



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOPATOLOGIA

**Estratégias inovadoras visando resistência à mancha bacteriana
do tomateiro**

LUCAS JOSÉ DE SOUSA

Brasília - DF
2024

LUCAS JOSÉ DE SOUSA

**Estratégias inovadoras visando resistência à mancha bacteriana
do tomateiro**

Tese apresentada à Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Fitopatologia pelo Programa de Pós-graduação em Fitopatologia.

Orientador

Luiz Eduardo Bassay Blum

Co-orientadora

Angela Mehta dos Reis

**Brasília – DF
Distrito Federal - Brasil
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

Sousa, L.J. **Estratégias inovadoras visando resistência à mancha bacteriana do tomateiro**/Lucas José de Sousa.

Brasília - DF, 2024.

124p.

Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia,
Universidade de Brasília – UnB.

1. Genes S, nocaute, Proteínas PR, Superexpressão, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

I. Universidade de Brasília. PPG/FIT.

II. Estratégias inovadoras visando resistência à mancha bacteriana do tomateiro.

Trabalho realizado junto ao Departamento de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob orientação do Professor Luiz Eduardo Bassay Blum, e co-orientação da pesquisadora Angela Mehta dos Reis da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-DF.

Estratégias inovadoras visando resistência à mancha bacteriana do tomateiro

LUCAS JOSÉ DE SOUSA

TESE APROVADA em 09/04/2024 por:

Pesquisador, Doutor Leonardo Lima Pepino de Macedo (Embrapa Cenargen)
Examinador Externo

Pesquisadora, Doutora Patricia Messenberg Guimaraes (Embrapa Cenargen)
Examinadora Externa

Professor, Doutor Maurício Rossato (Universidade de Brasília)
Examinador Interno

Professor, Doutor Helson Mário Martins do Vale (Universidade de Brasília)
Examinador Interno (Suplente)

Professor, Doutor Luiz Eduardo Bassay Blum
Orientador (Presidente)

Brasília – DF
Distrito Federal - Brasil
2024

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho:

Em especial aos meus orientadores Luiz Blum e Angela Mehta, pela orientação, suporte, bem como a motivação e confiança para a realização do projeto nos momentos de dificuldade.

À Dr^a Angela Mehta, por me acolher no Laboratório de Genômica e Proteômica da EMBRAPA CENARGEN e proporcionar a realização do sonho de aprender e trabalhar com ferramentas as moleculares utilizadas neste trabalho.

Aos pesquisadores Gláucia Cabral (EMBRAPA) e Wagner Fontes (UnB) que colaboram com parte do projeto.

Ao Dr. Osmundo Brilhante, por sempre colaborar com os experimentos de casa de vegetação e por suas palavras de motivação e alegria.

À analista Luciana Beatriz pela amizade e sempre estar a disposição para aquisição de material.

Aos colegas e amigos de trabalho, pós- doutorandos, mestrandos e estagiários do Laboratório de Genômica e Proteômica.

Ao PPG-Fitopatologia da Universidade de Brasília e a todos os excelentes professores que participaram do processo de aprendizagem.

Às agências de fomento FAP-DF e CNPq que contribuíram para o projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO GERAL	XI
GENERAL ABSTRACT.....	XII
INTRODUÇÃO GERAL	13
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 A CULTURA DO TOMATEIRO (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> L.).....	15
1.2 MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO	16
1.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DE <i>XANTHOMONAS</i> EM TOMATEIRO	17
1.4 ESTRATÉGIAS PROMISSORAS PARA O MANEJO DA MANCHA BACTERIANA	19
1.4.1 OLIGONUCLEOTÍDEOS ANTISSENSE (ASO)	20
1.4.2 CRISPR/CAS.....	21
1.4.3 SUPEREXPRESSION	22
2. OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO 1: CONTROLE DE <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i> POR	
MEIO DE OLIGODEOXYNUCLEOTÍDEOS ANTISSENSE (ASO)	
ABSTRACT	35
1. INTRODUCTION	35
2. MATERIALS AND METHODS.....	37
2.1 PLANT MATERIAL AND BACTERIAL STRAINS.....	37
2.2 GENE SELECTION AND QRT-PCR PRIMER DESIGN	37
2.3 RNA ISOLATION AND CDNA SYNTHESIS.....	38
2.4 QRT-PCR ASSAYS.....	38
2.5 ASO DESIGN AND GENE SILENCING ASSAY	39
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	40
4. CONCLUSIONS.....	44
5. REFERENCES	46
CAPÍTULO 2: ABORDAGEM PROTEÔMICA REVELA NOVOS POTENCIAIS	
GENES DE SUSCETIBILIDADE DO TOMATEIRO QUE FAVORECEM A	
DOENÇA DA MANCHA BACTERIANA CAUSADA POR <i>Xanthomonas</i>	
<i>euvesicatoria</i> pv. <i>perforans</i>	
RESUMO.....	57
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 CULTIVO DA BACTÉRIA E INOCULAÇÃO DAS PLANTAS	59
2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA PROTEÔMICA	59

2.3	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA E ESPECTROMETRIA DE MASSA	60
2.4	ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE PROTEÍNAS	61
2.5	CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DE PROTEÍNAS	62
3.	RESULTADOS	62
4.	DISCUSSÃO	66
5.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
7.	MATERIAL SUPLEMENTAR	79
CAPÍTULO 3: NOCAUTE NO GENE <i>SITFIIAγ</i> DE TOMATEIRO VISANDO RESISTÊNCIA À MANCHA BACTERIANA		
	RESUMO.....	98
1.	INTRODUÇÃO	98
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	100
2.1	CONSTRUÇÃO DO VETOR CRISPR/CAS9	100
2.2	PREPARAÇÃO DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	100
2.3	REGENERAÇÃO DE EXPLANTES DE MICROTOM.....	100
2.4	ACLIMATAÇÃO E OBTENÇÃO DA GERAÇÃO T1	101
2.5	CARACTERIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES	102
2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
3.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	106
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
CAPÍTULO 4: SUPEREXPRESSÃO DE UM GENE DE DEFESA DE <i>Brassica oleracea</i> CONTRA <i>Xanthomonas</i> VISANDO RESISTÊNCIA A DOENÇAS DO TOMATEIRO		
	RESUMO.....	111
1.	INTRODUÇÃO	111
2.	MATERIAL E MÉTODOS	112
2.1	CONSTRUÇÃO DO VETOR DE SUPEREXPRESSÃO.....	112
2.2	PREPARAÇÃO DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	113
2.3	REGENERAÇÃO DE EXPLANTES DE MICROTOM TRANSFORMADOS	114
2.4	ACLIMATAÇÃO E OBTENÇÃO DAS GERAÇÕES DE PLANTAS TRANSGÊNICAS ..	114
2.5	AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DAS PLANTAS TRANSGÊNICAS QUANTO A RESISTÊNCIA A <i>X. EUVESICATORIA</i> PV. <i>PERFORANS</i> E A <i>SCLEROTINIA SCLEROTIORUM</i>	115
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
4.	CONCLUSÃO.....	119
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
6.	ANEXOS	123

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo 1 Supplementary Table 1. Susceptibility genes and primer sequences used for qRT-PCR analysis.....	51
Capítulo 2 Tabela Suplementar 1. Proteínas diferencialmente abundantes de plantas de tomateiro 24 horas após a inoculação com <i>Xep</i> em comparação com plantas inoculadas com solução salina.....	78
Capítulo 2 Tabela Suplementar 2. Proteínas diferencialmente abundantes de plantas de tomateiro 48 horas após a inoculação com <i>Xep</i> em comparação com plantas inoculadas com solução salina.....	80

LISTA DE FIGURAS

Página

- Capítulo 1 Figure 1.** Analysis of relative expression of S-genes in tomato leaves at 24 and 48 hours post *Xep* inoculation (hpi) compared to plants treated with saline solution. The asterisks indicate statistical significance of gene expression ($P \leq 0.05$)41
- Capítulo 1 Figure 2.** Bacterial spot disease control by ASO. **A)** Progress of disease symptoms on leaves treated with Random ASO and *SITFIIA* γ ASO captured at 12 and 15 days in April/2021, March/2022 and January/2023. **B)** Injured leaf area percentage at 12 and 15 days-post inoculation (dpi) in independent experiments performed in April/2021, March/2022 and January/2023. The asterisks indicate statistical significance by Student's *t*-test (ns, not significant, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ or *** $P \leq 0.001$)44
- Capítulo 1 Supplementary Figure 1.** Progress of disease symptoms on leaves treated with Random ASO and *SITFIIA* γ ASO captured at 12 and 15 days in independent experiments performed in A) April/2021, B) March/2022 and C) January/2023.....54
- Capítulo 2 Figura 1.** **A)** Análises de PCA, em cinza indicando cada proteína, pontos coloridos indicam o posicionamento de cada amostra, sendo que as cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam as réplicas biológicas (RB); Azul= grupo controle; roxo= Inoculado com *Xep*. **B)** Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e agrupamento de condições.....62
- Capítulo 2 Figura 2.** **A)** Análises de PCA, em cinza indicando cada proteína, pontos coloridos indicam o posicionamento de cada amostra, sendo que as cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam réplicas biológicas (RB); Azul= grupo controle; roxo= Inoculado com *Xep*. **B)** Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e agrupamento de condições.....62
- Capítulo 2 Figura 3.** Análise de ontologia gênica em 24 hai. **A)** Processos biológicos nos quais estão inseridas as DAPs das plantas inoculadas com *Xep* quando comparadas com a condição controle. **B)** Função molecular na qual estão inseridas as DAPs das plantas inoculadas com *Xep* quando comparadas com a condição controle.....64
- Capítulo 2 Figura 4.** Análise de ontologia genética em 48 hai. **A)** Processos biológicos nos quais estão inseridas as DAPs das plantas inoculadas com *Xep* quando comparadas com a condição controle. **B)** Função molecular na qual estão inseridas as DAPs das plantas inoculadas com *Xep* quando comparadas com a condição controle.....64
- Capítulo 3 Figura 1.** Construção do vetor de expressão contendo os componentes CRISPR/Cas9 para a edição gênica; **A)** Mapa do vetor B357p9ioR-35sCasWT contendo os cassetes dos componentes CRISPR/Cas, o cassete para o gene marcador de seleção de plantas *NPTII* (Neomicina fosfotransferase II) e o cassete para o gene marcador de seleção de bactérias espectinomomicina/estreptomicina entre as bordas do T-DNA; **B)** Gel de eletroforese dos produtos de amplificação para o gene da *Cas9* das colônias de *A. tumefaciens* transformadas.....102

