esverdeadas, podendo ser hermafroditas ou de sexos separados (ICKERT-BOND et al., 2014; SILVA et al., 2003; SILVA, 2010).

Seus frutos são carnosos do tipo baga reunidos em cachos, contendo de 0-3 sementes variando de cor de acordo com o tipo de uva (SILVA, 2010). Ricos em carboidratos e sais minerais, como ferro e cálcio, além de serem uma fonte importante de vitaminas C, K e do complexo B. Além disso, apresentam em sua composição carotenoides e compostos fenólicos, dentre os quais se destacam as antocianinas, flavonoides e flavan-3-ol (APG IV, 2016; FAO, 2016; HERNÁNDEZ, 2017).

A videira é cultivada mundialmente e está entre as frutíferas de maior importância comercial em termos de valor econômico, com a vitivinicultura constituindo uma importante fonte de renda na maioria das regiões produtoras (MELLO, 2019). De acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho, o cultivo mundial de videira chegou a 7,4 milhões de hectares, espalhando-se pelos cinco continentes (OIV, 2019). Já a atividade vitivinícola, representa um dos principais setores da indústria de processamento de alimentos (KONRAD, 2020). Atualmente os principais produtores de uva são a China, Itália, Estados Unidos, França, Espanha, Argentina, Chile e África do Sul. A China com aproximadamente 15% da produção mundial é o maior produtor, seguida pela Itália com 11% e Estados Unidos com 10%, os quais correspondem com 36% da produção mundial (GAZZOLA, 2020).

De acordo com a Embrapa (2020), a viticultura brasileira compreende uma área de aproximadamente 78 mil hectares e produção estimada em 1.445.705 t (IBGE, 2020; MELLO, 2019). Os principais estados produtores são o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás, Espírito Santo, Pernambuco e Bahia (IBRAVIN, 2017). No Brasil, a região Sul é a principal produtora de uva, em 2019 correspondeu por 53,53% da produção nacional, sendo o Rio Grande do Sul o principal estado produtor, responsável por 62,72% da área de vitícola nacional. O estado é responsável por cerca de 90% da produção de uvas para processamento e 85% dos espumantes produzidos no país, a produção concentra-se no grupo de uvas americanas e híbridas, contribuído para que o Brasil esteja em 13º no ranking de maior produtor de vinho do mundo, segundo o Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN, 2019; MELLO, 2019).

A região Nordeste é a segunda maior produtora do país e a primeira colocada na produção de uvas de mesa. Em 2019, a região contribuiu com 34,46% da produção nacional, sendo seus principais produtores Pernambuco e Bahia apresentando áreas cultivadas de 8.256 ha e 2.069 ha, respectivamente. O Nordeste concentra sua viticultura na região do Vale do São Francisco (VSF), com 13,85% da área vitícola

nacional (EMBRAPA, 2019) No VSF é possível obter no mínimo, duas safras e meia ao ano, mantendo assim a produção durante todo o ano, constituindo como um grande atrativo para investimentos, sendo caso único no mundo de uma vitivinicultura tropical (GAMA, 2020).

A viticultura no VSF possui grande importância social, econômica e cultural, pois envolve um grande volume anual de negócios, pesquisas e geração de empregos de forma direta e indireta. Além disso, a disponibilidade de recursos naturais (solo, água e radiação solar) e os investimentos públicos e privados nos projetos de irrigação na região tem permitido o desenvolvimento de um importante e competitivo polo frutícola, voltado à exportação de frutas *in natura* principalmente para o mercado europeu e americano (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2019/2020).

No entanto, o ataque de microrganismos patogênicos afeta a produtividade da cultura, acarretando perdas significativas de produção. No VSF a cultura é afetada principalmente pela incidência expressiva do cancro bacteriano, causado pela bactéria *X. citri pv. viticola*, considerada a principal doença que afeta a cultura na região (BARBOSA et al., 2016; MALAVOLTA et al., 2003).

2.2 Cultivar Red Globe e o Híbrido IAC-572

A cultivar Red Globe é proveniente do cruzamento de dois híbridos (Hunisa x Emperor) x (Hunisa x Emperor x Nocera), é uma das variedades mais cultivadas na região do VSF por sua capacidade de conservação, resistência ao rachamento em períodos de chuva, alta produtividade e boa aceitação no mercado devido às características morfológicas favoráveis como cachos e bagas grandes, polpa carnuda e sabor neutro. No entanto, a cultivar é altamente susceptível ao cancro bacteriano da videira (EMBRAPA UVA E VINHO, 2018).

O híbrido IAC-572 'Jales' resultante do cruzamento do porta-enxerto 101-14 MGT (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*) com a espécie *Vitis caribaea* é um dos porta-enxertos mais utilizados em regiões produtoras de uvas de mesa devido à sua capacidade de adaptação, bom índice de pegamento e resistência a diversas pragas e doenças como a antracnose, míldio, fusariose e nematoides, sendo considerado uma das poucas fontes moderadamente resistente contra o cancro bacteriano da videira (EMBRAPA UVA E VINHO, 2018).

No entanto, até o momento não há estudos que comprovem o conhecimento sobre

qualquer fonte de resistência para o cancro bacteriano e todas as cultivares testadas apresentaram alta sensibilidade, diferindo apenas no nível de severidade da doença (LOPES; NASCIMENTO, 2004), apesar do híbrido ser uma fonte de resistência contra a bactéria *X. citri* não impede a ocorrência da doença na cultura. Ressaltando que o problema ainda precisa ser solucionado (NASCIMENTO et al., 2006), e o entendimento dos efeitos da interação patogênica entre a videira e a bactéria *X. citri* é de grande importância, principalmente para o melhor manejo de práticas agrícolas na cultura contra a doença, além de ser útil em programas de melhoramento genético vegetal (OLIVEIRA., 2019).

2.3 Cancro bacteriano da videira: origem, ocorrência, disseminação, sintomas e controle

O cancro bacteriano da videira foi observado pela primeira vez no Brasil em 1998, ocorrendo na região de Petrolina, Estado de Pernambuco, e de acordo com Trindade et al. (2005) a doença foi introduzida no Brasil a partir de material de plantio contaminado proveniente da Índia ou de outros hospedeiros vegetais como a mangueira (*Mangifera indica* L.) e nim (*Azadirachta indica* A. Juss).

A *X. citri* é uma bactéria fitopatogênica gram-negativa, com dimensões de 0,6 x 1,2 a 2,5 µm, possui um flagelo polar e metabolismo aeróbico, com colônias arredondadas brilhantes e bordas lisas (NASCIMENTO; MARIANO, 2004). As doenças fitobacterianas causadas por este gênero causam danos fisiológicos às plantas hospedeiras, o que envolve uma injeção de mais de 25 tipos de proteínas com funções enzimáticas prejudiciais as células vegetais (KAY; BONAS, 2009). A bactéria sobrevive cerca de 80 dias em tecidos de órgãos aéreos de plantas infectadas da videira, disseminando-se a partir de mudas e bacelos infectados em condições de alta umidade e temperatura (SILVA et al., 2012; NAUE et al., 2014). Considerada uma praga de grande impacto na produção de videiras no Nordeste do Brasil, principalmente nos estados da Bahia, Ceará e Pernambuco, ocasionando perdas significativas na produção de algumas variedades cultivadas como Red Globe, Itália, Rubi, Benitaka, Patrícia e variedades apirênicas.

A doença é considerada uma praga quarentenária A2 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Na região do VSF a doença é uma ameaça para a economia segundo a legislação fitossanitária (RODRIGUES NETO, et al., 2011; NAUE et al., 2014). A rápida expansão da viticultura na região proporcionou o agravamento da doença (NAUE et al., 2014). Dentre as cultivares de videiras suscetíveis ao cancro bacteriano a

cultivar 'Red Globe' foi a primeira a ser detectada com a doença e se mostra mais susceptível em relação a outras cultivares com incidência expressiva em todos os parreirais (NAUE et al., 2014).

A disseminação ocorre pelo uso de ferramentas e materiais infectados utilizados nas operações de campo e através de mudas ou bacelos infectados, que irão originar plantas doentes (ARAUJO, 2001; LOPES; NASCIMENTO, 2004). Depois de infectadas as folhas apresentam sintomas como manchas escuras, angulares, pequenas lesões necróticas (Figura 1A), com ou sem halos amarelados, e crestamento foliar o que causa a morte de extensas áreas do limbo foliar e consequente redução da área fotossintética da planta (NAUE et al., 2014). Nas nervuras e pecíolos aparecem manchas escuras, alongadas e irregulares que evoluem para fissuras longitudinais de coloração negra, conhecidas como cancro. Nos ramos, presencia-se a formação de cancrios e rachaduras longitudinais, fissuras e fendas necróticas (Figura 1B). Nas bagas, ocorre a formação de lesões escuras arredondadas, normalmente com os bordos mais salientes, semelhantes a necrótico (Figura 1C) (EMBRAPA, 2015).



Figura 1-Sintomas característicos da videira infectada pela *X. citri* em tecido. A) Pontos necróticos na folha, B) Manchas escuras longitudinais nos pecíolos e ramos, C) Lesões escuras e arredondadas nas bagas (Embrapa, 2015).

A doença é sistêmica e facilmente disseminada, o que dificulta o manejo de controle, que é atualmente realizado através das práticas culturais como, uso de variedades tolerantes e aplicação de fungicidas a base de cobre (MARQUES et al., 2009; LIMA et al., 2016). No entanto, o uso do controle químico é ineficiente como os fungicidas a base de cobre, devido a bactéria apresentar níveis significativos de tolerância as substâncias cúpricas (MARQUES et al., 2009). As medidas preventivas são as mais recomendadas, como o manejo da poda em ramos doentes, eliminação de plantas severamente atacadas, desinfestação de ferramentas de poda, desbaste e raleio, queima de restos de cultura e a poda de produção antes do período chuvoso (LOPES; NASCIMENTO, 2004).

2.4 Mecanismos de defesa vegetal

As plantas são organismos sésseis e estão constantemente submetidas a estresses, sendo afetadas por fatores bióticos e abióticos, como oscilações de temperatura, umidade do ar, radiação solar e ataque de patógenos. Apesar de não possuírem um sistema imune adaptativo semelhante aos animais, as plantas modularam um elaborado sistema de defesa resistente contra infecções patogênicas em seus tecidos para superar esses estresses e retornar ao seu metabolismo normal (SOARES, 2007; DEBONA, 2018). A linha de frente do sistema de defesa da planta consiste em barreiras físicas e químicas e com um elaborado sistema de vigilância em cada compartimento celular no qual moléculas operam para ativar respostas de defesa local e com capacidade de sinalização sistêmica a partir do sítio de infecção pelo patógeno (JONES; DANGL, 2006).

Os mecanismos de defesa vegetal podem ser constituintes morfofisiológicos inatos da planta ou serem produzidos (induzidos), e são divididos em mecanismos estruturais e bioquímicos, podendo atuar antes (barreiras pré-formadas) ou depois (barreiras pós-formadas) da interação planta- patógeno (FREEMAN; BEATTIE, 2008). Os mecanismos estruturais pré-formados são os tricomas, cutículas, estômatos e vasos condutores. Já os pós-formados atuam na biossíntese de lignina, formação de papilas, halos, camadas de cortiça, camadas de abscisão e tiloses, que estão presentes antes da infecção, dificultando dessa forma, a penetração do patógeno no hospedeiro (BOWLES, 1990; CHISHOLM et al., 2006, STANGARLIN et al., 2011).

Antes do seu estabelecimento nas plantas, os microrganismos precisam ultrapassar as barreiras bioquímicas, que são compostos produzidos pelas plantas como os metabólitos secundários e maior parte desses metabolitos são derivados das rotas dos isoprenóides, fenilpropanóides, alcalóides ou ácidos graxos/policetídeos muitos dos quais podem atuar como compostos antimicrobianos (DIXON, 2001). Divididos em mecanismos bioquímicos pré-formados, como fenóis, alcaloides, quitinases, β -1,3 glucanases, e peroxidases que podem tornar alguns órgãos vegetais altamente tóxicos aos patógenos (SHEWRY; LUCAS, 1997; WIT, 2007) e bioquímicos pós-formados, incluindo algumas classes de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR) e as fitoalexinas.

2.5 Fitoalexinas

Fitoalexinas são fatores bioquímicos pós-formados, consideradas compostos de defesa dos vegetais com atividade antimicrobiana, presentes em baixos níveis antes da infecção ou ausentes. São metabólitos secundários de baixo peso molecular e acumulam-se nas células dos vegetais após serem sintetizados (induzidas) pelas plantas em resposta a estresses bióticos e abióticos e seu grau de expressão está relacionado com o agente indutor utilizado (ASCHOLATI, 2011; DEBONA, 2018; MAZARO, 2008; MELO et al., 2017).

Os estresses bióticos incluem patógenos biotróficos ou necrotróficos como bactérias, fungos, oomicetos e vírus. Os abióticos como a radiação UV-B e UV-C, compostos químicos e metais pesados (DEBONA; RODRIGUES.,2018). Com a interação planta/patógeno e consequentemente o reconhecimento de substâncias derivadas do patógeno como – PAMPs, as fitoalexinas agem sobre os microrganismos induzindo a granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas extracelulares microbianas (MAZARO et al 2008).

As fitoalexinas estão presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo ativadas diante da presença do patógeno (GARCION et al., 2007; SOARES, 2007). Apresentam atividade antimicrobiana contra uma gama de microrganismos, sendo, portanto, um importante ator do repertório de defesas da planta (AHUJA et al., 2012; GONZÁLES-LAMOTHE et al., 2009; JEANDET et al., 2014; PIASECKA et al., 2015).

O modo de ação das fitoalexinas é bastante variável. Por exemplo, para a camalexina – uma das fitoalexinas que é mais conhecida – os microrganismos sensíveis apresentaram danos na membrana celular (fungo e bactéria), redução na permeabilidade da parede celular (fungo), comprometimento na dobragem de proteínas no retículo endoplasmático (fungo) e indução da morte programada da célula (fungo) (AHUJA et al., 2012). No caso de estresse biótico, a indução da produção de fitoalexinas pode ser desencadeada pelo reconhecimento pela planta da presença de um patógeno adaptado.