Capítulo 3 Figura 2. Etapas para a obtenção das linhagens editadas. A) semeadura em meio MS; B) Explantes em meio de co-cultura; C-D) Gemas e brotos em meio de regeneração; E) Planta em meio de enraizamento; F) Planta aclimatada em substrato; G) Planta aclimatada em vaso produzindo frutos após 55 dias da aclimação; H) Produtos de amplificação do gene <i>Cas9</i> das linhagens obtidas.....	103
Capítulo 3 Figura 3. A) Eficiência das mutações gênicas induzidas por CRISPR/Cas9 nos locais alvos do gene <i>SITFIIAγ</i> . Nucleotídeos em vermelho representam a região <i>PAM</i> , nucleotídeos em azul representam a região <i>seed</i> conservada, nucleotídeos em roxo representam as substituições, nucleotídeo em verde representa a inserção e traços pretos representam as deleções; B e C) Natureza das mutações encontradas nas linhagens editadas.....	104
Capítulo 4 Figura 1. Mapa do vetor pBIN61 contendo os cassetes para superexpressão do gene <i>BoCHB4</i> em plantas de tomateiro.....	112
Capítulo 4 Figura 2. Etapas da regeneração de plantas de tomateiro transformadas. A) Plântulas em meio de germinação; B) Explantes em co-cultura sólida. C, D e E) Explantes em meio de seleção ao 15, 30 e 40 dias após a co-cultura, respectivamente; F) Planta em meio de enraizamento; G) Planta em processo de aclimação; H) Planta aclimatada com produção de frutos I) Produtos de amplificação em eletroforese em gel de agarose 1,5 %.....	116
Capítulo 4 Figura 3. Avaliação da resistência das plantas transgênicas a <i>S. sclerotiorum</i> . A) Sintomas induzidos por <i>S. sclerotiorum</i> em 24 hai; B) Percentual da severidade da doença em 24 hai.....	117

RESUMO GERAL

SOUSA, L.J. **Estratégias inovadoras visando resistência à mancha bacteriana do tomateiro**. 2024. 124p. Tese de Doutorado em Fitopatologia – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A mancha bacteriana é uma das principais doenças que reduzem a produtividade na cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). As principais medidas de controle da doença fazem o uso de produtos nocivos ao meio ambiente, além de aumentar o custo de produção. Dessa maneira, este estudo objetivou desenvolver estratégias inovadoras de controle que driblam essas dificuldades. Nesse sentido, estudou-se a expressão de genes relacionados com a suscetibilidade do tomateiro a *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*), bem como o silenciamento do gene *Transcription initiation factor IIA subunit 2 (gamma)* (*SITFIIA γ*) por meio de ASO (*short antisense deoxyoligonucleotide*). Os resultados de silenciamento do gene *SITFIIA γ* demonstraram que o tratamento com ASO promoveu melhor desempenho das plantas desafiadas com *Xep*, e portanto, esse gene foi selecionado para avaliação do seu nocaute por meio de CRISPR/Cas9. A análise das plantas de tomateiro transformadas revelou que houve edição gênica em sete linhagens T0, sendo cinco apresentando mutações bialélicas e duas quiméricas. Outra estratégia de controle estudada foi a superexpressão em tomateiro de um gene de defesa de *Brassica oleracea* que codifica para uma endoquitinase (*BoCHB4*). Após plantas transgênicas T2 serem submetidas a ensaio de resistência a *Xep*, não foi possível observar resistência a bactéria. Adicionalmente, as plantas foram desafiadas com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, e foi observado que dois eventos de transformação demonstraram maior capacidade de suportar o crescimento inicial do fungo. Isso pode estar relacionado com o efeito da superexpressão heteróloga da quitinase *BoCHB4* na parede celular fúngica. Além disso, o trabalho buscou por novos potenciais genes relacionados com a suscetibilidade por meio de uma abordagem proteômica. Foram identificadas nove proteínas que potencialmente contribuem para o desenvolvimento da doença. As proteínas diferencialmente abundantes foram principalmente relacionadas com o transporte de açúcar, resposta a estresses e geração de metabólitos e energia. O aprofundamento do estudo destas proteínas poderá proporcionar novos alvos para silenciamento e/ou nocaute gênico visando a resistência à mancha bacteriana.

Palavras-chave: Genes S, nocaute, Proteínas PR, Superexpressão, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

Orientador – Luiz Eduardo Bassay Blum – Universidade de Brasília

Co-orientadora – Angela Mehta dos Reis – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

ABSTRACT

SOUSA, L.J. **Innovative strategies aimed at resistance to bacterial spot of tomato.** 2024. 124p. Doctorate thesis in Plant Pathology – Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil.

Tomato bacterial spot is one of the main diseases of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) that reduces its crop production. The most common control measures include the use of chemical products that increase production costs and are harmful to the environment. In this context, this study aimed to develop innovative disease control strategies to overcome these difficulties. Firstly, we studied the gene expression of tomato plants susceptible to *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*) to identify susceptibility genes and conducted the *Transcription initiation factor IIA subunit 2 (gamma)* (*SITFIIA γ*) gene silencing by using the ASO (*short antisense deoxyoligonucleotide*) strategy. The results of the *SITFIIA γ* gene silencing demonstrated that ASO treatment promoted an enhanced resistance performance of infected plants with *Xep*. Therefore, this gene was selected for knockout in tomato plants using CRISPR/Cas9. The molecular analysis of the transformed tomato plants revealed that gene editing occurred in seven T0 lines, five of which were biallelic and two chimeric. Another control strategy applied in this study was the overexpression of a defense gene in tomato from *Brassica oleracea* that encodes an endochitinase (*BoCHB4*). The T2 transgenic lineages were subjected to an *Xep* resistance assay, and no resistance response was observed. Nevertheless, when these plants were inoculated with the *Sclerotinia sclerotiorum*, two transgenic *BoCHB4* lineages showed greater capacity to support the initial growth of the fungus, which might be related to the overexpression of the *B. oleraceae* chitinase on the fungi cell wall. Furthermore, in this study, we prospected for new potential genes related to susceptibility using proteomics approach. Nine proteins that potentially contribute to the development of the disease were identified. The differentially abundant proteins were mainly related to sugar transport, stress response, and generation of metabolites and energy. Further studies of these proteins may provide new targets for gene silencing and/or knockout aimed at resistance to bacterial spot.

Keywords: S Genes, Knockout, PR Protein, Overexpression, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

Guidance Committee: Luiz Eduardo Bassay Blum – Universidade de Brasília (Advisor),
Angela Mehta – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Co-advisor).

INTRODUÇÃO GERAL

A agricultura sofre inúmeras perdas de produção devido a diversos fatores, sendo as pragas e doenças um dos principais problemas, comprometendo cerca de 20 a 40 % da produção em todo o Mundo (FAO 2019). Estes problemas podem levar ao aumento da insegurança alimentar, uma vez que as perdas causam problemas de abastecimento e escassez de alimentos (Messer & Cohen 2007).

Além disso, o consumo de alimentos tende a aumentar nos próximos anos, devido ao crescimento populacional mundial que chegará a 9,9 bilhões de pessoas em 2050 (IISD 2020). Dessa forma, a agricultura precisa atender cada vez mais a demanda global por alimentos, e de forma alinhada à agricultura sustentável, com a redução do uso de agrotóxicos e sem aumentar o desmatamento de áreas de florestas (Garcia & Romeiro 2021; Putz *et al.* 2022).

O cultivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) faz o uso de vários agrotóxicos para o manejo de pragas e doenças, devido à falta de estratégias alternativas e eficientes para o controle (Lopes *et al.* 2021; MAPA 2022). Uma das doenças mais importantes da cultura é a mancha bacteriana, causada por várias espécies do gênero *Xanthomonas* (Barak *et al.* 2016). A doença apresenta várias dificuldades para o manejo, devido a resistência aos produtos comumente utilizados, como por exemplo os antibióticos e produtos à base de cobre, além disso, o patógeno apresenta alta variabilidade genética, que reflete na variabilidade patogênica e dificulta a obtenção de cultivares resistentes a essas diferentes espécies bacterianas (Abrahamian *et al.* 2021).