Existem uma diversidade de fitoalexinas e mais de 300 tipos já foram caracterizados em diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas, diterpenos, flavonóides, luteolinidina, apigenidina e apigeninidina (CAVALCANTI et al., 2005). A primeira fitoalexina a ser caracterizada quimicamente foi a pisatina, isolada de ervilha (*Pisum sativum*) infectada pelo fungo *Sclerotinia fructicola* (AHUJA et al., 2012; BRAGA., 2007). Desde sua descoberta, diversas fitoalexinas foram descritas em mais de 20 famílias

botânicas, incluindo as famílias Brassicaceae, Fabaceae, Solanaceae, Poaceae e Vitaceae (STANGARLIN., 2010).

As fitoalexinas são produzidas a partir de vias metabólicas que podem ser separadas em alcalóides, isoprenóides (terpenóides) e fenilpropanóides (NUGROHO, 2002; IRITI, 2009) (Figura 2). Os alcalóides são formados nas vias do ciclo do ácido cítrico ou shiquimato a partir de várias enzimas do P450, usando o triptofano como precursor. Os isoprenóides são formados a partir de isopentenil difosfato e seu isômero dimetil difosfato cuja síntese envolve as rotas do metileritritol fosfato nos plastídios ou ácido mevalônico no citosol.

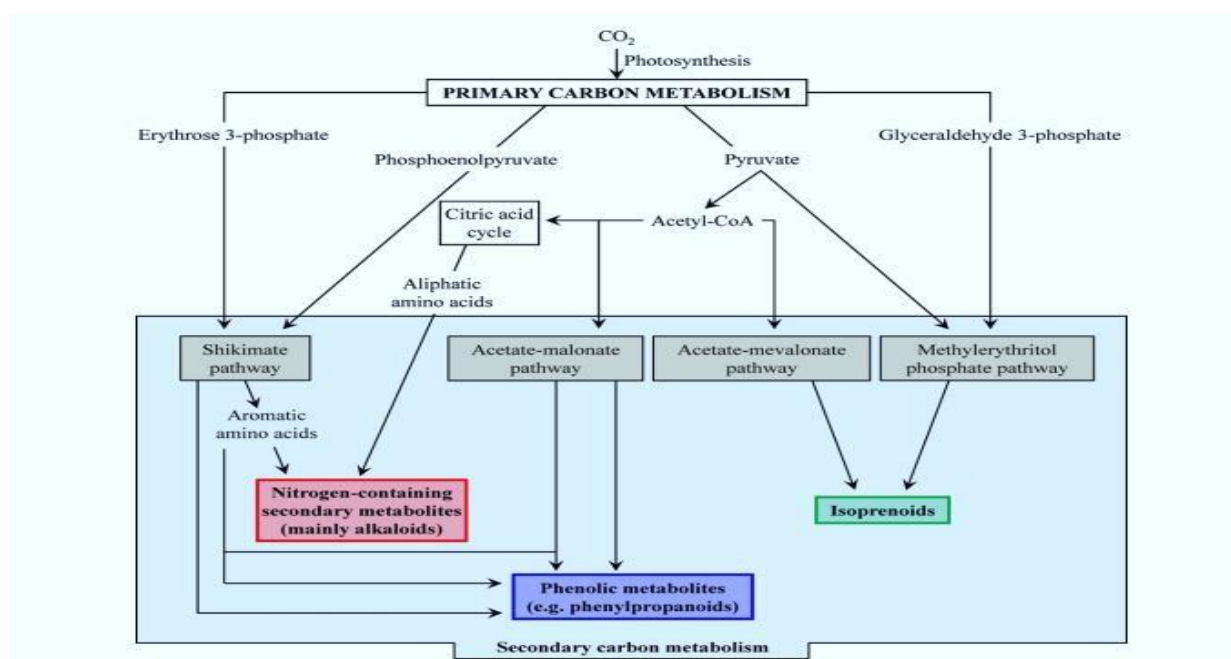


Figura 2-Rotas biossintéticas e metabólitos da formação de fitoalexinas. Adaptado de Großkinsky et al., (2012).

A biossíntese dos metabólitos fenilpropanóides é realizada pela conversão do aminoácido aromático fenilalanina ao ácido cinâmico pela fenilalanina amônialiase na via do ácido shiquímico. A síntese das diferentes classes de fitoalexinas dependem dos precursores basais ou enzimáticos e conversões ao longo das vias específicas (GROßKINSKY et al., 2012).

As fitoalexinas da família Vitaceae são fontes de estudos, tanto por sua atividade biológica de defesa nas plantas quanto por sua farmacologia. As classes de fitoalexinas da videira fazem parte de um grupo restrito de metabólitos secundários pertencentes à família estilbene, formado por compostos naturais dos vegetais que apresentam grande diversidade estrutural e pertencem a rota dos fenilpropanóides, considerado como o grupo de fitoalexinas mais importante da videira

(TROPF, 1994).

Dentre os compostos estilbênicos, o trans-resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-trans estilbeno) é o mais estudado devido as suas propriedades antioxidantes, imunomoduladoras, anti-inflamatórias e por seus benefícios a saúde como, quimioprevenção ou cardioproteção do câncer, além de sua defesa frente a doenças fitopatogênicas, funcionando como um composto antimicrobiano nos vegetais. Sendo o principal estilbeno encontrado na videira juntamente com compostos derivados de sua modificação, como os piceídeos (cis-trans-piceídeos) e pterostilbenos (*trans* -3,5- dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno) (DUBROVINA, 2017; KALANTARI, 2010; PANGENI et al., 2014; WEIS KIRCHEN E WEISKIRCHEN, 2016; DELBONA, 2018; GATTO, 2008).

Na natureza, o resveratrol é sintetizado através da caracterizada via fenilalanina/polimalonato, cuja última etapa é catalisada pela estilbeno sintase (STS), que são os genes envolvidos na sua biossíntese, enquanto o pterostilbeno, que é um análogo do resveratrol considerado também como um potente fitoquímico, é metilado a partir do resveratrol pelos genes resveratrol O-metiltransferase (ROMT).

Estudos demonstraram que genes envolvidos na biossíntese de estilbeno (STS) estão envolvidos na resposta de defesa da videira contra *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola* (PEZET et al., 2003; GINDRO et al., 2006) e *Uncinula necator* (FUNG et al., 2008; SCHNEE et al., 2008). Por sua vez, os ROMT são induzidos por infecções ocasionadas por *E. necator* em *V. pseudoreticulata* 'Baihe-35-1' e já foram identificados e caracterizados em folhas de *Vitis vinifera* Chardonnay e Gamay infectadas (LANGCAKE et al., 1979; ADRIAN et al., 2000).

O conhecimento da modulação dos mecanismos biossintéticos de fitoalexinas como a caracterização dos genes estilbenos sintases (STS) e o resveratrol O- metiltransferase (ROMT) podem viabilizar o emprego de técnicas de biotecnologia vegetal visando resistência a doenças, como no caso da videira que é acometida pela *X. citri* pv. *vitícola* (DEBONA, 2018), gerando vários problemas fitossanitários, acarretando perdas significativas de produtividade.

2.6. Bioinformática aplicada as ômicas

No século 20, os geneticistas e químicos questionavam-se sobre a natureza química do material genético. Com a descoberta do código genético e das estruturas poliméricas (ácidos nucleicos e proteínas), essas biomoléculas passaram a constituir os principais estudos da

Biologia Molecular e logo surgiram os métodos de sequenciamento, como os sequenciadores automáticos, que geram uma grande quantidade de dados para serem analisados, o que exigiu recursos computacionais eficientes, dando início a Bioinformática. Caracterizada como uma ciência interdisciplinar interligada a outras áreas do conhecimento, a Bioinformática abrange a engenharia de *softwares*, Estatística, Ciência da computação e a Biologia Molecular (PROSDOCIMI et al., 2002).

A Bioinformática tem como base unir a Biologia e a Ciência da computação através do desenvolvimento de ferramentas computacionais capazes de promover a análise e interpretação de diversos problemas biológicos (ATTWOOD et al., 2011; LUSCOMBE et al., 2001; PEVSNER., 2015). Diante disso, se faz uso de ferramentas computacionais para auxiliar em diversas análises *in silico* de sequências biológicas (Tabela 1).

Tabela 1- Principais ferramentas utilizadas em análises de Bioinformática.

FERRAMENTAS	FUNÇÃO	REFERÊNCIA
BLAST	Alinhamento local	ALTSCHUL et al., (1990)
CD-Search	Domínio conservados	MARCHLER-BAUER; BRYANT (2004)
ProtParam	Parâmetros físico-químicos	GASTEIGER et al., (2005)
JPred4	Predição da estrutura Secundária	DROZDETSKIY et al., (2015)
SWISS-MODEL	Predição da estrutura terciária	ARNOLD et al., (2006)
MEGA	Análise genética e evolutiva	KUMAR;STECHER; TAMURA (2016)
AgriGO	Anotação funcional	CONESA et al., (2005)

Em decorrência da grande quantidade de dados gerados, surgiu a necessidade de criação de bancos de dados eficazes para armazenamento de sequências nucleotídicas, aminoacídicas e proteicas (ESPINDOLA et al., 2010; VASCONCELOS; ALMEIDA, 2014), como o GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), que é um banco de dados público criado pelo Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*) para fornecer e incentivar o acesso e o uso irrestrito das informações pela comunidade científica.

Com o advento do genoma humano e consequentemente a grande quantidade de dados gerados se iniciava uma nova era da Biologia, a “era pós-genômica” com o surgimento das ômicas, possibilitada com o desenvolvimento da Bioinformática (ESPINDOLA et al., 2010). O termo “ômicas” refere-se à análise global dos sistemas

biológicos, são usualmente divididas em genômica (genes), proteômica (proteínas), transcriptômica (transcritos), metabolômica (metabólitos), entre outras, possibilitando diversas abordagens biotecnológicas, inclusive para o melhoramento genético de plantas visando à resistência contra doenças (BENKO-ISEPPON et al., 2017; ESPINDOLA et al., 2010).

Nesse sentido, o objetivo das abordagens “ômicas” é adquirir uma compreensão abrangente e integrada dos processos biológicos, a fim de identificar as diferentes moléculas (genes, RNAs, proteínas e metabólitos) em vez de cada uma delas individualmente (LAY et al., 2006).

2.7. Transcriptoma e o sequenciamento do RNA (RNA-Seq)

Transcriptoma é o conjunto de todos os transcritos (RNAs) de uma célula, tecido ou organismo, em um estágio de desenvolvimento específico ou uma condição fisiológica, como condições de estresse. O estudo do transcriptoma tem como objetivos, identificar tipos de transcritos; quantificando os níveis de expressão de cada transcrito em condições diferentes; determinar a estrutura transcricional dos genes e quantificar as mudanças nos níveis de expressão de cada transcrito durante o desenvolvimento ou sob determinada condição (WANG et al. 2009).

A tecnologia de RNA-Seq (sequenciamento de RNA) é uma das ferramentas transcriptômicas caracterizada pela conversão de RNAs mensageiros (mRNAs) em uma biblioteca de fragmentos de DNA complementar (cDNA), de forma que cada molécula pode ser sequenciada por um sequenciador de nova geração (plataformas) gerando pequenas sequências (*reads*) com tamanhos variando entre 21 e 500 pb (WANG et al., 2009).

Assim, após a normalização, que é a padronização dos dados obtidos, quanto maior a contagem de *reads* correspondentes a um determinado gene em certa condição experimental (tratamento), maior a sua expressão (Figura 3). Dessa forma, associada a ferramentas de bioinformática, a técnica é utilizada para identificar genes diferencialmente expressos, transcritos raros, análise de genes desconhecidos e novas isoformas de transcrição. Portanto, o sequenciamento de mRNA em plataformas de sequenciamento de nova geração se tornou uma ferramenta importante, auxiliando na busca de genes responsáveis por caracteres de interesse (AMARAL., 2015).

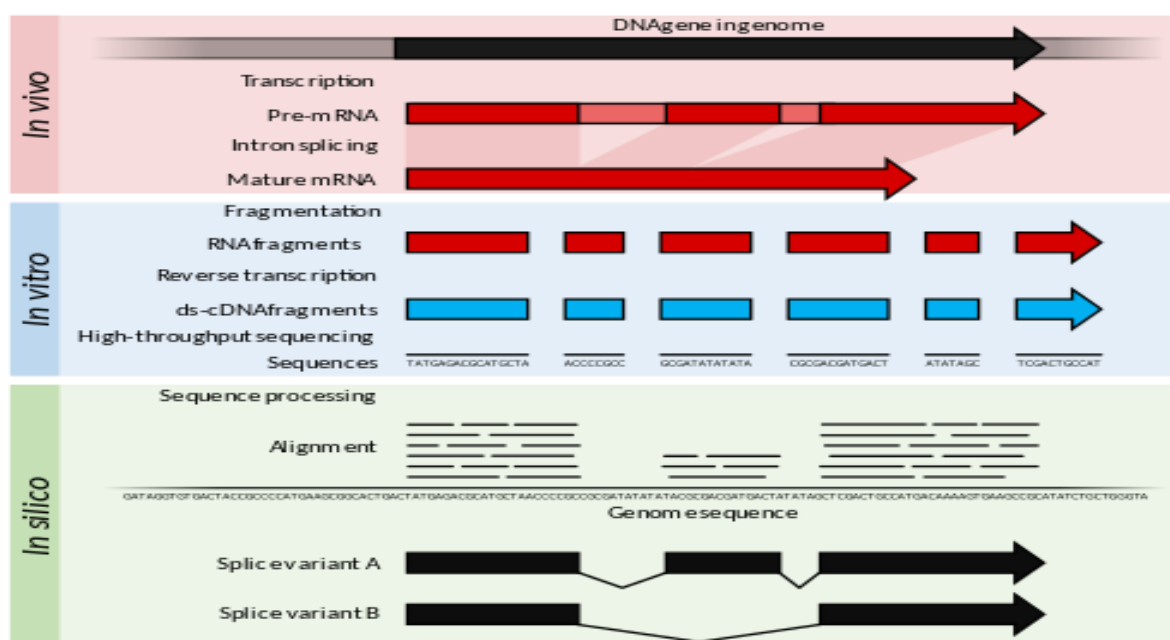


Figura 3- Técnica RNA-Seq. Adaptado de Lowe (2017).

Além disso, a tecnologia pode obter dados que compreendem os mecanismos de interação planta-patógeno, permitindo avanços no desenvolvimento de estratégias moleculares para o aumento da resistência de plantas (MOCHIDA; SHINOZAKI, 2010), podendo ser empregada em estudos de expressão gênica em diversas culturas de importância agronômica, como em soja (ZENG et al., 2018), arroz (TONI et al., 2017), videira (SHANGGUAN et al., 2017), entre outras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIAN, M.; JEANDET, P.; DOUILLET-BREUIL, A.C.; TESSON, L.; BESSIS, R. (2000). Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *Journal Agriculture. Food Chemistry.*, 48,6103–6105.
- AMARAL, R. T. D. (2015). Número de repetições na identificação de genes diferencialmente expressos em experimentos de RNA-Seq.
- ARAÚJO, N. D. DE FARIAS, R. P.; PEREIRA, P. B.; DE FIGUEIRÊDO, F. M.; DE MORAIS, A. M. B.; SALDANHA, L. C.; GABRIEL, J. E. (2008). A Era da Bioinformática: Seu Potencial e suas Aplicações para as Ciências da Saúde. *Estudos de Biologia*, [S.l.], 30(70/72).
- ARÚS, B. A., SOUZA, D. G., BELLAVER, B., SOUZA, D. O., GONÇALVES, C. A., QUINCOZES-SANTOS, A., BOBERMIN, L. D. (2017). Resveratrol modulates gsh system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 428, 67–77.
- BARBOSA, M.; RIBEIRO, P.; BATISTA, D. (2016). Manejo do cancro bacteriano da videira no Vale do São Francisco. *Estado da arte em fitobacterioses tropicais*. p. 229-242.
- BAVARESCO, L.; VEZZULLI, S.; BATTILANI, P.; GIORNI, P.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T. (2003). Effect of ochratoxinA-producing *Aspergilli* on stilbenic phytoalexin synthesis in grapes. *Journal Agriculture Food Chemistry.*, 51, 6151–6157.
- BÉZIER, A.; LAMBERT, B.; BAILLIEUL, F. (2002). Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol*, 108, 111–120.
- BRAGA, M.R. (2007). *Fitoalexinas e a defesa das plantas*. Acesso em 20/10/2021. Online. Disponível na Internet: [www.sbgq.org.br/ PN-NET/texto5/defesa.htm](http://www.sbgq.org.br/PN-NET/texto5/defesa.htm).
- CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). (2005). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. Piracicaba: FEALQ, p.81-124.
- CHNEE, S; VIRET, O; GINDRO, K. (2008). Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiol Mol Plant Pathol* 72:128–133.
- GROßKINSKY, D. K.; VAN DER GRAAFF, E.; ROITSCH, T. (2012). Phytoalexin transgenics in crop protection—fairly tale with a happy end?. *Plant Science*, 195, 54-70.
- DUBROVINA, A. S.; KISELEV, K.V. (2017). Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta* , 246(4):597–623.
- EMBRAPA UVA E VINHO. *Cultivares de Uva e Porta-Enxertos de Alta Sanidade*. 2018. Disponível em. <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/MesaNorteParana/cultivares.htm#copa>>.

- ESPINDOLA, F. S.; CALÁBRIA, L. K.; REZENDE, A. A. A. D.; PEREIRA, B. B.; SANTANA, F. A.; AMARAL, I. M. R.; ARAÚJO, T. G. D. (2010). Recursos de bioinformática aplicados às ciências ômicas comogenômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica. *Bioscience Journal*, 26,(3), 463-477.
- GATTO, P.; VRHOVSEK, U.; MUTH, J.; SEGALA, C.; ROMUALDI, C.; FONTANA, P.; PRUEAFER, D.; STEFANINI, M.; MOSER, C.; MATTIVI, F.; VELASCO, R. (2008). Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(24), 11773-11785.
- GAZZOLA, R.; GRÜNDLING, R. D. P.; ARAGÃO, A. A. (2020). Production and International Trade of Grapes. *Revista Brasileira de Agrotecnologia* - ISSN 2317-3114 - 10,(03), 68-74.
- HEATH, M. C. (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 315-319.
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; SBAGHI, M.; MEUNIER, P. (1995). Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to Botrytis attack under natural conditions. *Journal of Phytopathology*. 143, 135–139.
- KAY, S.; BONAS, ULLA. (2009). How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant. *Current Opinion in Microbiology*, v.43, p.12-37.
- KONRAD, O.; CECHIN, M.; HASAN, C.; PEITE, M. R.; CORNELLI, J.F.; GUERRINI, F.. (2020). Análise quantitativa e qualitativa de biogás: Estudo utilizando resíduos orgânicos de vinícola. *Revista Brasileira de Vitícola e Enologia*, 12, 68-75.
- NUGROHO, L. H.; VERPOORTE, R. (2002). Secondary metabolism in tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68, 105-125.
- LAY J.R; J. O.; LIYANAGE, R.; BORGMANN, S.; WILKINS, C. L. (2006). Problems with the “omics”. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(11), 1046-1056.
- LIMA, M. A. G.; PEIXOTO, P. R.; BORGES., I. V.; SILVA, M. S.; BARBOSA, M. A. G.; CALVACANTI, L. S.. (2016). Induction of resistance to Xanthomonas campestris pv. viticola IN GRAPEVINE PLANTS., *Revista Brasileira de Fruticultura*., 39, (2): (e-669).
- LOPES, D. B. L.; NASCIMENTO, ANA ROSA P. Situação atual do cancro bacteriano da videira no Semiárido Nordeste. *Seminário novas perspectivas para o cultivo da uva sem sementes*. EMBRAPA semiárido, documento, v. 185, 2004.
- MALAVOLTA JUNIOR, V.A. et al. Resistência de variedades de videira a Xanthomonas Campestris pv. viticola. *Arquivos do Instituto Biológico*. v.70, n.3, p.373-376, set, 2003.
- MARTIN, N.; VESENTINI, D.; REGO, C.; MONTEIRO, S.; OLIVEIRA, H.; FERREIRA, R. B. (2009). Phaeomoniella chlamydospora infection induces changes in phenolic compounds content in Vitis vinifera. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), 101-116.
- MARQUES, E.; UESUGI, C.H.; FERREIRA, M.A.S.V. (2009). Sensitivity to copper in Xanthomonascampestris pv. Viticola. *Tropical Plant Pathology*, 34(6): 406-11.

- MAZARO, S. M.; CITADIN, I.; GOUVÊA, A.; LUCKMANN, D.; GUIMARÃES, S. S. (2008). Induction of phytoalexins in cotyledons of soybean in response to the derivatives of leaf surinan cherry. *Ciência Rural*, 38(7), 1824-1829.
- MELLO., L. M. R.; MACHADO., C. A. E.; *Vitivinicultura brasileira: panorama 2019.*, Bento Gonçalves, RS. 2019.
- MELO, T.A.; ARAÚJO, M.U.P.; SERRA, I.M.R.S.; PASCHOLATI, S.F. (2017). Produtos naturais disponíveis comercialmente induzem o acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo. *Summa Phytopathologica*, 43(3),.205-211.
- MOCHIDA, K.; SHINOZAKI, K. (2010). Genomics and bioinformatics resources for crop improvement. *Plant and Cell Physiology*, 51(4), 497-523.
- NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.(2004). Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. *Ciência Rural*, 34(1).
- NASCIMENTO, A.R.P.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R de L.R.; GOMES, A.M.A. (2005). Elaboração e validação de escala diagramática para o cancro bacteriano da videira. *Summa Phytopathologica*, 31:59-64.
- NAUE, C.R.; BARBOSA, M.A.G.; BATISTA, D da C.; SOUZA, E.B de.; MARIANO, R de L.R. (2014). Efeito do tratamento de bacelos de videira “Red Globe” no controle do cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *vitícola*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36, (4), 853-61.
- OLIVEIRA., M.F.; *Caracterização estrutural e expressão diferencial de defensinas e tlps (thaumatin-like proteins) em vitis spp. Sob estresse biótico*. Dissertação. 2019. P. 35.
- PEIXOTO, A. R. N.; RAMOS., R. L. Ma.(2004). Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. *Ciência Rural*, 34(1), 301- 307.
- PEREIRA, A.M.S.; FERRO, D. PLANTAS MEDICINAIS. *In: 8º Encontro de estudos avançados em plantas medicinais*, Monografia. Araxá, 2008. p.152.
- RIVIERE, C.; PAWLUS, A. D.; MERILLON, J. M. (2012). Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural product reports*, 29(11), 1317-1333.
- RODRIGUES NETO, J., DESTÉFANO, S. A., RODRIGUES, L. M., PELLOSO, D. S., & OLIVEIRA JÚNIOR, L. D. C. (2011). Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. *Tropical Plant Pathology*, 36, 42-44.
- SHANGGUAN, L.; MU, Q.; FANG, X.; ZHANG, K.; JIA, H.; LI, X.; FANG, J. (2017). RNA-sequencing reveals biological networks during table grapevine (‘Fujiminori’) fruit development. *PloS one*, 12(1), e0170571.

SILVA, D. C. *Identificação e caracterização do perfil transcricional de genes durante o desenvolvimento inicial do fruto em videira sem sementes (V. vinifera L. Cv 'Sultanina')*, 2010. 24p. Tese de Doutorado - Centro de Biotecnologia Estado do Rio Grande do Sul - Universidade Federal do Rio grande do Sul.

SOARES, A. M.S.; MACHADO, O. L. T. (2007). Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica–Ciências Agrárias e Biológicas*, 1(1), 10.

STANGARLIN, J.R.; SCHULZ, D.G.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; SCHWAN-STRADA, K.R.F.; KUHN, O.J.(2010). Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. *Arquivos do Instituto Biológico*, 77(1),:91-98.

TONI, B., MONFARED, H. H., ISA, M. N. M., ISA, N. M., ISMAIL, I., ZAINAL, Z. (2017). RNA-seq data of *Oryza sativa* cultivar Kuku Belang under PEG treatment. *Data in brief*, 14, 260-266.

TRINDADE, L. C., LIMA, M. F., FERREIRA, M. A. (2005). Molecular characterization of Brazilian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* by rep-PCR fingerprinting. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 46-54.

VANNOZZI, A., DRY, I. B., FASOLI, M., ZENONI, S., LUCCHIN, M. (2012). Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *BMC plant biology*, 12, 1-22.

VALLETTA, A., IOZIA, L. M., LEONELLI, F. (2021). Impact of environmental factors on stilbene biosynthesis. *Plants*, 10(1), 90.

VEZZULLI, S.; BATTILANI, P.; BAVARESCO, L. Stilbene-synthase gene expression after *Aspergillus carbonarius* infection in grapes. *American journal of enology and viticulture*. 2007, 58, 132–134.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for Transcriptomics. *Nature reviews genetics*, (10) 57-63.

ZENG, A.; CHEN, P.; KORTH, K. L.; PING, J.; THOMAS, J.; WU, C.; MA, J. (2019). RNA sequencing analysis of salt tolerance in soybean (*Glycine max*). *Genomics*, 111(4), 629-635.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Genômica estrutural: Identificação genômica e caracterização de genes STS e ROMT em *Vitis* spp.

Para identificação das sequências candidatas das famílias gênicas Estilbenes Sintases (STS) e Resveratrol O-metiltransferases (ROMT) foram baixados os proteomas representativos dos bancos de dados Pythozome (Vvinifera_457_v2.1.protein_primaryTranscriptOnly.faa.gz, <https://phytozome.next.jgi.doe.gov/>) e NCBI (GCF_004353265.1_EGFV_Vit.rip_1.0_protein.faa.gz, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para *V. vinifera* e *V. riparia*, respectivamente. O perfil Hidden Markov Model (HMM) do domínio específico para STS (PF00195/PF02797) e ROMT (PF00891/PF08100) foi baixado do banco de dados Pfam (Mistry *et al.*, 2020, <http://pfam.sanger.ac.uk/>), e utilizado para identificação dos genes STS e ROMT nos genomas de *Vitis* spp. através da ferramenta HMMER 3.0.

Todos os genes de saída com valor *E* padrão (<1,0) foram coletados e as sequências redundantes foram removidas. Em seguida, cada sequência proteica foi analisada com o programa Batch CD-Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) para identificação da presença e conservação dos domínios específicos para STS (Chal_sti_synt_C e Chal_sti_synt_N) e ROMT (Methyltransf_2 e Dimerisation).

3.2. Propriedades proteicas de STS e ROMT

O peso molecular (p.M.) e o ponto isoelétrico teórico (pI) das proteínas STS e ROMT foram calculados pela ferramenta Protparam 2.0 (GASTEIGER *et al.*, 2005) e a localização subcelular por meio do servidor Plant-mPLOC 2.0 (CHOU; SHEN, 2010). Os motivos conservados de STS e ROMT foram identificados por meio do programa MEME-Suit v.5.4.1 utilizando os seguintes parâmetros: número de repetições=0, número máximo de motivos = 10 e largura ótima do motivo restrita entre 6 e 15 resíduos de aminoácidos. As proteínas caracterizadas foram submetidas a uma análise de predição de estrutura secundária utilizando a ferramenta JPred4 (DROZDETSKIY *et al.*, 2015).

3.3. Localização cromossômica, duplicação e classificação fenética de STS e ROMT

As localizações cromossômicas foram extraídas dos arquivos GFF disponíveis no Phytozome v13 (*V. vinifera*, Vvinifera_457_v2.1.gene_exons.gff3.gz) e NCBI (*V. riparia*, GCF_004353265.1_EGFV_Vit.rip_1.0_genomic.gff.gz) e o software TBtools foi utilizado para projetar o mapeamento dos genes nos cromossomos. Adicionalmente, foram identificadas as estruturas gênicas dos genes STS e ROMT utilizando os arquivos GFF, citados anteriormente. A análise de duplicação gênica será realizada utilizando as ferramentas BLASTp e MCScanX, disponíveis no TBtools. As proteínas caracterizadas de STS e ROMT foram submetidas a um alinhamento múltiplo pelo ClustalW (Thompson et al., 2002) e as árvores fenéticas foram construídas usando o método *Neighbor-Joining* (NJ) pelo programa MEGAX (KUMAR et al., 2018) baseado no modelo de distância Jones-Taylor-Thornton – JTT, com valor de *bootstrap* de 1000 reamostragens.