A variabilidade genética confere as bactérias várias maneiras para atacar o (s) hospedeiro (s) e conseguir êxito na patogenicidade, principalmente por meio da secreção de efetores, que possuem a capacidade de inibir as respostas iniciais de defesa do hospedeiro, além da modulação da expressão de determinados genes que conferem a suscetibilidade (Genes S), pois favorecem as condições ideais para colonização do patógeno (Newberry *et al.* 2019). Nesse sentido, o estudo dos mecanismos de patogenicidade da bactéria em tomateiro é bastante importante para que novas estratégias de resistência sejam implementadas.

Pensando nessa perspectiva, é possível gerar cultivares de tomateiro apresentando a perda de função dos genes S na planta, de maneira a não conceber um ambiente propício para a colonização para o patógeno (Koseoglou *et al.* 2022). A primeira etapa para isso, e que compreendem no primeiro e segundo capítulo da tese, é a seleção dos genes possivelmente envolvidos na suscetibilidade. Para isso, foram realizadas duas abordagens de estudo, uma que

visa a seleção de genes S que já foram descritos na literatura conferindo suscetibilidade a diferentes patógenos, para em seguida analisar a expressão gênica durante a interação entre *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*) e tomateiro. Além disso, no primeiro capítulo foi utilizada uma estratégia de silenciamento do gene *Transcription initiation factor IIA subunit 2 (gamma)* (*SITFIIA γ*) por meio de deoxyoligonucleotídeo antissenso (ASO) que demonstrou a expressão aumentada nas análises de RT-qPCR após a inoculação da bactéria. Essa estratégia emprega a aplicação foliar tópica do ASO e não demanda a transformação da planta, permitindo verificar de maneira rápida se o silenciamento foi eficiente para redução da doença causada por *Xep*. A outra abordagem é por meio da proteômica visando o estudo da interação de suscetibilidade do tomateiro e *Xep*, e que é eficiente para a identificação das proteínas do hospedeiro que possivelmente colaboram positivamente para o processo de colonização do patógeno.

A ferramenta CRISPR/Cas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein Cas*) tem sido utilizada para a edição de genomas visando o nocaute em genes de suscetibilidade para conferir resistência contra patógenos (Ortigosa *et al.* 2019). Nesse sentido, o terceiro capítulo compreendeu no nocaute do gene *SITFIIA γ* por meio de CRISPR/Cas para conferir a resistência contra *Xep*, uma vez que os estudos anteriores do silenciamento por meio do ASO demonstraram a redução dos sintomas da doença. Entretanto, a perda da função de genes da planta para conferir resistência à patógenos pode ser inviabilizada, pois alguns genes S desempenham outros papéis essenciais para o desenvolvimento das plantas. Um exemplo é a diminuição do tamanho dos frutos de tomate com mutação no gene *Downy Mildew Resistance 6 (DMR6)* (Thomazella *et al.* 2021). Essa dificuldade torna necessário os estudos de interação planta-patógeno visando a busca por genes S que não apresentam efeitos pleiotrópicos e de outras estratégias para o manejo genético da doença.

Neste cenário, a superexpressão de genes que codificam para as Proteínas Relacionadas à Patogênese (Proteínas PR) pode ser adotada com uma estratégia para conferir resistência múltipla a doenças, pois elas desempenham um papel fundamental no sistema de defesa das plantas contra múltiplos patógenos. Santos *et al.* (2019) identificaram uma maior abundância da proteína endoquitinase em plantas de *Brassica oleracea* resistentes a *Xanthomonas* quando comparado com a cultivar suscetível, além disso, a superexpressão do gene que codifica a proteína em planta modelo revelou que as plantas demonstraram resistência a bactéria. Nesse sentido, o quarto capítulo desta tese teve como objetivo a superexpressão do

gene codificador de Endoquitinase de *Brassica* em tomate, bem como o desafio das linhagens transgênicas contra *Xep* para a caracterização fenotípica, no entanto, não foi possível avaliar a resistência. Adicionalmente, verificou-se a resistência das linhagens transgênicas ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, visando avaliar o potencial para o controle de outras doenças.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A Cultura do Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma hortaliça originária dos Andes sul-americano que teve sua domesticação no México e posteriormente distribuído para outros continentes (Bai & Lindhout 2007). As plantas possuem uma ampla tolerância climática e são cultivadas em regiões tropicais e temperadas em todo o mundo (Hanssen & Lapidot 2012).

O tomateiro é pertencente à ordem Tubiflorae, família Solanaceae, gênero *Solanum* e espécie *Solanum lycopersicum* (Peralta *et al.* 2006). É uma planta herbácea, com folhas compostas, pecioladas e com número ímpar de folíolos (Acquaah 2019). Possui um sistema radicular pivotante e a maior parte das raízes estão concentradas numa profundidade do solo de até 20 cm (Salim *et al.* 2018). É uma planta diploide que se autopoliniza produzindo frutos de tamanho e formato variáveis, que são internamente divididos em lóculos nos quais se encontram as sementes imersas na mucilagem (White & Connolly 2011).

As plantas são perenes, embora podem ser cultivadas como anuais e apresentam hábito de crescimento indeterminado, em que o crescimento vegetativo continua mesmo após o início do florescimento, porém, algumas cultivares possui crescimento determinado, o que possibilita o cultivo para industrialização (Peralta *et al.* 2008). Os frutos do tipo Cereja, Saladete ou Italiano e Santa Cruz são os do tipo mesa, que são consumidos *in natura*, enquanto os utilizados para industrialização são os do tipo Industrial Salada. As principais finalidades na industrialização são para ketchup, molhos, sopas e frutas inteiras enlatadas (Reifschneider *et al.* 2015).

O cultivo do tomateiro está presente em mais de 169 países que somam um total de 186,8 milhões de toneladas produzidos em mais de 5 milhões de hectares, diante disso, é considerada a segunda hortaliça mais cultivada no Mundo, superada apenas pela da batata (FAOSTAT 2024). A produção brasileira em 2023 foi de 3.915,209 milhões de toneladas e produtividade média de 70,20 ton/ha, o que torna o país o oitavo maior produtor mundial (FAOSTAT 2024; IBGE 2024). Os maiores produtores nacionais são os estados de São Paulo

e Goiás, responsáveis por 26,55 % e 26,26 % da produção, respectivamente. Em São Paulo, a produtividade foi de 83,86 kg/ha, sendo que a maior parte é tomate estaqueado, destinado ao consumo *in natura*, em Goiás, a maior parte da produção é de tomate rasteiro, cultivado sob irrigação com produtividade média estimada em 77,7 kg/ha e essa produção é destinada às indústrias de polpa, enquanto (IBGE 2024).

A produção intensiva do tomateiro tem elevado a produtividade da cultura, embora os custos como por exemplo, com a adubação, irrigação, controle de pragas, tratamentos culturais também têm sido maiores (IBGE 2024). Vários fatores podem limitar a produção do tomateiro, como por exemplo, a adubação desequilibrada, falta de umidade no solo ou o excesso, ventos fortes e a ocorrência de pragas e doenças (Lopes & Ávila 2005; Teixeira *et al.* 2012). Lopes *et al.* (2021) relatam diversos patógenos que causam doenças na cultura do tomateiro e dentre os mais importantes da cultura estão as bactérias do gênero *Xanthomonas*.

1.2 Mancha bacteriana do tomateiro

A mancha bacteriana é uma das principais doenças que afetam a cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) em todo o Mundo (Jones *et al.* 2016). A taxonomia das espécies de *Xanthomonas* que infectam o tomateiro tem sido mudada ao longo dos anos (Barak *et al.* 2016). Recentemente, o sequenciamento completo de genomas tem esclarecido melhor a taxonomia e algumas espécies têm sido consideradas sinônimas e outras foram realocadas como patovares de outras espécies, dessa forma, *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (= *X. perforans*), *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (= *X. euvesicatoria*), *X. vesicatoria* e *X. hortorum* pv. *gardineri* (= *X. gardineri*) são consideradas o agente causal da mancha bacteriana do tomateiro e estão amplamente distribuídas em todo o mundo (Barak *et al.* 2016; Morinière *et al.* 2020). No Brasil, há relatos da presença das três espécies infectando tomateiro e as mais prevalentes são *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e *X. hortorum* pv. *gardineri*, que podem levar a perdas em torno de 40 % da produção (Quezado-Duval *et al.* 2014; Araújo *et al.* 2017).

A ocorrência da mancha bacteriana é favorecida pela umidade relativa entre 95 % e 100 % e temperaturas entre 22 °C e 28 °C (Barreto & Scalippi 2000). No entanto, Araújo *et al.* (2011) demonstraram que a *X. hortorum* pv. *gardineri* desenvolve melhor em locais com temperaturas de 20 °C, enquanto a *X. euvesicatoria* pv. *perforans* possui maior adaptabilidade em locais com temperaturas de 30 °C. A severidade da doença pode ser aumentada quando ocorre precipitação de chuva associada a ventos fortes e sistema de irrigação por aspersão, uma

vez que esses são fatores que aumentam a disseminação da bactéria, devido ao impacto das gotas de chuva nas folhas, as células bacterianas desalojam e forma gotículas contaminadas, as quais são transportadas pelo vento (Lindemann & Upper 1985; Quezado-Duval & Lopes 2010). Outros modos de disseminação da bactéria ocorrem por meio de mudas e sementes infectadas, instrumentos de podas e colheitas ou pelo próprio homem, além disso, as plantas daninhas e restos culturais tem sido importantes fontes de inóculo, devido à capacidade da bactéria em sobreviver no material infectado quando não há a presença de um hospedeiro suscetível (Newberry *et al.* 2019).

Ao entrar em contato com o tecido vegetal, a bactéria infecta por meio de estômatos ou ferimentos e alcançam o apoplasto, seguido do crescimento na câmara subestomática e multiplicação nos espaços intercelulares (Potnis *et al.* 2015). Em consequência da infecção, ocorre o aparecimento de lesões irregulares, que se tornam de marrom-escuras a pretas, com aparência encharcada em condições de alta umidade e podem apresentar halos amarelados (Lopes & Quezado-Duval 2021). Em alguns casos de infecção pela *X. euvesicatoria* pv. *perforans* pode manifestar o sintoma de “buraco de tiro”, em decorrência do decaimento do tecido morto do centro da lesão (Strayer-Scherer *et al.* 2019). Com o progresso dos sintomas em condições ideais para o patógeno, pode ocorrer a coalescência das lesões, que resultam numa extensa necrose e secagem das folhas, que favorece a queima dos frutos pelo sol (Quezado-Duval & Lopes 2010). Além dos sintomas nas folhas, a bactéria é capaz de infectar outras partes da planta, como caules, frutos, pétalas e flores (Jones *et al.* 2016).

O manejo da mancha bacteriana visa principalmente as práticas culturais como a utilização de sementes e mudas saudáveis, eliminação de restos culturais de tomate, pimenta e plantas voluntárias que possam ser hospedeiras secundárias, além da utilização da rotação de culturas com espécies não hospedeiras e de evitar o manuseio da cultura na ocorrência de umidade nas folhas (Abrahamian *et al.* 2021). O controle químico da doença tem sido feito com produtos à base de cobre, indutores de resistência como o acibenzolar-S-metil, com antibióticos, como por exemplo a casugamicina e com extrato de plantas e polissacarídeos (MAPA 2022).

1.3 Mecanismos de Patogenicidade de *Xanthomonas* em tomateiro

Durante o processo de interação planta-patógeno, as plantas percebem a presença dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como por exemplo o flagelo bacteriano por meio dos receptores de reconhecimento padrões (PRR), e esse reconhecimento leva a

imunidade desencadeada por PAMPs (PTI), entretanto, os efetores específicos do patógeno podem reconhecê-los e resultar numa interação de suscetibilidade (Yuan *et al.* 2021). Por outro lado, esses efetores podem ser fatores de avirulência quando as plantas possuem um gene de resistência (R), capaz de reconhecer e levar a imunidade desencadeada por efetores (ETI), resultando numa resposta de hipersensibilidade (HR). Em contrapartida, o patógeno desenvolve novos efetores ou perde os genes de avirulência para contornar a ETI e levar a suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) (Jones & Dangl 2006).

A interação patógeno-hospedeiro durante a colonização de tomateiro por *X. euvesicatoria* pv. *perforans* é bastante complexa e para o êxito na colonização da planta, a bactéria secreta fatores de virulência que são entregues pelos sistemas de secreção do tipo I, II, III, IV, V e VI em diferentes estágios do desenvolvimento da doença (Potnis *et al.* 2011; Abrahamian *et al.* 2021). Um dos mais importantes sistemas de secreção de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* é o T3SS, que é codificado pelo gene de resposta de hipersensibilidade e patogenicidade (*hrp*), que determina a patogenicidade e gama de hospedeiros (Bonas *et al.* 1991). Estas proteínas possuem a capacidade de atravessar a membrana plasmática celular e entregar os efetores do tipo III (White *et al.* 2009).

Vários estudos relatam efetores de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, entretanto, a quantidade exata é difícil de ser enumerada, devido a contínua perda e ganho de efetores nas diferentes populações da bactéria, além de ocorrer a perda da função do efector em razão da inserção de transposons (Timilsina *et al.* 2016; Klein-Gordon *et al.* 2020). Nesse sentido, os efetores são importantes para o resultado de uma interação com as plantas, sendo que a perda ou ganho de um efector pode levar a uma interação compatível, inclusive ao aumento da severidade ou ainda de incompatibilidade, como demonstrado por Schwartz *et al.* (2015) em que a perda dos efetores *AvrBsT* e *XopQ* de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* expandiu a patogenicidade para *Nicotiana benthamiana*, devido ao não reconhecimento da proteína efectora por um gene R, estes efetores estão relacionados com a supressão da sinalização de defesa precoce e ETI, respectivamente. Outros efetores secretados pelo T3SS são bastante importantes para inibir a PTI, como por exemplo o *XopX*, que além da supressão da resposta de defesa, também aumenta a expressão de genes relacionados ao etileno e morte celular (Stork *et al.* 2014).

Outros sistemas de secreção de *X. euvesicatoria* pv. *perforans* também desempenham papel fundamental na patogenicidade e sobrevivência da bactéria, como por exemplo o T5SS, que translocam efetores, adesinas, toxinas e ainda é responsável pela agregação das células

bacterianas e formação de biofilme (Alvarez-Martinez *et al.* 2021). O T2SS está envolvido na secreção de enzimas que degradam a parede celular, proteases, lipases e xilanases (Szczeny *et al.* 2010). O sistema de secreção T6SS foi demonstrado por Turner (2020) com importância na atividade antagonista contra a bactéria *Sphingomonas taxi* por meio da secreção de toxinas. Os demais sistemas de secreção estão presentes no genoma de *X. euvesicatoria* pv. *perforans*, porém a importância na virulência da bactéria ainda não foi elucidada e necessita de estudos (Abrahamian *et al.* 2021).

1.4 Estratégias promissoras para o manejo da mancha bacteriana

As medidas de controle mais eficazes para a mancha bacteriana utilizam produtos à base de cobre e antibióticos, no entanto, essas medidas podem se tornar ineficientes a longo prazo, devido à capacidade das bactérias em adquirir resistência a esses produtos (Quezado-Duval *et al.* 2003; Khanal *et al.* 2020). Nesse sentido, a resistência do hospedeiro tem sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de tomate, entretanto, ainda não há cultivares resistentes para o controle da mancha bacteriana (Potnis *et al.* 2015). A resistência convencional mediada por genes de resistência (R) possui várias limitações por depender de interações entre o gene de avirulência e o produto do gene R, podendo ser ineficiente até mesmo antes da implementação de uma cultivar resistente no campo, pois as bactérias podem obter novos efetores para não ocorrer o reconhecimento pelo gene R e dessa forma, causam a doença na planta (Gassmann *et al.* 2000).

Outras maneiras para alcançar a tolerância ou resistência das plantas a doenças é por meio do silenciamento e nocaute de genes de suscetibilidade (genes S). Os genes S desempenham papel negativo para as plantas e podem atuar de diferentes maneiras para o favorecer a colonização dos patógenos no hospedeiro (Koseoglou *et al.* 2022). O gene *Sugars Will Eventually Be Exported Transporters (SWEET)* é um dos mais estudados, que desempenha a função de transporte de açúcares do espaço intracelular para o apoplasto, colaborando para a nutrição de diferentes patógenos, como por exemplo, várias espécies de *Xanthomonas* em vários hospedeiros (Chen *et al.* 2010; Streubel *et al.* 2013; Cohn *et al.* 2014), bem como de fungos, como o *Botrytis cinerea* em videira (Chong *et al.* 2014). Outro gene S bastante estudado é o *Downy Mildew Resistance 6 (DMR6)*, que possivelmente regula negativamente as respostas de defesa de diferentes hospedeiros, favorecendo bactérias, oomicetos e fungos (Thomazella *et al.* 2021).

As estratégias visando a resistência mediada pela perda de função de genes S tem sido menos visado nos programas de melhoramento ao longo dos anos, devido à falta de acessibilidade às ferramentas biotecnológicas que visam a mutação gênica (Pavan *et al.* 2010). Além disso, é importante a identificação de genes S que não desempenham outras funções nas plantas para evitar os efeitos pleiotrópicos, como por exemplo, os genes *SWEET*, que são necessários para o desenvolvimento do pólen, secreção do néctar, resistência ao frio e estresse salino (Gautam *et al.* 2022). Nesse sentido, a identificação de novos fatores de suscetibilidade é de essencial importância para a implementação de cultivares resistentes a doenças. Uma abordagem que pode ser utilizada para a identificação de genes S é a proteômica, que detecta as alterações qualitativas e quantitativas, permitindo assim identificação de proteínas que potencialmente estão envolvidas com a suscetibilidade (Távora *et al.* 2021). Utilizando proteômica, Távora *et al.* (2022) identificaram maior abundância da proteína *DjA2* e *ERF104* em plantas de arroz suscetíveis a *Pyricularia oryzae* e alcançaram resistência das plantas por meio da perda da função gênica.