3.4. Ensaio experimental e transcriptômica

O experimento foi conduzido na Embrapa Semiárido (Petrolina - Brasil) utilizando clones das cultivares ‘Red Globe’ e do híbrido IAC 572 [resultante de um cruzamento entre o porta-enxerto 101-14 MGT (*V. riparia* X *V. rupestris*) e *V. caribaea*], considerados susceptível e moderadamente resistente a *X. citri*, respectivamente (NASCIMENTO et al., 2006).

As plantas foram cultivadas em potes plásticos de 5L, com substrato composto por proporções iguais de solo do tipo argiloso e vermiculita, sob condições controladas [$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 5\%$ de umidade relativa; e com 12 h/dia de luz natural (*Photosynthetic Photon Flux Density* (PPFD) = 1.5×10^3 μmoles)], sendo separadas em quatro casas de vegetação distintas de acordo com os tempos estabelecidos para as coletas.

Após 30 dias de cultivo, as plantas sadias dos dois acessos foram selecionadas e divididas em dois grupos: (1) Controle - plantas inoculadas com água destilada esterilizada; (2) Tratamento - plantas inoculadas com a bactéria *X. citri* (isolado Xcv117), conforme metodologia sugerida por Gama et al. (2011). As coletas foram feitas em quatro tempos distintos após a inoculação: (1) 1,5 horas (2) 6 horas; (3) 24 horas e (4) 48 horas após a inoculação. O tecido foliar foi coletado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer à -80°C para a extração do RNA total e confecção das bibliotecas de RNA-seq via sequenciamento HiSeq2500 (Illumina).

3.5. Extração de RNA, síntese de cDNA, construção das bibliotecas de RNA-seq e sequenciamento

O RNA total foi extraído segundo protocolo associado entre o método CTAB Acetato (Zhao et al., 2012) e o Kit SV Total RNA Isolation System (Promega), utilizando aproximadamente 200 mg de tecido foliar e tratamento com DNase. A concentração, pureza e integridade das amostras foram verificadas via fluorímetro Qubit (Life Technologies), espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific) e Bioanalyser (Agilent Technologies), respectivamente.

A construção das bibliotecas de RNA-Seq e sequenciamento foram realizadas no Centro de Genômica Funcional ESALQ/USP a partir da plataforma V4 2 X 100 HiSeq2500 (Illumina), utilizando amostras de RNA dos dois acessos no tempo de 90 minutos. A síntese de cDNA foi realizada com o kit GoScript Reverse Transcription System (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. A montagem do transcriptoma foi feita pelo programa Trinity (Grabherr et al., 2011) e a análise estatística dos genes diferencialmente expressos através do programa Edge-R (Robinson et al., 2010).

4. RESULTADOS

4.1. Identificação e caracterização dos genes STS e ROMT de *V. vinifera* e *V. riparia*

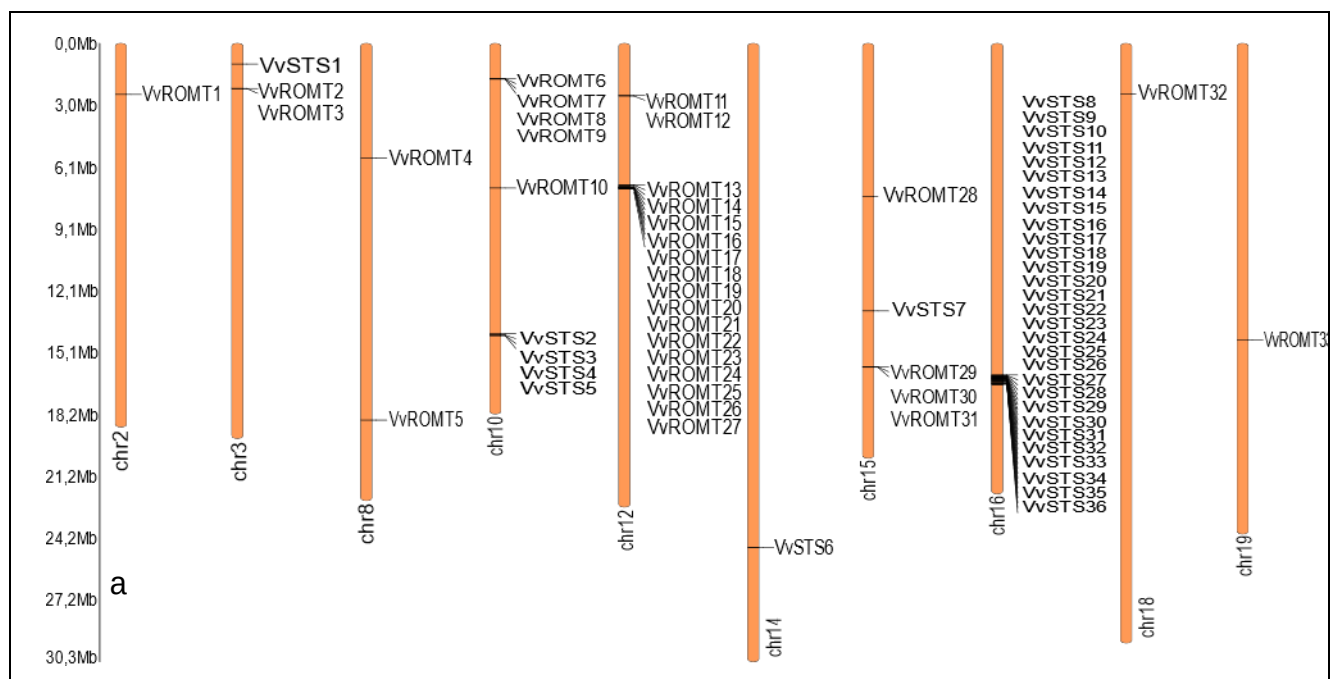
Após a identificação dos domínios HMM para STS e ROMT e remoção das sequências redundantes, foram obtidas 36 VvSTS, 53 VrSTS (Tabela 2), 33 VvROMT e 31 VrROMT (Tabela 3) únicas. A análise de domínio das sequências obtidas confirmou a presença do domínio catalítico específico para cada família gênica (STS: Chal_sti_synt_C/Chal_sti_synt_N e ROMT: Methyltransf/Dimerisation).

4.2. Localização cromossômica dos genes STS e ROMT

A análise de localização cromossômica demonstrou que os genes STS e ROMT

estão distribuídos ao longo dos cromossomos de *V. vinifera* e *V. riparia*. Os genes codificadores STS ancoraram em cinco e seis cromossomos (chr) de *V. vinifera* e *V. riparia*, respectivamente (Figura 6A e 6B). O chr16 foi o mais representativo em ambas as espécies, reunindo 19 genes VvSTS e 49 VrSTS. Por sua vez, o chr10 continha quatro e seis genes VvSTS e VrSTS, com os demais genes STS apresentando uma ou duas cópias nos cromossomos de *V. vinifera* (Vvchr3, Vvchr14 e Vvchr15) e *V. riparia* (Vrchr3, Vrchr5, Vrchr14 e Vrchr15).

Os genes ROMT estavam distribuídos em oito e nove cromossomos sendo abundantes em três cromossomos de *V. vinifera* (Vvchr15, Vvchr10 e Vvchr12) apresentando quatro, cinco e 17 genes ROMTs, e quatro cromossomos de *V. riparia* (Vrchr3, Vrchr17, Vrchr15 e Vrchr12) com três, três, cinco e 12 genes ROMT, respectivamente (Figura 6A e 6B). Os demais genes associados aos cromossomos de *V. vinifera* (chr2, chr3, chr8, chr18 e chr19) e *V. riparia* (chr2, chr8, chr16, chr18 e chr19) apresentam uma ou duas cópias de ROMT.



b

Figura 4-Distribuição dos genes STS e ROMT nos cromossomos de a) *Vitis vinifera* e b)

4.3. Características físico-química e localização subcelular

As características físico-químicas de STS (Tabela 2) e ROMT (Tabela 3) de ambas as espécies de *Vitis vinifera* demonstraram que as proteínas candidatas apresentaram uma predominância de pH ácido, com exceção de duas proteínas de *V. vinifera* (VvSTS9 e VvSTS23) e uma proteína de *V. riparia* (VrSTS20) que apresentaram pH básico.

De forma geral, o ponto isoelétrico (pI) das sequências STS e ROMT demonstraram uma exígua faixa de pH, com os membros de STS variando de 5,83 (VvSTS1) a 6,84 (VvSTS3) para *V. vinifera* e de 4,76 (VrSTS46) a 6,80 (VrSTS45) para *V. riparia*. Por sua vez, as proteínas de ROMT variaram de 5,13 (VvROMT23) a 6,49 (VvROMT4) para *V. vinifera* e de 5,22 (VrROMT2) a 6,05 (VrROMT22) para *Vitis riparia* (Tabelas 2 e 3).

O comprimento e o peso molecular (pM) das sequências exibiram uma variação de 168 aa e 18,50 kDa (VvROMT23) a 395 aa e 43,52 kDa (VvROMT30) para *V. vinifera* e de 332 aa e 36,96 kDa (VrROMT6) a 385 aa e 41,89 kDa (VrROMT25) para *V. riparia*. Todas as proteínas STS e ROMT de ambas as espécies apresentaram localização subcelular associadas ao citoplasma (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2- Família de genes STS em *V. vinifera* e *V. riparia*

GENES	ID	AA	PM	PI	LOC. CROMO	EXO/IN T	LOC. SUB
VvSTS1	VIT_203s0038g01 460	39 2	43.1 1	5.8 3	Chr3;1006320..100793 6	2:1	Citoplasm a
VvSTS2	VIT_210s0042g00 840	23 3	25.5 3	6.6 0	Chr10;14216112..1421 7200	2:1	Citoplasm a
VvSTS3	VIT_210s0042g00 910	36 6	40.6 9	6.8 4	Chr10;14284187..1428 5672	2:1	Citoplasm a
VvSTS4	VIT_210s0042g00 920	39 2	42.8 6	6.2 3	Chr10;14298957..4300 520	2:1	Citoplasm a
VvSTS5	VIT_210s0042g00 930	39 2	42.3 0	6.1 0	Chr10;14304787..1430 6350	2:1	Citoplasm a
VvSTS6	VIT_214s0068g00 920	39 3	42.9 2	6.1 0	Chr14;24673534..2468 8374	2:1	Citoplasm a
VvSTS7	VIT_215s0021g02 170	38 9	42.9 6	6.3 0	Chr15;13099195..1310 0564	2:1	Citoplasm a
VvSTS8	VIT_216s0100g00 750	39 2	42.8 5	5.9 7	Chr16;16239028..1624 0564	2:1	Citoplasm a
VvSTS9	VIT_216s0100g00 760	16 1	17.6 3	8.4 4	Chr16;16252494..1625 3565	2:1	Citoplasm a
VvSTS1 0	VIT_216s0100g00 770	39 2	42.7 8	6.0 9	Chr16;16268816..1627 0352	2:1	Citoplasm a
VvSTS1 1	VIT_216s0100g00 780	39 2	42.7 3	6.3 9	Chr16;16276570..1627 8105	2:1	Citoplasm a
VvSTS1 2	VIT_216s0100g00 810	34 4	37.4 8	6.4 1	Chr16;16289537..1629 0762	2:1	Citoplasm a
VvSTS1 3	VIT_216s0100g00 830	39 2	42.7 9	6.0 9	Chr16;16335697..1633 7233	2:1	Citoplasm a
VvSTS1 4	VIT_216s0100g00 840	39 2	42.9 7	6.5 2	Chr16;16343202..1634 4516	2:1	Citoplasm a
VvSTS1 5	VIT_216s0100g00 850	39 2	42.7 6	5.9 6	Chr16;16346580..1634 7949	2:1	Citoplasm a
VvSTS1 6	VIT_216s0100g00 860	35 6	39.1 1	6.1 0	Chr16;16350059..1635 1428	2:1	Citoplasm a
VvSTS1 7	VIT_216s0100g00 880	39 2	42.6 6	5.9 0	Chr16;16366907..1636 8410	2:1	Citoplasm a
VvSTS1 8	VIT_216s0100g00 900	39 2	42.6 3	6.0 3	Chr16;16386013..1638 7529	2:1	Citoplasm a
VvSTS1 9	VIT_216s0100g00 910	39 2	42.7 7	6.0 9	Chr16;16398234..1639 9770	2:1	Citoplasm a
VvSTS2 0	VIT_216s0100g00 920	39 2	42.9 3	6.3 3	Chr16;16405205..1640 6519	2:1	Citoplasm a
VvSTS2 1	VIT_216s0100g00 930	39 2	42.7 0	6.1 1	Chr16;16408469..1640 9837	2:1	Citoplasm a
VvSTS2 2	VIT_216s0100g00 940	39 2	42.8 1	6.2 8	Chr16;16411948..1641 3317	2:1	Citoplasm a
VvSTS2 3	VIT_216s0100g00 960	20 4	22.9 1	9.2 1	Chr16;16440652..1644 1617	2:1	Citoplasm a
VvSTS2 4	VIT_216s0100g00 990	39 2	42.7 7	6.2 3	Chr16;16467015..1646 8549	2:1	Citoplasm a
VvSTS2 5	VIT_216s0100g01 000	39 2	42.6 6	6.0 3	Chr16;16477097..1647 8613	2:1	Citoplasm a

VvSTS2 6	VIT_216s0100g01 010	39 2	42,7 6	6,2 3	Chr16;16491597..1649 3131	2:1	Citoplas ma
VvSTS2 7	VIT_216s0100g01 020	39 2	42,7 3	6,0 3	Chr16;16503636..1650 9479	2:1	Citoplas ma
VvSTS2 8	VIT_216s0100g01 040	39 2	42,8 5	5,9 0	Chr16;16511216..1651 2602	2:1	Citoplas ma
VvSTS2 9	VIT_216s0100g01 070	39 2	42,8 4	6,0 9	Chr16;1652632616527 862	2:1	Citoplas ma
VvSTS3 0	VIT_216s0100g01 100	39 2	42,9 9	6,8 0	Chr16;16555945..1655 7435	2:1	Citoplas ma
VvSTS3 1	VIT_216s0100g01 120	39 2	42,7 9	5,9 7	Chr16;16615702..1661 7258	2:1	Citoplas ma
VvSTS3 2	VIT_216s0100g01 130	42 6	46,5 1	6,0 3	Chr16;16618991..1662 4624	3:2	Citoplas ma
VvSTS3 3	VIT_216s0100g01 140	39 2	42,7 8	6,2 3	Chr16;16627536..1662 9091	2:1	Citoplas ma
VvSTS3 4	VIT_216s0100g01 150	39 2	42,8 2	6,1 0	Chr16;16644190..1664 5747	2:1	Citoplas ma
VvSTS3 5	VIT_216s0100g01 160	39 2	42,8 7	6,0 9	Chr16;16673986..1667 5524	2:1	Citoplas ma
VvSTS3 6	VIT_216s0100g01 170	39 2	42,8 4	5,9 7	Chr16;16682709..1671 1818	3:2	Citoplas ma
Cont.							