Tendo em vista o papel dos genes S para promover a suscetibilidade do hospedeiro, algumas estratégias podem ser utilizadas para alcançar a resistência das plantas (van Schie & Takken 2014). O uso de oligonucleotídeos antissenso (ASO) é uma estratégia que leva ao silenciamento e tem sido explorada na área farmacêutica, visando o tratamento de diversas doenças, entretanto, poucos trabalhos foram desenvolvidos visando o controle de doenças de plantas com essa estratégia (Kilanowska & Studzińska 2020; Távora *et al.* 2021). Recentemente, as tecnologias para a edição genoma evoluíram e se tornaram ferramentas biotecnológicas poderosas para a obtenção de plantas com interesse agrônomico, pois ferramentas como CRISPR/Cas permite a inserção de genes de interesse (knockin), bem como a deleção de bases nitrogenadas de um ou mais genes ao mesmo tempo, que leva a perda da função gênica (knockout) (Chen *et al.* 2019).

1.4.1 Oligonucleotídeos antissenso (ASO)

Os oligonucleotídeos antissenso (ASO) são sintetizados *in vitro* e são largamente utilizados para estudos de função gênica, pois a tecnologia permite a modulação da expressão gênica de maneira transiente, ou seja, não há a necessidade de geração de transgenes (Dinç *et al.* 2011). Os ASOs são pequenas sequências de ácido nucleico de DNA/RNA de fita única, em torno de 13 a 25 nucleotídeos e possuem a capacidade de ligação por hibridização de Watson-

Crick a uma sequência de mRNA complementar, impedindo a síntese da proteína que seria codificada (Miller & Harris 2016). Os ASOs possuem dois mecanismos distintos que levam a modulação da expressão gênica, a) por meio da ativação da RNase H por parte do organismo vivo para realizar a clivagem do heteroduplex mRNA:ASO; e b) por meio do bloqueio estérico do mRNA, prejudicando assim a progressão do *splicing* ou a maquinaria de tradução (Ward *et al.* 2014).

Um dos principais entraves para o uso comercial de ASOs no controle de doenças de plantas está relacionado com a estabilidade da molécula no ambiente intracelular, devido a ação de enzimas endonucleases (Eckstein 2014). Para contornar esse problema, Dinç *et al.* (2011) estudaram os efeitos da aplicação de oligonucleotídeos com modificações químicas do tipo fosforotioato (oligodeoxynucleotídeos) em plantas de *Arabidopsis thaliana* e constataram que essas modificações promoveram maior estabilidade intracelular da molécula, além da redução da expressão de genes específicos de *Blumeria graminis* f .sp. *hordei* e dos sintomas causados pelo patógeno em plantas de cevada. Távora *et al.* (2021) identificaram fatores de suscetibilidade de arroz para a ocorrência de brusone e aplicaram oligodeoxynucleotídeos visando o silenciamento de diferentes genes S, demonstrando que ocorreu o silenciamento e por consequência a redução da doença. A tecnologia de ASO também foi utilizada para o silenciamento de genes essenciais para o desenvolvimento de *Thrips palmi* e demonstrou grande potencial para causar a mortalidade dos insetos (Priti *et al.* 2022). Entretanto, ainda há muito espaço para pesquisas científicas visando o estabelecimento de concentrações da molécula para cada alvo específico, assim como outras estratégias para melhoria da estabilidade do ASO.

1.4.2 CRISPR/Cas

Diferentemente de outras técnicas para edição que usam enzimas, como por exemplo a *transcription activator like effector nucleases* (TALEN) e *zinc finger nucleases* (ZFNs), a tecnologia *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* de (CRISPR/Cas) utiliza uma endonuclease do tipo Cas acoplada a um RNA-guia (incluindo um motivo-protoespaçador-adjacente - PAM) para cortar precisamente qualquer sequência de DNA dupla fita de interesse (Jinek *et al.* 2012). Os componentes do sistema CRISPR/Cas são: o DNA que codifica para a proteína Cas e o RNA-guia (gRNA) com tamanho entre 20-22 nucleotídeos, ambos entregues por *Agrobacterium tumefaciens* gerando a transformação estável da planta (Lin *et al.* 2022).

O gRNA é entregue no núcleo celular e reconhece a sequência alvo por meio do emparelhamento de bases Watson-Crick, enquanto a enzima *Cas* faz a quebra da fita dupla de DNA. Essa quebra na fita dupla de DNA ativam os mecanismos de reparo celulares promovendo a junção de extremidades não-homólogas (NHEJ) ou reparo dirigido por homologas (HDR) (Jinek *et al.* 2012). A NHEJ simplesmente une as extremidades do DNA clivado, levando à introdução de pequenas exclusões e/ou inserções, chamadas de *indels*, que ao ocorrer no quadro de leitura do códon gera mutações levando ao nocaute de um gene específico (perda de função gênica). Já para a HDR é preciso haver um modelo idêntico ou muito parecido de uma sequência intacta, a fim de reparar o dano no DNA com precisão, permitindo introduzir mutações pontuais específicas ou inserção de sequências genéticas desejadas por meio de recombinação (Jain 2015).

Essa tecnologia foi empregada em tomateiro possibilitando o aumento de quatro a cinco vezes na produção de ácido gama-aminobutírico (GABA) nos frutos. O aminoácido pode ser benéfico para tratamento e prevenção da hipertensão arterial devido a sua capacidade neurotransmissora que bloqueia os impulsos entre as células nervosas do cérebro. Desde setembro de 2021 esses frutos têm sido comercializados no mercado e apresentam alta aceitabilidade da população japonesa, pois a tecnologia é livre de transgenes (Waltz 2022). O emprego da tecnologia CRISPR/Cas para o estudo e validação funcional de genes tem sido aplicado visando o controle de doenças, em várias espécies como por exemplo arroz (Távora *et al.* 2022), tomate (Thomazella *et al.* 2021), batata (Kieu *et al.* 2021), entre outros. Até o momento não há plantas editadas por essa tecnologia para o controle de doenças sendo comercializadas, embora espera-se que com o avanço das pesquisas e das legislações específicas para as novas tecnologias de melhoramento (NBTs) livres de transgenes, muito em breve a tecnologia CRISPR/Cas contribuirá para o controle mais eficaz de importantes fitopatógenos que causam prejuízos econômicos.

1.4.3 Superexpressão

A superexpressão gênica mediada por *Agrobacterium* é realizada pela transferência do material genético da bactéria para as plantas por meio do plasmídeo Ti (tumor-inducing), que possui duas regiões essenciais, a região do T-DNA que é responsável por indução de células tumorais no hospedeiro e a região de virulência, que codifica proteínas responsáveis pelo processo de transferência do T-DNA para a célula vegetal (Chilton *et al.* 1977; Zupan &

Zambryski 1995). Dessa forma, é possível substituir a região genômica do T-DNA que causa o tumor por uma sequência genômica de interesse que é superexpressa por um promotor, sendo o 35S do vírus *Cauliflower mosaic virus* (CMV 35S) o mais utilizado, pois é constitutivo e está ativo em vários estágios de desenvolvimento da planta (Odell *et al.* 1985). Além disso, é empregado ao plasmídeo um gene que confere resistência a um agente de seleção de transformação de planta com a finalidade de reduzir a regeneração das plantas não transformadas (Sundar & Sakthivel 2008). Diante dessas possibilidades, a superexpressão tornou-se uma ferramenta biotecnológica poderosa para contrabalancear a agressividade dos fitopatógenos, e por consequência as perdas de rendimento causadas por eles (Wally & Punja 2010).

A superexpressão dos genes que codificam para as Proteínas PR permitiu a elucidação da função gênica em plantas submetidas a diferentes tipos de estresses bióticos e abióticos e demonstrou ser eficiente para aumentar a resistência contra inúmeros patógenos (Patkar & Chattoo 2006; Chandrasekaran & Chun 2016; Santos *et al.* 2019; Li *et al.* 2021). A superexpressão dessas proteínas podem ser uma estratégia alternativa para a resistência conferida por genes R ou silenciamento de genes S, pois o aumento dessas proteínas está relacionado com várias cascatas de sinalização que levam a defesa das plantas (Ali *et al.* 2018). Dessa maneira, esses genes podem ser incorporados em plantas para melhorar a defesa das plantas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Aplicar estratégias biotecnológicas inovadoras para o manejo da mancha bacteriana do tomateiro.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar fatores de suscetibilidade de tomateiro a *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* utilizando diferentes abordagens;
- Validar um fator de suscetibilidade por meio de *antisense oligodeoxynucleotide* (ASO);
- Nocautear um gene de suscetibilidade por meio de CRISPR/Cas;

- Superexpressar o gene de defesa *BoCHB4* que codifica uma Endoquitinase de *Brassica oleracea* para conferir resistência múltipla a doenças do tomateiro.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahamian P, Klein-Gordon JM, Jones JB, Vallad GE (2021) Epidemiology, diversity, and management of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas perforans*. *Applied Microbiology Biotechnology* 105:6143–6158. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11459-9>

Acquaah G (2019) *Horticulture: Principles and Practices*, 4th edn. Pearson Prentice Hall.

Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Islam ST, Mushtaq M, Yadav P, Rawat S, Grover A (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiology Research* 212–213:29–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>

Alvarez-Martinez CE, Sgro GG, Araujo GG, Paiva MRN, Matsuyama BY, Guzzo CR, Andrade MO, Farah CS (2021) Secrete or perish: The role of secretion systems in *Xanthomonas* biology. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19:279–302. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.12.020>

Araújo E, Pereira RC, Ferreira M, Café-Filho A, Moita A, Quezado-Duval AM (2011) Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. *Acta Horticulturae* 914:39–42. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.914.3>

Araújo ER, Costa JR, Ferreira MAS V, Quezado-Duval AM (2017) Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. *Plant Pathology* 66:159–168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppa.12543>

Bai Y, Lindhout P (2007) Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Annals of Botany* 100:1085–1094. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm150>

Barak JD, Vancheva T, Lefeuvre P, Jones JB, Timilsina S, Minsavage G V, Vallad GE, Koebnik R (2016) Whole-Genome Sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* Strains Clarify Taxonomy and Reveal a Stepwise Erosion of Type 3 Effectors. *Frontiers in Plant Science* 7.

Barreto M, Scaloppi EA. (2000) Sistema de Previsão de Doenças de Hortaliças. In: Zambolim L (ed) Manejo integrado doenças, pragas e plantas daninhas. Viçosa, pp 169–189

- Bonas U, Schulte R, Fenselau S, Minsavage G V., Staskawicz BJ, Stall RE (1991) Isolation of a Gene Cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that Determines Pathogenicity and the Hypersensitive Response on Pepper and Tomato. *Molecular plant-microbe Interactions* 4:81–88. <https://doi.org/10.1094/MPMI-4-081>
- Chandrasekaran M, Chun SC (2016) Expression of PR-protein genes and induction of defense-related enzymes by *Bacillus subtilis* CBR05 in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants challenged with *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 80:2277–2283. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1206811>
- Chen K, Wang Y, Zhang R, Zhang H, Gao C (2019) CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annual Review of Plant Biology* 70:667–697. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049>
- Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468:527–532. <https://doi.org/10.1038/nature09606>
- Chilton M-D, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11:263–271. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90043-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90043-5)
- Chong J, Piron M-C, Meyer S, Merdinoglu D, Bertsch C, Mestre P (2014) The *SWEET* family of sugar transporters in grapevine: *VvSWEET4* is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*. *Journal of Experimental Botany* 65:6589–6601. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru375>
- Cohn M, Bart RS, Shybut M, Dahlbeck D, Gomez M, Morbitzer R, Hou B-H, Frommer WB, Lahaye T, Staskawicz BJ (2014) *Xanthomonas axonopodis* Virulence Is Promoted by a Transcription Activator-Like Effector–Mediated Induction of a *SWEET* Sugar Transporter in Cassava. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 27:1186–1198. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-14-0161-R>
- Dinç E, Tóth SZ, Schansker G, Ayaydin F, Kovács L, Dudits D, Garab G, Bottka S (2011) Synthetic Antisense Oligodeoxynucleotides to Transiently Suppress Different Nucleus- and Chloroplast-Encoded Proteins of Higher Plant Chloroplasts. *Plant Physiology* 157:1628 LP – 1641. <https://doi.org/10.1104/pp.111.185462>

- Eckstein F (2014) Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics* 24:374–387
- FAO (2019) New standards to curb the global spread of plant pests and diseases. <https://www.fao.org/news/story/en/item/1187738/icode/>. Accessed 16 May 2022
- FAOSTAT ODNUPAAEAA (2024) Área colhida, rendimento e produção nos principais países produtores de tomate. <http://faostat.fao.org>. Accessed 15 April 2024.
- Garcia JR, Romeiro AR (2021) Brazilian agriculture: challenges in front of environmental restriction. *Revista Terceira Margem Amazônia* 7:33–53. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.36882/2525-4812.2021v7i17.p33-53>
- Gassmann W, Dahlbeck D, Chesnokova O, Minsavage G V, Jones JB, Staskawicz BJ (2000) Molecular evolution of virulence in natural field strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Bacteriology* 182:7053–7059. <https://doi.org/10.1128/JB.182.24.7053-7059.2000>
- Gautam T, Dutta M, Jaiswal V, Zinta G, Gahlaut V, Kumar S (2022) Emerging Roles of SWEET Sugar Transporters in Plant Development and Abiotic Stress Responses. *Cells* 11.
- Hanssen IM, Lapidot M (2012) Chapter 2 - Major Tomato Viruses in the Mediterranean Basin. In: Loebenstein G, Lecoq HBT-A in VR (eds) *Viruses and Virus Diseases of Vegetables in the Mediterranean Basin*. Academic Press, pp 31–66
- IBGE (2024) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola. Brasília.
- IISD II para o DS (2020) World Population to Reach 9.9 Billion by 2050. <https://sdg.iisd.org/news/world-population-to-reach-9-9-billion-by-2050/>
- Jain M (2015) Function genomics of abiotic stress tolerance in plants: a CRISPR approach. *Frontiers in Plant Science* 6.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jones JB, Zitter TA, Momol TM, Miller SA (2016) *Compendium of Tomato Diseases and Pests*, Second Edition, 2a edition. The American Phytopathological Society, Austin.

- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Khanal S, Hind SR, Babadoost M (2020) Occurrence of Copper-Resistant *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* in Illinois Tomato Fields. *Plant Health Progress* 21:338–344. <https://doi.org/10.1094/PHP-06-20-0048-RS>
- Kieu NP, Lenman M, Wang ES, Petersen BL, Andreasson E (2021) Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. *Scientific Reports* 11:4487. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w>
- Kilanowska A, Studzińska S (2020) In vivo and in vitro studies of antisense oligonucleotides – a review. *RSC Advances* 10:34501–34516. <https://doi.org/10.1039/D0RA04978F>
- Klein-Gordon JM, Xing Y, Garrett KA, Abrahamian P, Paret ML, Minsavage G V, Strayer-Scherer AL, Fulton JC, Timilsina S, Jones JB, Goss EM, Vallad GE (2020) Assessing Changes and Associations in the *Xanthomonas perforans* Population Across Florida Commercial Tomato Fields Via a Statewide Survey. *Phytopathology* 111:1029–1041. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0402-R>
- Koseoglou E, van der Wolf JM, Visser RGF, Bai Y (2022) Susceptibility reversed: modified plant susceptibility genes for resistance to bacteria. *Trends in Plant Science* 27:69–79. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.07.018>
- Li S, Wang Z, Tang B, Zheng L, Chen H, Cui X, Ge F, Liu D (2021) A Pathogenesis-Related Protein-Like Gene Is Involved in the *Panax notoginseng* Defense Response to the Root Rot Pathogen. *Frontiers in Plant Science* 11.
- Lin C-S, Hsu C-T, Yuan Y-H, Zheng P-X, Wu F-H, Cheng Q-W, Wu Y-L, Wu T-L, Lin S, Yue J-J, Cheng Y-H, Lin S-I, Shih M-C, Sheen J, Lin Y-C (2022) DNA-free CRISPR-Cas9 gene editing of wild tetraploid tomato *Solanum peruvianum* using protoplast regeneration. *Plant Physiology* 188:1917–1930. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac022>
- Lindemann J, Upper CD (1985) Aerial Dispersal of Epiphytic Bacteria over Bean Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 50:1229–1232. <https://doi.org/10.1128/aem.50.5.1229-1232.1985>

- Lopes CA, Ávila AC de (2005) Doenças do Tomateiro, 2nd edn. Embrapa Hortaliças, Brasília. 151p.
- Lopes CA, Quezado-Duval AM (2021) Doenças causadas por bactérias. In: Lopes CA (ed) Doenças do tomateiro, 3rd edn. Embrapa Hortaliças, Brasília, p 73–101.
- Lopes CA, Reis A, Inoue-Nagata AK, Quezado-Duval AM, Lopes CA, Henz GP, Pinheiro JB, Boiteux LS, Lima MF, Melo PCT de, Junior VL (2021) Doenças do tomateiro, 3rd edn. Brasília. 221p.
- MAPA (2022) Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - AGROFIT. https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Accessed 17 May 2022
- Messer E, Cohen MJ (2007) Conflict, Food Insecurity and Globalization. *Food, Culture and Society* 10:297–315. <https://doi.org/10.2752/155280107X211458>
- Miller CM, Harris EN (2016) Antisense Oligonucleotides: Treatment Strategies and Cellular Internalization. *RNA Dis (Houston, Tex)* 3. <https://doi.org/10.14800/rd.1393>
- Morinière L, Burlet A, Rosenthal ER, Nesme X, Portier P, Bull CT, Lavire C, Fischer-Le Saux M, Bertolla F (2020) Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach reveals that *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 emend. Timilsina et al. 2019 is a later heterotypic synonym of *Xanthomonas hortorum* Vauterin e. *Systematic and Applied Microbiology* 43:126087. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126087>
- Newberry EA, Bhandari R, Minsavage G V, Timilsina S, Jibrin MO, Kemble J, Sikora EJ, Jones JB, Potnis N (2019) Independent Evolution with the Gene Flux Originating from Multiple *Xanthomonas* Species Explains Genomic Heterogeneity in *Xanthomonas perforans*. *Applied and Environmental Microbiology* 85. <https://doi.org/10.1128/AEM.00885-19>
- Odell JT, Nagy F, Chua N-H (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313:810–812. <https://doi.org/10.1038/313810a0>
- Ortigosa A, Gimenez-Ibanez S, Leonhardt N, Solano R (2019) Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of *SlJAZ2*. *Plant Biotechnology Journal* 17:665–673. <https://doi.org/10.1111/pbi.13006>