GENES	ID	AA	PM	PI	LOC. CROMO	EXO/IN T	LOC. SUB
VrSTS1	XP_034680930.1	39 2	42.1 1	5.8 3	Chr3;881414..883308	2:1	Citoplas ma
VrSTS2	XP_034686240.1	39 2	42.8 8	6.1 8	Chr5;13659049..13661 182	2:1	Citoplas ma
VrSTS3	XP_034697516.1	39 2	42.8 6	6.1 0	Chr10;3735589..37374 96	2:1	Citoplas ma
VrSTS4	XP_034698481.1	39 2	42.9 6	6.2 3	Chr10;3760164..37620 91	2:1	Citoplas ma
VrSTS5	XP_034698480.1	39 2	42.8 7	6.0 9	Chr10;3769471..37713 57	2:1	Citoplas ma
VrSTS6	XP_034698479.1	39 2	42.8 7	6.2 3	Chr10;3774249..37761 98	2:1	Citoplas ma
VrSTS7	XP_034697609.1	39 2	42.8 8	6.2 3	Chr10;3789509..37911 19	2:1	Citoplas ma
VrSTS8	XP_034697531.1	39 2	42.8 4	6.2 3	Chr10;3804760..38066 32	2:1	Citoplas ma
VrSTS9	XP_034707427.1	39 2	42.8 3	6.1 0	Chr14;5641254..56428 23	2:1	Citoplas ma
VrSTS1 0	XP_034707297.1	39 2	42.9 2	6.1 0	Chr14;5654996..56565 65	2:1	Citoplas ma
VrSTS1 1	XP_034709827.1	39 2	42.6 2	6.2 2	Chr15;7821431..78229 38	2:1	Citoplas ma
VrSTS1 2	XP_034710382.1	39 2	42.6 3	6.0 3	Chr16;3934936..39366 68	2:1	Citoplas ma
VrSTS1 3	XP_034710383.1	39 2	42.8 1	6.1 0	Chr16;3947871..39497 37	2:1	Citoplas ma
VrSTS1 4	XP_034710384.1	39 2	42.9 5	6.1 1	Chr16;3957637..39591 87	2:1	Citoplas ma
VrSTS1 5	XP_034710385.1	39 2	42.8 2	6.1 1	Chr16;3960929..39626 01	2:1	Citoplas ma
VrSTS1 6	XP_034710257.1	39 2	42.7 5	6.2 8	Chr16;3973804..39753 63	2:1	Citoplas ma
VrSTS1 7	XP_034710210.1	39 2	42.7 8	6.1 1	Chr16;3986511..39881 84	2:1	Citoplas ma
VrSTS1 8	XP_034711890.1	39 2	42.6 4	6.0 6	Chr16;13781034..1378 2874	2:1	Citoplas ma
VrSTS1 9	XP_034711697.1	39 2	42.8 2	5,9 7	Chr16;16982966..1698 4785	2:1	Citoplas ma
VrSTS2 0	XP_034710594.1	39 2	20,4 7	8,9 2	Chr16;16996156..1699 7157	2:1	Citoplas ma

VrSTS2	XP_034711848.1	39	42.7	6.0	Chr16;17012548..1701	3:1	Citoplas
1		2	8	9	4391		ma
VrSTS2	XP_034711176.1	39	42.7	6.2	Chr16;17020198..1702	2:1	Citoplas
2		2	7	3	2107		ma
VrSTS2	XP_034711177.1	39	42.9	6.1	Chr16;17031035..1703	2:1	Citoplas
3		2	5	8	2678		ma
VrSTS2	XP_034711236.1	39	42.8	6.1	Chr16;17034459..1703	2:1	Citoplas
4		2	0	1	6129		ma
VrSTS2	XP_034711234.1	39	42.8	6.1	Chr16;17066232..1706	2:1	Citoplas
5		2	3	0	8172		ma
VrSTS2	XP_034711235.1	39	42.9	6.1	Chr16;17072418..1707	2:1	Citoplas
6		2	3	8	3999		ma
VrSTS2	XP_034710059.1	39	42.7	6.1	Chr16;17079193..1708	2:1	Citoplas
7		2	8	1	0878		ma
VrSTS2	XP_034711553.1	39	42.6	6.0	Chr16;17096069..1709	2:1	Citoplas
8		2	1	3	7852		ma
VrSTS2	XP_034711554.1	39	42.7	6.1	Chr16;17108740..1711	2:1	Citoplas
9		2	8	0	0636		ma
VrSTS3	XP_034711555.1	39	42.9	6.1	Chr16;1711909217120	2:1	Citoplas
0		2	4	8	649		ma
VrSTS3	XP_034711556.1	39	42.7	6.1	Chr16;17122544..1712	2:1	Citoplas
1		2	9	1	4162		ma
VrSTS3	XP_034710144.1	39	42.6	6.1	Chr16;17143423..1714	2:1	Citoplas
2		2	7	7	5194		ma
VrSTS3	XP_034710797.1	39	42.7	6.3	Chr16;17158847..1716	2:1	Citoplas
3		2	5	3	0518		ma
VrSTS3	XP_034710796.1	39	42.7	6.1	Chr16;17162232..1716	2:1	Citoplas
4		2	6	1	3913		ma
VrSTS3	XP_034711793.1	39	42.7	6.0	Chr16;17185561..1718	2:1	Citoplas
5		2	7	3	7230		ma
VrSTS3	XP_034711894.1	39	42.7	6.1	Chr16;17188973..1719	2:1	Citoplas
6		2	8	1	0657		ma
VrSTS3	XP_034711847.1	39	42.6	6.0	Chr16;17209007..1721	2:1	Citoplas
7		2	3	3	0875		ma
VrSTS3	XP_034711142.1	39	42.7	6.2	Chr16;17218562..1722	2:1	Citoplas
8		2	2	3	0351		ma
VrSTS3	XP_034711141.1	39	42.7	6.2	Chr16;17230642..1723	2:1	Citoplas
9		2	2	3	2170		ma
VrSTS4	XP_034711150.1	39	42.8	6.1	Chr16;17234558..1723	2:1	Citoplas
0		2	3	5	6452		ma
VrSTS4	XP_034711151.1	39	42.8	6.0	Chr16;17238027..1723	2:1	Citoplas
1		2	0	3	9727		ma
VrSTS4	XP_034710596.1	11	12.8	4.7	Chr16;17247812..1724	2:1	Citoplas
2		7	6	6	8886		ma
VrSTS4	XP_034710846.1	39	42.8	5.9	Chr16;17256802..1725	2:1	Citoplas
3		2	7	7	8710		ma
VrSTS4	XP_034710379.1	39	42.9	6.1	Chr16;17261093..1726	2:1	Citoplas
4		2	0	7	2731		ma
VrSTS4	XP_034711785.1	39	42.9	6.8	Chr16;17287190..1728	2:1	Citoplas
5		2	9	0	9050		ma
VrSTS4	XP_034711567.1	39	42.8	5.9	Chr16;17319624..1732	2:1	Citoplas
6		2	3	7	1444		ma

VrSTS47	XP_03471156	392	42.9	6.6	Chr16;17322688..17335	4:	Citoplasma
	4.1		0	1	948	3	
VrSTS48	XP_03471156	392	43.0	6.1	Chr16;17343767..17345	3:	Citoplasma
	8.1		5	0	600	2	
VrSTS49	XP_03471156	392	42.8	6.1	Chr16;17352272..17354	2:	Citoplasma
	3.1		2	0	134	1	
VrSTS50	XP_03471188	392	42.8	6.2	Chr16;17360195..17362	2:	Citoplasma
	5.1		0	3	061	1	
VrSTS51	XP_03471169	392	42.9	6.1	Chr16;17374394..17376	2:	Citoplasma
	4.1		0	0	231	1	
VrSTS52	XP_03471149	392	42.8	5.9	Chr16;17395488..17397	2:	Citoplasma
	0.1		7	7	402	1	
VrSTS53	XP_03471147	392	42.8	5.9	Chr16;17412895..17414	2:	Citoplasma
	7.1		7	7	812	1	

Tabela 3- Família de genes ROMT em V. vinifera e V. riparia

Genes	ID	AA	PM	PI	LOC. CROMO	EXÓ/ÍN T	LOC. SUB
VvROMT 1	VIT_202s0025g02 920	36 3	40.3 5	6.0 1	Chr2;2496534..24979 43	4:3	Citoplas ma
VvROMT 2	VIT_203s0038g03 080	36 6	40.0 1	5.3 0	Chr3;2204705..22074 38	3:2	Citoplas ma
VvROMT 3	VIT_203s0038g03 090	35 3	38.6 0	5.7 0	Chr3;2208415..22096 94	2:1	Citoplas ma
VvROMT 4	VIT_208s0032g01 130	35 8	21.0 0	6.4 9	Chr8;5620300..56210 64	3:2	Citoplas ma
VvROMT 5	VIT_208s0007g04 520	32 9	39.9 0	5.6 1	Chr8;18446822..18449 430	3:2	Citoplas ma
VvROMT 6	VIT_210s0003g00 440	32 9	37.0 6	5.4 7	Chr10;1721881..1723 042	2:1	Citoplas ma
VvROMT 7	VIT_210s0003g00 460	35 8	40.3 6	5.4 5	Chr10;1732116..1733 364	2:1	Citoplas ma
VvROMT 8	VIT_210s0003g00 470	35 4	39.3 6	5.3 9	Chr10;1737829..1739 093	2:1	Citoplas ma
VvROMT 9	VIT_210s0003g00 480	36 1	40.6 3	5.9 3	Chr10;1742927..1744 200	2:1	Citoplas ma
VvROMT 10	VIT_210s0003g04 160	35 8	39.2 4	5.7 2	Chr10;7080245..7081 794	3:2	Citoplas ma
VvROMT 11	VIT_212s0028g01 880	35 7	40.1 0	6.0 5	Chr12;2540865..2542 288	2:1	Citoplas ma
VvROMT 12	VIT_212s0028g01 940	35 7	40.1 1	5.7 7	Chr12;2574004..2575 421	2:1	Citoplas ma
VvROMT 13	VIT_212s0028g02 700	35 9	40.4 6	5.5 8	Chr12;3496756..3498 036	2:1	Citoplas ma
VvROMT 14	VIT_212s0028g02 710	35 7	40.1 8	5.6 6	Chr12;3509536..3510 991	2:1	Citoplas ma
VvROMT 15	VIT_212s0028g02 740	35 8	40.3 9	5.6 1	Chr12;3564082..3565 358	2:1	Citoplas ma

VvROMT 16	VIT_212s0028g02 830	36 0	40.5 7	5.5 8	Chr12;3580108..3638 237	2:1	Citoplas ma
VvROMT 17	VIT_212s0028g02 810	35 7	40.3 8	5.5 7	Chr12;3613363..3614 811	2:1	Citoplas ma
VvROMT 18	VIT_212s0028g02 850	35 8	40.2 5	5.6 2	Chr12;3645774..3647 115	2:1	Citoplas ma
VvROMT 19	VIT_212s0028g02 860	35 7	39.5 1	6.0 5	Chr12;3649392..3650 615	2:1	Citoplas ma
VvROMT 20	VIT_212s0028g02 870	35 7	40.0 6	5.7 2	Chr12;3657308..3658 646	2:1	Citoplas ma
VvROMT 21	VIT_212s0028g02 880	35 7	40.2 9	5.9 1	Chr12;3660136..3661 479	2:1	Citoplas ma
VvROMT 22	VIT_212s0028g02 885	30 7	35.1 2	5.9 7	Chr12;3666327..3667 579	2:1	Citoplas ma
VvROMT 23	VIT_212s0028g02 900	16 8	18.5 0	5.1 3	Chr12;3671121..3671 931	2:1	Citoplas ma
VvROMT 24	VIT_212s0028g02 920	35 7	40.3 2	5.8 2	Chr12;3677671..3679 108	2:1	Citoplas ma
VvROMT 25	VIT_212s0028g02 950	35 7	40.3 8	6.0 1	Chr12;3698249..3699 569	2:1	Citoplas ma
VvROMT 26	VIT_212s0059g01 750	36 7	40.3 3	5.3 8	Chr12;6622273..6623 453	2:1	Citoplas ma
VvROMT 27	VIT_212s0059g01 790	37 5	41.5 6	5.3 5	Chr12;6643771..6644 975	2:1	Citoplas ma
VvROMT 28	VIT_215s0045g01 490	35 8	39.9 8	5.8 9	Chr15;7490221..7491 384	2:1	Citoplas ma
VvROMT 29	VIT_215s0048g02 450	35 7	39.3 3	5.6 3	Chr15;16636718..1663 8081	4:3	Citoplas ma
VvROMT 30	VIT_215s0048g02 460	39 5	43.5 2	5.3 6	Chr15;16644983..1664 6337	3:2	Citoplas ma
VvROMT 31	VIT_215s0048g02 480	35 9	39.7 5	5.4 4	Chr15;16656764..1665 8632	4:3	Citoplas ma
VvROMT 32	VIT_218s0001g02 610	37 2	41.2 7	5.3 4	Chr18;2845459..2846 977	4:3	Citoplas ma
VvROMT 33	VIT_219s0135g00 030	37 2	41.2 2	5.3 4	Chr19;14523870..1452 5428	4:3	Citoplas ma

VrROMT 1	XP_03470433 2.1	363	40.3 9	5.9 6	Chr2;17307937..17309 538	4:3	Citoplas ma
VrROMT 2	XP_03468095 6.1	359	39.2 3	5.2 2	Chr3;2065310..20678 25	3:2	Citoplas ma
VrROMT 3	XP_03468030 6.1	354	38.7 6	5.7 7	Chr;32071444..20731 10	2:1	Citoplas ma
VrROMT 4	XP_03467968 6.1	354	38.7 6	5.5 8	Chr3;2076574..20781 35	2:1	Citoplas ma
VrROMT 5	XP_03469375 9.1	358	39.9 1	5.4 2	Chr8;18592303..18600 083	4:3	Citoplas ma
VrROMT 6	XP_03469416 4.1	332	36.9 6	5.7 3	Chr8;18630911..18633 456	3:2	Citoplas ma
VrROMT 7	XP_03470240 4.1	375	41.6 2	5.3 5	Chr12;17003914..1700 5248	2:1	Citoplas ma
Cont.							