- Patkar RN, Chattoo BB (2006) Transgenic indica Rice Expressing ns-LTP-Like Protein Shows Enhanced Resistance to Both Fungal and Bacterial Pathogens. *Molecular Breeding* 17:159–171. <https://doi.org/10.1007/s11032-005-4736-3>
- Pavan S, Jacobsen E, Visser RGF, Bai Y (2010) Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding* 25:1–12. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9323-6>
- Peralta IE, Knapp S, Spooner DM (2006) Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Tomato Genetic Cooperative Report* 56.
- Peralta IE, Spooner D, Knapp S (2008) Taxonomy of Wild Tomatoes and Their Relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). *Systematic Botany Monographs* 84:1–186. <https://doi.org/10.2307/25027972>
- Potnis N, Krasileva K, Chow V, Almeida NF, Patil PB, Ryan RP, Sharlach M, Behlau F, Dow JM, Momol MT, White FF, Preston JF, Vinatzer BA, Koebnik R, Setubal JC, Norman DJ, Staskawicz BJ, Jones JB (2011) Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. *BMC Genomics* 12:146. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-146>
- Potnis N, Timilsina S, Strayer A, Shantharaj D, Barak JD, Paret ML, Vallad GE, Jones JB (2015) Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology* 16:907–920. <https://doi.org/10.1111/mpp.12244>
- Priti, Mukherjee SK, Ghosh A (2022) Silencing of *Thrips palmi* *UHRF1BP1* and *PFAS* Using Antisense Oligos Induces Mortality and Reduces *Tospovirus* Titer in Its Vector. *Pathogens* (Basel, Switzerland) 11. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111319>
- Putz FE, Romero C, Sist P, Schwartz G, Thompson I, Roopsind A, Medjibe V, Ellis P (2022) Sustained timber yield claims, considerations, and tradeoffs for selectively logged forests. *PNAS Nexus* 1:pgac102. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac102>
- Quezado-Duval A, Nascimento A, Pontes N, Moita A, Assunção A, Golynski A, Inoue-Nagata A, Oliveira R, Castro Y, Melo B (2014) Desempenho de híbridos de tomate para processamento industrial em pressão de begomovirose e de mancha-bacteriana. *Horticultura Brasileira* 32:446–452. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620140000400012>

- Quezado-Duval AM, Gazzoto Filho A, Leite Júnior RP, Camargo LEA (2003) Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial. *Horticultura Brasileira* 21:670–675. <https://doi.org/10.1590/s0102-05362003000400020>
- Quezado-Duval AM, Lopes CA (2010) Mancha-bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria. 24p.
- Reifschneider FJB, Nass LL, Gl ANA, Heinrich U, Ribeiro USC, Henz GP, Euclides K, Boiteux LS, Ritschel P, Ferraz RM, Quecini V (2015) Um Pitada de Diversidade Na Mesa Dos Brasileiros, 1a edição. Embrapa, Brasília/DF. 97p.
- Salim M, Rashid H, Hossain M, Zakaria M (2018) Morphological characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes. *Journal of the Saudi Society Agricultural Science* 19. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2018.11.001>
- Santos C, Nogueira FCS, Domont GB, Fontes W, Prado GS, Habibi P, Santos VO, Oliveira-Neto OB, Grossi-de-Sá MF, Jorrín-Novo J V., Franco OL, Mehta A (2019) Proteomic analysis and functional validation of a *Brassica oleracea* endochitinase involved in resistance to *Xanthomonas campestris*. *Frontiers in Plant Science* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00414>
- Schwartz AR, Potnis N, Timilsina S, et al (2015) Phylogenomics of *Xanthomonas* field strains infecting pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity. *Frontiers Microbiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00535>
- Stork W, Kim J-G, Mudgett MB (2014) Functional Analysis of Plant Defense Suppression and Activation by the *Xanthomonas* Core Type III Effector *XopX*. *Mol Plant-Microbe Interaction* 28:180–194. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0263-R>
- Strayer-Scherer A, Liao Y-Y, Abrahamian P, Timilsina S, Paret M, Momol T, Jones JB, Vallad G (2019) Integrated Management of Bacterial Spot on Tomato in Florida. Gainesville.
- Streubel J, Pesce C, Hutin M, Koebnik R, Boch J, Szurek B (2013) Five phylogenetically close rice *SWEET* genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *New Phytologist* 200:808–819. <https://doi.org/10.1111/nph.12411>
- Sundar IK, Sakthivel N (2008) Advances in selectable marker genes for plant transformation. *J Plant Physiology* 165:1698–1716. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.08.002>

- Szczesny R, Jordan M, Schramm C, Schulz S, Cogež V, Bonas U, Büttner D (2010) Functional characterization of the *Xcs* and *Xps* type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *New Phytologist* 187:983–1002. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03312.x>
- Távora FTPK, Bevitori R, Mello RN, Cintra MMDF, Oliveira-Neto OB, Fontes W, Castro MS, Sousa M V, Franco OL, Mehta A (2021) Shotgun proteomics coupled to transient-inducible gene silencing reveal rice susceptibility genes as new sources for blast disease resistance. *Journal of Proteomics* 241:104223. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104223>
- Távora FTPK, Meunier AC, Vernet A, Portefaix M, Milazzo J, Adreit H, Tharreau D, Franco OL, Mehta A (2022) CRISPR/Cas9-Targeted Knockout of Rice Susceptibility Genes *OsDjA2* and *OsERF104* Reveals Alternative Sources of Resistance to *Pyricularia oryzae*. *Rice Science* 29:535–544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rsci.2022.04.001>
- Teixeira FMV, Clemente, Boiteux LS (2012) Produção de tomate para processamento industrial, 1a edição. Embrapa, Brasília/DF. 344p.
- Thomazella DP de T, Seong K, Mackelprang R, Dahlbeck D, Geng Y, Gill US, Qi T, Pham J, Giuseppe P, Lee CY, Ortega A, Cho M-J, Hutton SF, Staskawicz B (2021) Loss of function of a *DMR6* ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2026152118>
- Timilsina S, Abrahamian P, Potnis N, Minsavage G V, White FF, Staskawicz BJ, Jones JB, Vallad GE, Goss EM (2016) Analysis of Sequenced Genomes of *Xanthomonas perforans* Identifies Candidate Targets for Resistance Breeding in Tomato. *Phytopathology* 106:1097–1104. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-16-0119-FI>
- Turner AD (2020) Exploring Interactions of Phyllosphere Epiphytes with Plant Pathogenic Bacteria *Pseudomonas* and *Xanthomonas* on Tomato. Columbus State University.
- van Schie CCN, Takken FLW (2014) Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annu Review in Phytopathology* 52:551–581. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045854>
- Wally O, Punja ZK (2010) Genetic engineering for increasing fungal and bacterial disease resistance in crop plants. *GM Crops* 1:199–206. <https://doi.org/10.4161/gmcr.1.4.13225>

- Waltz E (2022) GABA-enriched tomato is first CRISPR-edited food to enter market. *Nature Biotechnology* 40:9–11
- Ward AJ, Norrbom M, Chun S, Bennett CF, Rigo F (2014) Nonsense-mediated decay as a terminating mechanism for antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* 42:5871–5879
- White FF, Potnis N, Jones JB, Koebnik R (2009) The type III effectors of *Xanthomonas*. *Molecular Plant Pathology* 10:749–766. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00590.x>
- White R, Connolly B (2011) *Breeding Organic Vegetables: A Step-by-Step Guide for Growers*
- Yuan M, Ngou BPM, Ding P, Xin X-F (2021) PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 62:102030. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102030>
- Zupan JR, Zambryski P (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology* 107:1041–1047. <https://doi.org/10.1104/pp.107.4.1041>

CAPÍTULO 1

CONTROLE DE *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* POR MEIO DE OLIGODEOXYNUCLEOTÍDEOS ANTISSENSE (ASO)

Expression of tomato susceptibility genes triggered by *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* and disease control by short antisense oligodeoxynucleotide gene silencing

ABSTRACT

Sources of durable resistance against bacterial spot of tomato have been prioritized for disease management. However, traditional resistance through resistance genes is scarce and does not always confer a broad and lasting protection to this disease. An alternative is a recessive resistance, mediated by mutation or silencing of host genes that confer susceptibility, known as S-genes. Some bacterial pathogens induce the expression of such genes to promote host colonization, and their identification is necessary to implement alternative management strategies, such as short antisense oligodeoxynucleotides (ASOs) capable of silencing a specific target gene. The approach taken in this study helps to understand the behavior of S-genes during the interaction of tomato with *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*). We compared the expression pattern of 17 S-genes selected from the literature in response to others pathogen infections, including *Transcription initiation factor IIA subunit 2 (gamma)* (*SITFIIA* γ), Defense No Death 1 (*DND1*) and several *Sugars Will Eventually Be Exported Transporters* (*SWEET*), that have not been shown yet as tomato S-genes during *Xep* interaction. Our data reveal that the expression of several putative host S-genes was positively modulated during bacterial infection. In addition, we showed that an ASO targeting the *SITFIIA* γ gene remarkably improved plant resistance against bacterial attack.