Genes	ID	AA	PM	PI	LOC. CROMO	EXÓ/ÍN T	LOC. SUB
VrROMT 8	XP_03470130 4.1	367	40.3 4	5.5 3	Chr12;17018045..1701 9345	2:1	Citoplas ma
VrROMT 9	XP_03470077 4.1	357	40.4 3	5.7 3	Chr12;19650560..1966 5402	4:3	Citoplas ma
VrROMT1 0	XP_03470077 6.1	357	40.4 0	5.5 1	Chr12;19670971..1967 2590	2:1	Citoplas ma
VrROMT1 1	XP_03470138 6.1	357	40.0 3	5.9 1	Chr12;19685404..1968 6921	2:1	Citoplas ma
VrROMT1 2	XP_03470135 9.1	357	39.5 0	5.9 5	Chr12;19693500..1969 4976	2:1	Citoplas ma
VrROMT1 3	XP_03470201 5.1	357	40.1 1	5.5 5	Chr12;19697069..1969 8658	2:1	Citoplas ma
VrROMT1 4	XP_03470201 6.1	357	40.3 0	5.3 0	Chr12;19704963..1970 7230	2:1	Citoplas ma
VrROMT1 5	XP_03470201 8.1	357	40.4 3	5.8 2	Chr12;19715650..1971 7483	2:1	Citoplas ma
VrROMT1 6	XP_03470122 3.1	359	40.4 4	5.5 0	Chr12;19720589..1972 2143	2:1	Citoplas ma
VrROMT1 7	XP_03470133 2.1	357	40.1 1	5.7 7	Chr12;20690019..2069 1609	2:1	Citoplas ma
VrROMT1 8	XP_03470123 4.1	357	40.1 1	5.8 2	Chr12;20738581..2074 0184	2:1	Citoplas ma
VrROMT1 9	XP_03471005 0.1	359	39.8 4	5.6 8	Chr15;4030408..4032 570	4:3	Citoplas ma
VrROMT2 0	XP_03470875 4.1	359	39.8 1	5.5 5	Chr15;4035985..4038 054	4:3	Citoplas ma
VrROMT2 1	XP_03470871 1.1	359	39.6 1	5.8 0	Chr15;4057796..4059 978	4:3	Citoplas ma
VrROMT2	XP_03470871	337	37.1	6.0	Chr15;4071578..4073	4:3	Citoplas

2	2.1	3	5	069			ma
VrROMT2	XP_03470984	337	37.1	5.5	Chr15;4079915..4081	4:3	Citoplasma
3	9.1	6	0	238			ma
VrROMT2	XP_03471159	364	39.5	5.4	Chr16;23112278..2311	4:3	Citoplasma
4	8.1	0	2	4924			ma
VrROMT2	XP_03471163	385	41.8	5.3	Chr16;23121701..2312	4:3	Citoplasma
5	1.1	9	7	4586			ma
VrROMT2	XP_03467235	361	40.5	5.7	Chr17;14325227..1432	2:1	Citoplasma
6	9.1	7	7	7113			ma
VrROMT2	XP_03467241	367	41.0	5.4	Chr17;14330621..1433	2:1	Citoplasma
7	2.1	9	0	2175			ma
VrROMT2	XP_03467241	358	40.3	5.6	Chr17;14336430..1433	2:1	Citoplasma
8	9.1	3	5	8051			ma
VrROMT2	XP_03467501	363	40.2	5.8	Chr18;24936969..2493	4:3	Citoplasma
9	6.1	3	8	9561			ma
VrROMT3	XP_03467480	372	41.2	5.3	Chr18;2877215..2878	4:3	Citoplasma
0	2.1	2	4	943			ma
VrROMT3	XP_03467952	358	39.9	5.8	Chr19;13672625..1367	2:1	Citoplasma
1	4.1	7	5	3788			ma

4.4. Anotação funcional das proteínas STS e ROMT – Ontologia gênica (GO)

De acordo com os dados GO, o conjunto de proteínas STS das duas espécies de videira apresentam Processo Biológico – PB (Figura 4A) relacionada aos processos biossintéticos (GO:0009058), metabólicos (GO:0008152), respostas a estímulos (GO:0050896) e resposta a estresses e defesa vegetal (GO:0006950).

A Função Molecular– FM (Figura 4B) indica a participação dessas proteínas nas atividades da triidroxiestilbene sintase (GO:0050350), atividade de transferase (GO:0051338), atividade de acetiltransferase (GO:0016413) e atividade catalítica (GO:0003824). Por sua vez, o PB das ROMTs (Figura 4C) indica sua participação em processos biossintéticos (GO:0009058), celular (GO:0050794) e metabólicos (GO:0008152) e a FM (Figura 4D) com atividades como atividade de dimerização (GO:0046983), O-metiltransferase (GO:0008171), metiltransferase (GO:0008168), atividade do resveratrol O-metiltransferase e atividade catalítica (GO:000382).

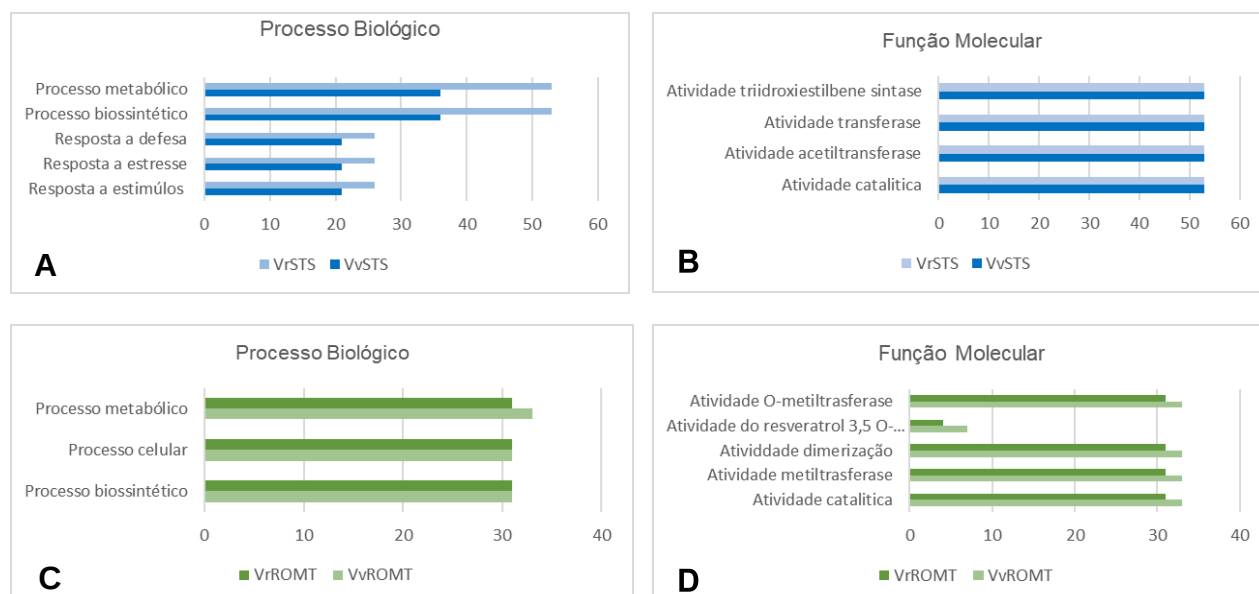


Figura 5-- Anotação funcional das proteínas STS e ROMT de *V. vinifera* e *V. riparia*. Função Molecular (A) e (B) Processos biológicos das sequências proteicas VvSTS e VrSTS. Função Molecular (C) e Processos Biológicos (D) das sequências proteicas VvROMT e VrROMT.

4.5. Análise fenética, motivos conservados e estrutura gênica dos genes STS e ROMT

Para a construção das árvores fenéticas e análise de motivos conservados foram utilizadas 67 sequências proteicas de STS, sendo 36 de *V. vinifera* e 31 *V. riparia*, e 64 ROMT, com 33 e 31 pertencendo a *V. vinifera* e *V. riparia*, respectivamente.

O fenograma construído para a família STS indicou a formação de sete *clusters*, identificados em algarismo romano de I – IV, com valores de suporte (*bootstrap*) adequados (Figura 8). Foi possível observar que o agrupamento das proteínas STS foi coerente com a sua localização cromossômica. O *cluster* I (*bootstrap*=19%) agrupou os membros que estavam associados ao chr16 das duas espécies, com exceção do VvSTS18, que não agrupou com nenhuma outra sequência vinculadas a esse cromossomo.

Os motivos conservados para STS e ROMT podem ser visualizados na figura 5B e 6B. O *cluster* II (*bootstrap*=96%) reuniu quatro (VvSTS) e cinco (VrSTS) membros, que estavam ancorados no chr10, e o *cluster* III (*bootstrap*=100%) reuniu os membros localizados no chr5 e chr14. Para ROMT foi possível observar a formação de três *clusters* (*cluster* I – *bootstrap*=77%, *cluster* II – *bootstrap*=100% e *cluster* III – *bootstrap*=100%), onde cada *cluster* reuniu membros que continham tipo e distribuição de

motivos semelhantes (Figura9).

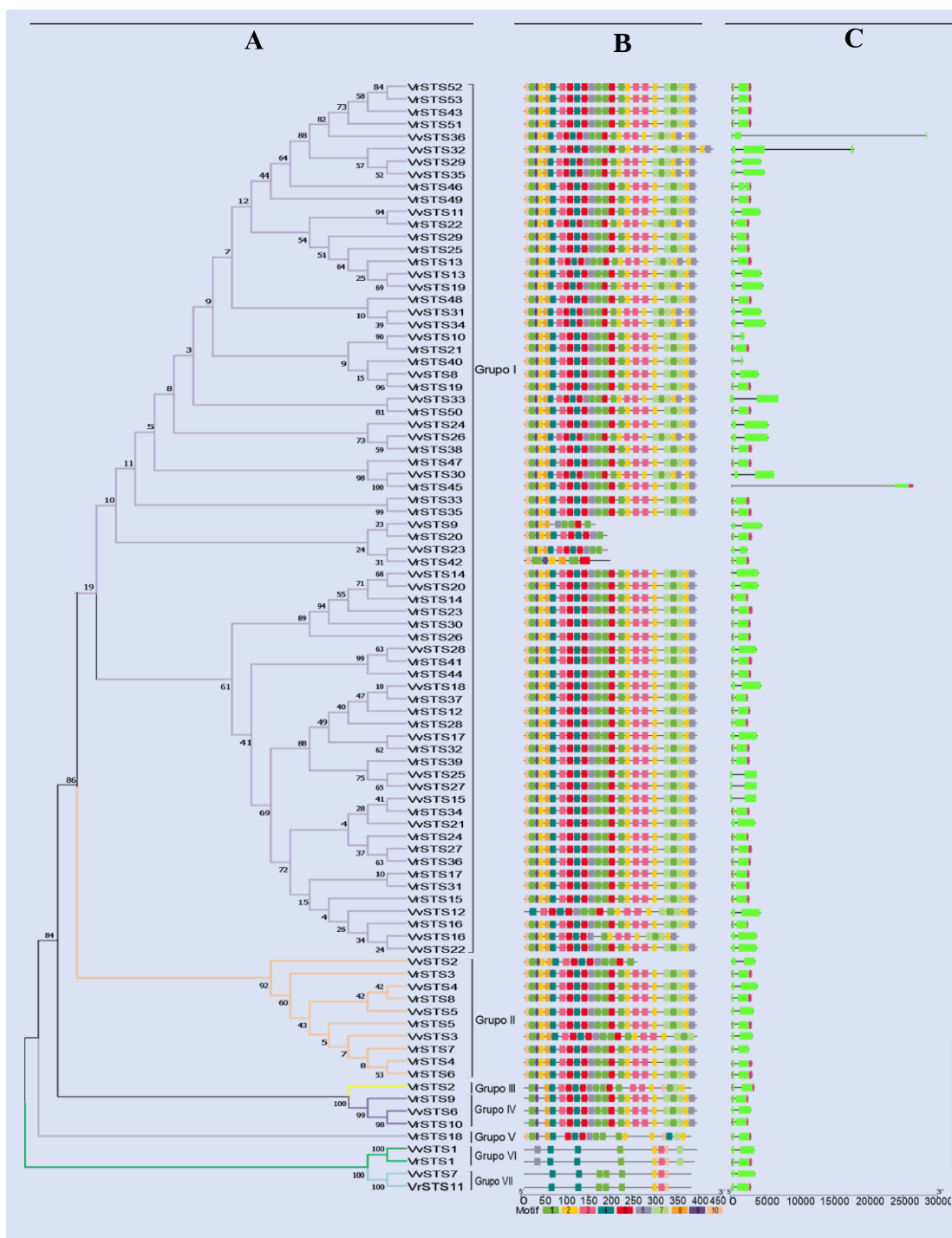


Figura 6- A) Fenograma dos genes STS de *V. vinífera* e *V. riparia*. B) Composições de motivos proteicos. C) Estrutura gênica de STS. As sequências foram alinhadas usando ClustalW e a árvore fenética foi construída usando MEGA 10.0 com 1000 repetições (bootstrap).

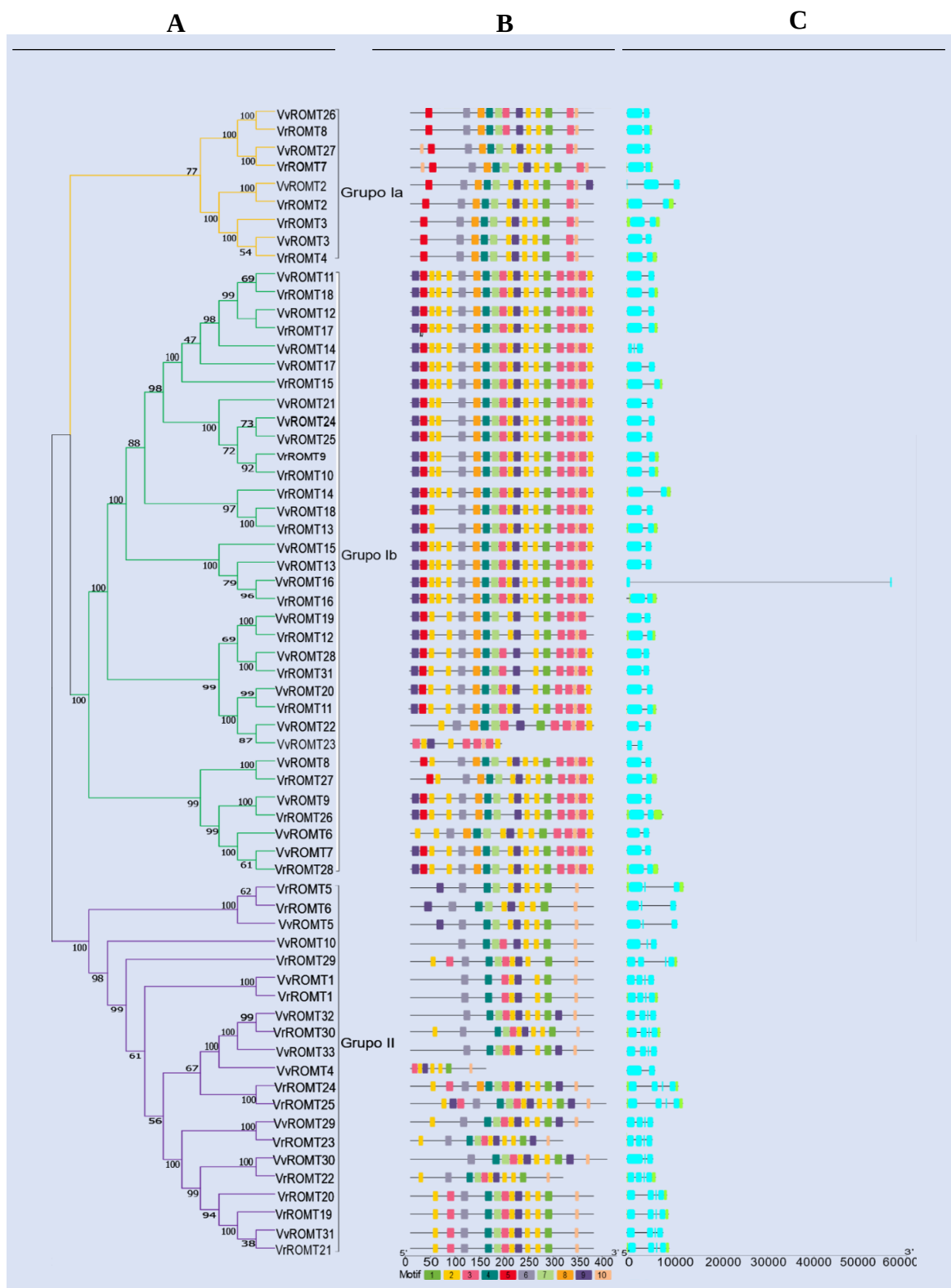


Figura 7- A) Fenograma da árvore filogenética dos genes ROMT de *V. vinifera* e *V. riparia*. B) Composições de motivos proteicos; C) Estrutura gênica de ROMT. As sequências foram alinhadas usando ClustalW e a árvore fenética foi construída usando MEGA 10.0 com 1000 repetições (bootstrap).

A análise de motivos conservados demonstrou que as sequências VvROMT e VvSTS resultaram em cinco motivos conservados para cada família (Figuras 10.6-10). A maioria das sequências VvROMT compartilham cinco motivos mais abundantes, o motivo 6 (KERTEKEW), 7 (PTPFDTAHGRTFWDY), 8 (HDWSDEECVKILKNC), 9 (WNHIFNFINSMSLKC) e 10 (EGYVLTDASRLLKLD). Cada motivo é composto por sequências de aminoácidos e cada sequência VvROMT apresentou aminoácidos variados (Figura 7).

Por sua vez, a família gênica STS apresentou cinco motivos abundantes em suas sequências, o motivo 1 (IKEWGKPKSKITHLV), 2 (HMTTELKKKFNR), 3 (TPDNCVYC), 4 (SVEEIRNA) e 5 (MRKKSLKEEKTITGE), compartilhados em todas as sequências VvSTS (Figura 7 (10)).



Figura 8- Motivos conservados das sequências dos genes STS (1 a 5) e ROMT (6 a 10) de *V. vinifera* e *V. riparia*. E= Glutamato, T= triptofano, L= leucina, P= prolina, S= serina, N= asparagina, K= lisina, F= fenilalanina, G= glicina, R= arginina, D= ácido aspártico, V= valina, Y= tirosina, H= histidina, C= cisteína, M= metionina, W= triptofano.

Os aminoácidos mais abundantes presentes nos motivos conservados (Figura 7), das sequências VvSTS e VvROMT são Glutamato (E), Leucina (L) (W), Fenilalanina (F), lisina (K), Cisteína (C), Treonina (T), Lisina (K), Metionina (M) e Histidina (H).

A diversidade estrutural dos genes STS e ROMT investigada a partir da análise da organização éxon/intron indicou que a estrutura gênica de STS e ROMT em *V. vinifera* e *V. riparia* é dividida em padrões de acordo com a quantidade de exóns e íntrons.

A estrutura gênica dos genes STS de *V. vinifera* apresentam apenas dois padrões, padrão I (2 éxons/1 íntron) e padrão 2 (3 éxons/ 2 íntrons). Já os padrões observados nos genes STS em *V. riparia* apresenta três padrões, padrão I (2 éxons/1 íntron), padrão II (3 éxons/2 íntrons) e padrão III (4 éxons/3 íntrons) (Figura 8C).

Os padrões observados nos genes ROMT de *V. riparia* demonstraram a existência de cinco padrões de estrutura íntron-éxon, o padrão I (1 éxon), padrão II (2 éxons/1 íntron), padrão III (3 éxons/2 íntrons), padrão IV (4 éxons/3 íntrons) e padrão V (5 éxons/4 íntrons). Para *V. vinifera*, os padrões foram divididos em padrão I (2 éxons/1 íntron), padrão II (3 éxons/2 introns) e padrão III (4 éxons/ 2 introns) (Figura 9C).

Os resultados indicam que os genes STS e ROMT apresentam padrões de estruturas gênicas distintos entre as cultivares de videira estudadas.

4.6 Padrão de expressão *in silico* de genes STS e ROMT

O *heatmap* gerado com base nos valores de $\log_2$ *Foldchange* ($\log_2$ FC) das bibliotecas de RNA-Seq para os transcritos STS demonstrou a formação de dois *clusters*, sendo um para cada cultivar (Red Globe e IAC-572) de videira estudada. O *cluster* do híbrido IAC-572 reuniu três transcritos STS com regulação negativa (reprimidos) e apenas um transcrito induzido, com os demais transcritos sendo constitutivos, enquanto o *cluster* da cultivar Red Globe reuniu 16 transcritos reprimidos, um transcrito induzido e 33 transcritos foram constitutivos (Figura 9A).

A biblioteca de RNA-Seq para os transcritos ROMT também demonstrou a formação de dois *clusters* um para cada cultivar (Red Globe e o híbrido IAC-572). O *cluster* do híbrido IAC-572 reuniu 12 transcritos ROMT reprimidos, nenhum transcrito induzido e os demais sendo constitutivos. O *cluster* da Red Globe reuniu dois transcritos ROMT induzidos.

De forma geral, os resultados demonstraram que a inoculação com *X. citri* após 90 minutos de estresse resultam na indução de poucos transcritos das famílias de genes STS e ROMT no híbrido IAC-572. No entanto, fica evidente que as cultivares apresentam estratégias de defesa contrastantes frente ao estresse ocasionado pelo agente bacteriano.

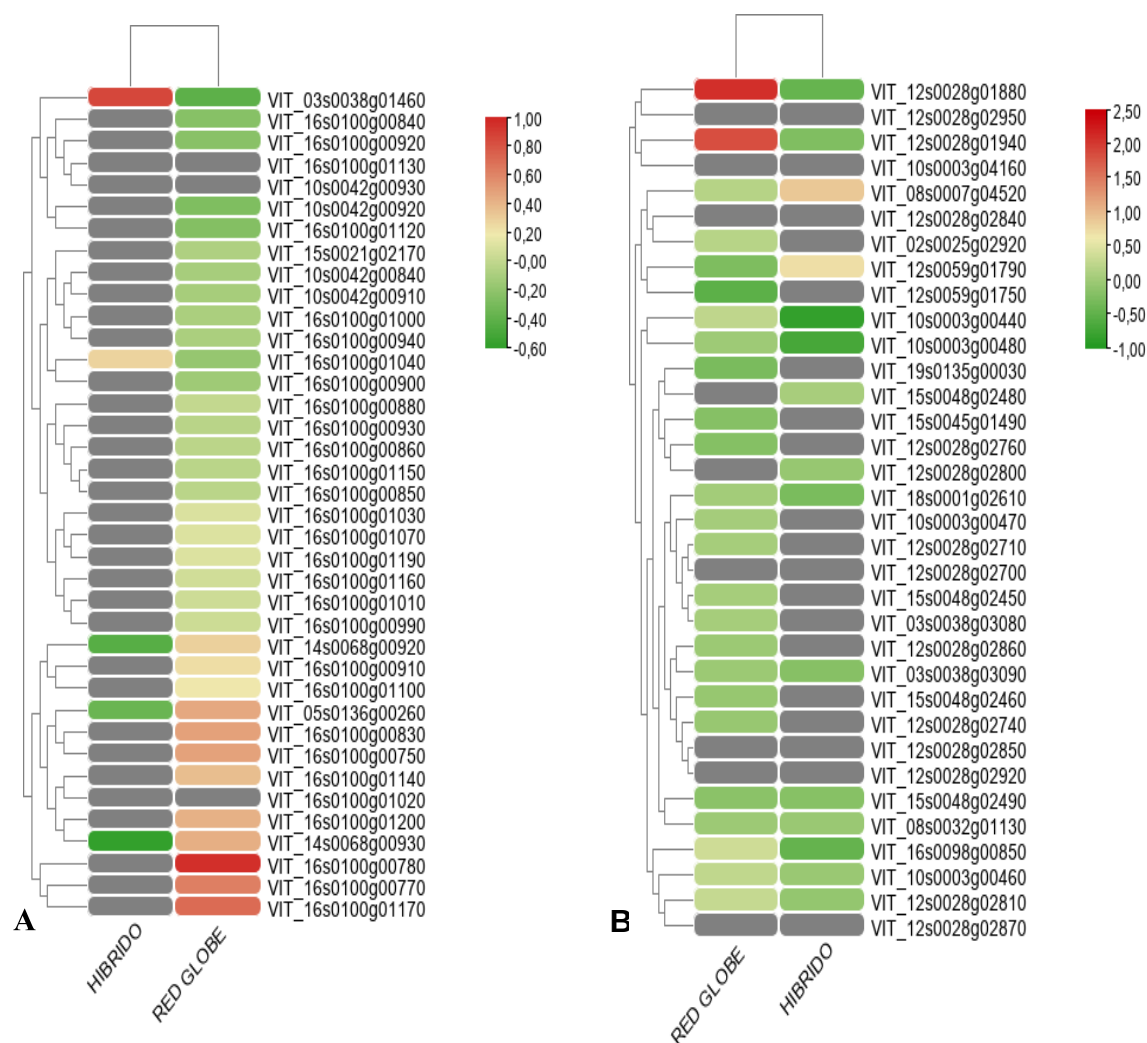


Figura 9- Expressão gênica das famílias STS (A) e ROMT (B) em tecidos foliares de *V. vinifera* cv. Red Globe e híbrido IAC-572 sob estresse bacteriano. Os tratamentos são exibidos verticalmente acima de cada coluna. Os genes são exibidos a esquerda de cada linha e evidenciado por cores diferentes. Os níveis de expressão são indicados por um gradiente de cor, baixo (Verde) negativos, alto (Vermelho) induzidos ou expressos e constitutivos ou não expressos (Cinza).

5. DISCUSSÃO

5.1 Identificação e caracterização dos genes STS e ROMT de *V. vinifera* e *V. riparia*

Na maioria das plantas produtoras de estilbeno, a STS existe como uma pequena família que consiste de 1 a 10 parálogos intimamente relacionados. Ambos os genomas da videira e do sorgo foram inteiramente sequenciados, sugerindo que a família de genes STS da videira consistia de 15 a 20 membros ((PERTESON et al., 2009; LEE et al., 2019); SPARVOLI et al., 1994). No entanto, com todo o genoma de *V. vinifera* PN40024 sequenciado levou à identificação de 48 supostos genes STS, designados VvSTS1 a VvSTS48, com pelo menos 33 potencialmente codificando proteínas STS funcionais (VANNOZI et al., 2012; PARAGE et al., 2012). Os resultados obtidos no presente estudo para os genes STS de *V. vinifera* corroboram com os encontrados na literatura (36 genes), enquanto para a classe de genes STS da cultivar *V. riparia* foram encontrados resultados diferentes (53 genes), indicando que esses genes podem variar de acordo com a cultivar de videira estudada.

5.1. Localização dos genes STS e ROMT nos cromossomos

Liu e colaboradores (2015) estudando genes O-metiltransferase (OMT) em citrus encontraram tais genes ancorados em dois cromossomos, sendo 23 genes localizados no cromossomo 5 e 11 genes localizados no cromossomo 2. Em estudo realizado por Vannozzi et al., (2012) sobre localização cromossômica de genes VvSTS tais genes estavam localizados nos cromossomos 10 e 16 no genoma de videira. Em nosso trabalho, foi verificado que além da ancoragem nos cromossomos 10 e 16, os genes STS ancoraram em outros cromossomos, tanto no genoma de *Vitis vinifera* quanto genoma de *Vitis riparia*.

5.2. Características físico-químicas

Schöppner et al. (1984) realizando estudo com genes STS observaram que estas proteínas apresentaram peso molecular estimado em torno de 90 kDa com ponto isoelétrico (pI) de 4.8. Ren et al., (2015) avaliando genes resveratrol ROMT em *V. vinifera* (Cultivar Cabernet Sauvignon) verificaram que o peso molecular destes genes eram de 34,4 kDa e

o ponto isoelétrico em torno de 5,69. No entanto, estudos realizados com a família gênica O-metiltransferase (OMT) mostraram que 133 proteínas OMT de citrus e outras espécies vegetais (*C. sinensis*, *A. thaliana*, *V. vinifera* e *P. trichocarpa*) apresentaram variações de peso molecular, variando de 20 a 68 kDa.

5.3. Localização subcelular das proteínas STS e ROMT

Resultados observados por Ren et al., (2019) avaliando a expressão de genes ROMT em videira (cultivar Cabernet Sauvignon) infectadas com suspensão de *G. citri-aurantii*, causador da podridão azeda, principal doença que acomete a cultura da videira na China, demonstraram que os genes das proteínas avaliadas se acumularam principalmente na membrana celular, apoplasto e núcleo. Em contrapartida, os resultados encontrados por Hondpan, et al., (2009) utilizando microscopia eletrônica demonstraram que genes STS estavam localizados principalmente na parede celular primária e secundária e cloroplasto nos tecidos da pele da baga de uva durante o desenvolvimento da fruta.

Os resultados da localização subcelular observados neste trabalho para os genes STS e ROMT diferem da literatura, uma vez que todos os genes estavam localizados no citoplasma da parte área das espécies de videiras estudadas. Tais resultados podem indicar que os genes podem acumular-se em compartimentos diferentes dependendo do tecido ou órgão vegetal avaliado.

5.4. Análises fenéticas

As funções de uma proteína podem ser preditas preliminarmente por meio de agrupamentos filogenéticos (Xie et al., 2014), uma vez que as proteínas agrupadas em um clado podem ter funções e estrutura gênica semelhantes ou podem evoluir de um ancestral comum recente.

Com os resultados obtidos nas análises fenéticas e de motivos conservados foi possível observar que as sequências mais próximas que compõem as subfamílias dos genes STS e ROMT apresentaram motivos conservados com composições similares (tipo e quantidade de motivo) dentro de cada subfamília, o que sugere similaridades funcionais entre as sequências proteicas que as compõem.

Estudos realizados com base nas análises filogenéticas e nas comparações entre as sequências nucleotídicas e de aminoácidos e caracterização no genoma da videira atribuíram 31 genes VvSTS em três grupos filogenéticos nos quais VvSTS está dividida (MALACARNE et al., 2011). Os compostos estilbênicos ocorrem naturalmente em poucas espécies vegetais não relacionadas entre si e a análise filogenética da família gênica STS e da chalcone synthase (CHS) mostrou que os genes STS evoluíram a partir dos genes CHS várias vezes independentemente no curso da evolução (TROPF et al., 1994).

Os introns eram consideradas como lixo de DNA, no entanto, recentemente perceberam que algumas sequências podem ser funcionais (OHNO.,1972). Esses DNAs podem abrigar uma variedade de elementos que regulam a transcrição, por exemplo, RNAs não traduzidas e elementos de controle de emenda (MATTICK.,2021). Devido às suas propriedades funcionais, pelo menos uma fração das regiões intrônicas provavelmente evoluirão sob a influência da seleção natural, purificando principalmente a seleção (GAZAVE et al.,2007).

Em muitos eucariotes, incluindo mamíferos, plantas, leveduras e insetos, os introns podem aumentar a expressão genética sem funcionar como um local vinculativo para fatores de transcrição. Esse fenômeno foi chamado de "aprimoramento mediado por intron". Os introns podem aumentar os níveis de transcrição afetando a taxa de transcrição, exportação nuclear e estabilidade da transcrição. Além disso, os introns também podem aumentar a eficiência de tradução de mRNA (ZHU et al.,2009).

5.5. Padrões de expressão *in silico* de genes STS e ROMT

No presente trabalho foram avaliados genes de defesa em tecidos foliares de videira *Vitis vinifera* (Cultivar Red Globe) e híbrido IAC-572 sob estresse biótico (inoculação com *X. citri*). Foi observado que poucos membros da família de gênica STS apresentaram expressão induzida nos tecidos foliares de videira cultivar Red Globe e do híbrido IAC 572, com apenas um gene com expressão significativa (03s0038g01460) presente no *cluster* da cultivar Red Globe, e um gene (16s0100g00780) no híbrido IAC-572. Enquanto na família gênica do ROMT houve indução de dois genes na cultivar Red Globe (12s0028g01880 e 12s0028g01940), nenhum gene foi induzido no híbrido IAC-572.

A regulação dos genes STS e outros genes de defesa vegetal têm sido estudados visando contribuir com a defesa constitutiva contra patógenos durante o desenvolvimento de videiras (Ali et al 2011). Estudos realizados por Vanozzi et al., (2012) avaliando a expressão de genes VvSTS submetidos a diferentes estresses (radiação UV, infecção por míldio e feridas) em tecidos de videira, demonstraram que tais estresses induziram genes VvSTS durante a senescência de folhas e de bagas de uva no processo de murchamento. A indução dos genes foi maior na infecção ocasionada pelo míldio nos maiores tempos de exposição a infecção (48h após o estresse), indicando o estabelecimento do patógeno dentro do tecido foliar de videira nesse tempo.

No presente trabalho houve baixa ou nenhuma indução de genes STS submetidos ao estresse com a bactéria *X. citri*. no tempo de exposição de 90 minutos após o estresse no híbrido IAC-572, o que pode indicar o não estabelecimento do patógeno em um menor intervalo de tempo de exposição a infecção pela bactéria. Tal resultado difere dos verificados por Ezet et al. (2004), onde foi demonstrado que os compostos derivados do resveratrol (viniferinas e pterostilbenos) foram sintetizados em níveis mais altos no híbrido Divico, uma cultivar considerada resistente ao patógeno.

Estudos indicam que compostos estilbênicos podem acumular-se em quantidades diferentes dependendo da cultivar de videira (DUFOR et al. 2013). Além do fato de que o tempo de acúmulo de transcrições de genes VvSTS em resposta a estresses podem se comportar como bifásico, levando alguns autores a supor que esses genes podem ser divididos em dois grupos, um que se expressa precocemente com a rápida degradação do mRNA e o outro expresso posteriormente, com um mRNA mais estável (WIESE et al., 1994).

6. CONCLUSÕES

- As análises de bioinformática indicaram que os genes STS e ROMT são diferencialmente expressos (induzidos ou reprimidos) em tecidos foliares da cultivar Red Globe e do híbrido IAC 572 após 90 minutos de inoculação com *X. citri* pv. *viticola* sugerindo sua participação no processo de defesa da videira frente ao agente bacteriano.
- Os resultados obtidos neste estudo contribuíram para o entendimento das características moleculares das fitoalexinas STS e ROMT e sua participação na resposta precoce de defesa da videira sob infecção de *X. citri* e apresentam potencial para o desenvolvimento de marcadores moleculares visando aplicação em programas de melhoramento genético da cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI MB, HOWARD S, CHEN S, WANG Y, YU O, KOVACS LG, QIU W. Berry desenvolvimento de pele em uva Norton: padrões distintos de regulação transcricional e biosíntese flavonoid. *BMC Plant Biology*. 2011.
- ARÚS, B. A., SOUZA, D. G., BELLAVER, B., SOUZA, D. O., GONÇALVES, C. A., QUINCOZES-SANTOS, A., & BOBERMIN, L. D. (2017). Resveratrol modulates gsh system in C6 astroglial cells through heme oxygenase 1 pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 428, 67–77.
- BAVARESCO L, FREGONI M, TREVISAN M, MATTIVI F, VRHOVSEK U, FALCHETTI R. (2002). The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes. *Vitis*, 41:133–136.
- BAVARESCO, L.; PETTEGOLLI, D.; CANTÜ, E.; FREGONI, M.; CHIUSA, G.; TREVISAN, M. (1997) Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 36, 77–83.
- BÉZIER, A.; LAMBERT, B.; BAILLIEUL, F. (2002). Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol*, 108, 111–120.
- CHOU, K. C.; SHEN, H. B. (2010). Cell-PLoc 2.0: An improved package of web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Development*, 109, 1091.
- DROZDETSKIY, A. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic acids research*, 43(W1):W389-W394,
- GAMA, M. AS. (2011). Polyphasic characterization of pigmented strains of *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. *Plant disease*, 95(7): 793-802.
- GATTO, P.; VRHOVSEK, U.; MUTH, J.; SEGALA, C.; ROMUALDI, C.; FONTANA, P.; PRUEAFER, D.; STEFANINI, M.; MOSER, C.; MATTIVI, F.; VELASCO, R. (2008). Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(24), 11773-11785.
- GAZAVE E, MARQUES-BONET T, FERNANDO O, CHARLESWORTH B, NAVARRO A. (2007). Padrões e taxas de divergência de íntrons entre humanos e chimpanzés. *Genoma Biol.*, 8 (2): R21- 10.1186/gb-2007-8-2-r21.
- HASAN, M.; BAE, H. (2017). An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: Perspectives for resveratrol-enriched grape products. *Molecules*, 22, 294. .
- JEANDET, P.; BESSIS, R.; SBAGHI, M.; MEUNIER, P. (1995). Production of the

phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. *Journal of Phytopathol*, 143, 135–139.

KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870–1874.

LANGCAKE P, MCCARTY WV. (1979). The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 18:244–253.

LEE, Y.G.; CHOI, S.C.; KANG, Y.; KIM, K.M.; KANG, C.S.; KIM, C. (2019). Constructing a reference genome in a single lab: The possibility to use oxford nanopore technology. *Plants*, 8, 270.

LIU, Y. L, HONGKUN. W, WANPENG. X, JIE. Y, QIUYUN. Z, ZHIQIN. Z. Systematic analysis of O-methyltransferase gene family and identification of potential members involved in the formation of O-methylated flavonoids in Citrus Xiaogang. *Gene*, 2015.

LOPES, D.B; NASCIMENTO, A.R.P. Uva: Risco duplo. Cultivar HF 27:26-27. 2004

NAUE, C. R., BARBOSA, M. A. G., BATISTA, D. D. C., SOUZA, E. B. D., MARIANO, R. D. L. R. Efeito do tratamento de bacelos de videira Red Globe no controle do cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *EmbrapaSemiárido-Artigo em periódico indexado*, 2014.

MALACARNE G, VRHOVSEK U, ZULINI L, CESTARO A, STEFANINI M, MATTIVI F, MOSER C. (2011). Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC Plant Biol.*;11:114.

MATTICK JS, GAGEN MJ. (2001). A evolução de redes de genes multitarefa controladas: o papel dos íntrons e outros RNAs não codificantes no desenvolvimento de organismos complexos. *MolBiol Evol.* 18 (9): 1611-1630.

OHNO S: Muito DNA "lixo" em nosso genoma. *Brookhaven Symp Biol.* 1972, 23: 366-370.

PARAGE, C.; TAVARES, R.; RETY, S.; BALTENWECK-GUYOT, R.; POUTARAUD, A.; RENAULT, L.; HEINTZ, D.; LUGAN, R.; MARAIS, G.A.; AUBOURG, S.; et al. (2012). Structural, functional, and evolutionary analysis of the unusually large stilbene synthase gene family in grapevine. *Plant Physiol.*, 160, 1407–1419.

SCHÖPPNER, A.; KINDL H. (1984). Purification and properties of a stilbene synthase induced cellsuspension of peanut. *J Biol Chem*, 259:6806–6811.

SPARVOLI, F.; MARTIN, C.; SCIENZA, A.; GAVAZZI, G.; TONELLI, C. (1994). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.*, 24, 743–755.

TROPF S, LANZ T, RENSING SA, SCHRÖDER J, SCHRÖDER G: (1994). Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *Journal of molecular evolution*, 38, 610-618.

VANNOZZI, A; DRY, I B; FASOLI, M; ZENONI, S; LUCCHIN, M. Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *Plant Biology*. 2012.

WATERHOUSE AL, LAMUELA-RAVENTOS RM.(1994). The occurrence of piceid, a stilbeneglucoside, in grape berries. *Phytochemistry*., 37:571–573.

WIESE W, VORNAM B, KRAUSE E, KINDL H. (1994). Organização estrutural e expressãodiferencial de três genes de stilbene synthase localizados em um fragmento de DNA de videira de 13 kb. *Plante Mol Biol*.;26:667-77.

ZHAO, L., DING, Q., ZENG, J., WANG, F. R., ZHANG, J., FAN, S. J., AND HE, X. Q. (2012). An improved CTAB–ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochemical analysis*, 23(6), 647-650.