Keywords: Gene expression, Bacterial spot, Recessive resistance, S-genes

1. INTRODUCTION

Bacterial spot is one of the main diseases, which affects tomato crops (*Solanum lycopersicum* L.), causing losses in productivity and fruit quality (Jones *et al.* 2016). The disease is known to be devastating in the rainy season and in sprinkler irrigated crops, due to bacterial cells dispersion provided by water drop (Quezado-Duval & Lopes 2010). The taxonomic classification of *Xanthomonas* that infects tomato crops has changed over the years and previously different *Xanthomonas* species were grouped as single species as they were considered synonymous but distinguished in different pathovars (Osdaghi *et al.* 2021). Currently, *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*), *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (*Xee*), *X.*

vesicatoria (*Xv*), and *X. hortorum* pv. *gardineri* (*Xhg*) are considered the causal agents of bacterial spot disease, with *Xep* being the most widespread in Brazil (Barak *et al.* 2016; Araújo *et al.* 2016; Morinière *et al.* 2020).

Several *Xanthomonas* species induce host susceptibility genes (S-Genes) by TALEs (Transcription activator-like effectors) that are injected into host cells by the T3SS (Type III secretion system), where they translocate to the nucleus and bind specifically to S-gene promoter sequences (Boch & Bonas 2010; Muñoz Bodnar *et al.* 2013). TALEs consist of an N-terminal T3SS signal, a central DNA binding domain, nuclear localization signals, and a C-terminal region that is required for transcriptional activation (Mak *et al.* 2012). DNA binding domain is formed by several tandem repeats of 34–35 aa, conserved, except for the 12th and 13th amino acids of each repeat, which are termed repeat-variable diresidue (RVD) (Boch & Bonas 2010). The RVD targets and specifically binds an individual nucleotide residue of the targeted host gene promoter, defined as effector binding element (EBE) (Moore *et al.* 2014).

S-genes can play a negative role in plants, since they encode proteins that are essential for pathogen colonization process and act in different ways (van Schie & Takken 2014). This includes the *Sugars Will Eventually Be Exported Transporters* (*SWEET*) protein-coding genes, which facilitate the sugars efflux to the apoplast, contributes to the nutrition of pathogens (Gupta *et al.* 2021), and several of which are known to be targeted by TALEs during *Xanthomonas* infection in rice (Streubel *et al.* 2013) and cassava (Cohn *et al.* 2014). *SWEET* genes can also be regulated by the production of reactive oxygen species due to infection by necrotrophic fungi, facilitating the sugar acquisition (Chong *et al.* 2014). Other examples of S genes include Defense No Death 1 (*DND1*) and Downy Mildew Resistance 6 (*DMR6*) genes that possibly downregulate plant defense signaling in potato and tomato, respectively (Sun *et al.* 2016; Thomazella *et al.* 2021). Another putative S-gene whose expression is induced by pathogens is *Transcription initiation factor IIA subunit 2 (gamma)* (*TFIIA γ*). *TFIIA γ* interacts with other transcriptional regulatory proteins that bind to the TATA box site of promoters to form a pre-initiation complex (Huang *et al.* 2017). The *TFIIA γ* susceptibility gene has already been described in others plant pathogen interactions, such as rice (Tian *et al.* 2019), tomato, pepper and citrus (Huang *et al.* 2017).

Given the importance of susceptibility genes in host colonization process by pathogens, the knockout or silencing of susceptibility genes confers the recessive resistance and may be a promising alternative for disease control (Pavan *et al.* 2010). Several studies show the

advantage of this type of strategy for disease control due to the potential of conferring lasting resistance independently of the bacterial strains and across multiple pathogen species (Ortigosa *et al.* 2019; Zeng *et al.* 2020; Tripathi *et al.* 2021). For instance, gene silencing can be achieved by delivering single-stranded DNA antisense molecules such as short antisense oligodeoxynucleotides (ASO) targeting homologous sequences in (pre-) mRNA transcripts to negatively impact (knockdown) the expression of a gene of interest. This technology has the advantage of not being integrative and therefore transgene free, that is, it has an episomal and post-transcriptional action (Kilanowska & Studzińska 2020).

In this regard, the present study was carried out to first analyze the relative expression of 17 putative S-genes during infection of tomato plants inoculated with *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*). Among the upregulated tomato genes in *Xep* infected plants, we identified *SITFIIA γ* as an interesting S-gene candidate, which was selected as target for ASO gene silencing and further evaluation of plant resistance against bacterial spot disease.

2. MATERIALS AND METHODS

Plant material and bacterial strains

For quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR), three weeks old tomato plants cv. Santa Cruz were cultivated in a non-climatized greenhouse and inoculated with *Xep* or saline solution (0.85% NaCl). Three replicates for each treatment were performed and each replicate consisted of 3 plants. The *Xep* strain was obtained from Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, Brazil and cultivated in Nutrient Yeast Glycerol (NYG) complex culture medium for 48 h at 28 °C. The bacterial cells were resuspended in a saline solution (0.85% NaCl) and the concentration of the bacterial suspension was adjusted to OD₆₀₀ = 0.3 (~10⁸ CFU/mL). Plant inoculation was conducted by infiltrating the bacterial suspension using a syringe without a needle in two places of each tomato leaf. All plants were kept inside a humid chamber until the end of the bioassay. A total of three leaves per replicate were collected at 24 and 48 hours post-inoculation (hpi) and preserved at -80 °C until further use.

Gene selection and qRT-PCR primer design

The putative S-genes investigated in the present tomato-*Xep* study were selected from previously identified S-genes involved in disease susceptibility in different host species

(**Supplementary Table 1**) (Streubel *et al.* 2013; Huang *et al.* 2017; Sun *et al.* 2017; Thomazella *et al.* 2021). The search for gene orthologs in tomato was performed using *Plaza 4.5 Dicots* (https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza_v4_5_dicots/). Primers for qRT-PCR were designed with *primer 3 Plus* (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) platform and the exclusion of the amplification of non-specific products was evaluated using *OligoAnalyzer 3.1* (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?returnurl=%2Fcalc%2Fanalyze>). Moreover, primer specificity for PCR amplification was evaluated using the *In silico PCR tool* from *Sol Genomics* (https://solgenomics.net/tools/in_silico_pcr).

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from tomato leaves with the Trizol reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA integrity was verified in 1% agarose gel electrophoresis and RNA quantification was measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher). To eliminate possible contamination with genomic DNA, 4 μg of RNA was treated with DNase I enzyme (Invitrogen) and used for cDNA synthesis with GoScript Reverse Transcription System (Promega) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was diluted forty-fold and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent use.

qRT-PCR assays

qRT-PCR experiments were carried out on a 7300 96 well Real-Time PCR Systems thermocycler (Applied Biosystems), using three technical replicates for each of the three biological replicates. Negative controls (without cDNA template) were also included. Each reaction consisted of 10 μL of final volume, with 5 μL of Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 0.2 μM of each specific primer (**Supplementary Table 1**), 2 μL of cDNA and 2.6 μL of RNase-free ddH₂O for each analyzed sample. The PCR program used included an initial hold for 2 min at $52\text{ }^{\circ}\text{C}$, denaturation for 10 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by 40 cycles consisting of 15s at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for denaturation, followed by 60s at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for annealing and extension. The software REST was used to perform the expression analysis and statistics using

the quantification cycle values (C_q), and the normalization of relative cDNA amounts was performed using *Methylated histone binding (PHD)* and *Small nuclear ribonucleoprotein family protein (LSM7)* (**Supplementary Table 1**), that are constitutively expressed tomato genes validated (Müller *et al.* 2015; Pfaffl *et al.* 2017). The evaluation of PCR efficiencies was carried out using the LinReg PCR software, and Relative cDNA levels between the treatments were assessed using average comparisons on REST software evaluating if differences were significant through a *t*-test.

ASO design and gene silencing assay

Based on gene expression results, we selected *SITFIIA γ* as a target candidate for gene silencing with ASO as described in Távora *et al.* (Távora *et al.* 2021), with some modifications. The CDS sequence for *SITFIIA γ* was retrieved from the Tomato Genome Sequencing Project (https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome). The design of ASOs was performed using the web-based Sfold software (available at <http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/soligo.pl>). Phosphorothioate chemical modifications (*) were added to 2 nucleotides in both 5' and 3' ends of the synthesized ASO sequence. Short antisense oligodeoxynucleotide (19 nt) presenting the highest probability of causing silencing of our target was selected (SITFIIA γ ASO: T*A*ACGCGGTAAACAGTC*T*C). The specificity to the target transcript was analyzed through an alignment against tomato genome and transcriptome database using BLASTN tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). A Random nonsense ASO (Random ASO: C*T*TTTCCTATACGCGGC*T*T) with no complementary sequence in tomato Ref_seq RNA database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) was designed and used as a negative control. ASOs were purchased from Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/>). For each leaf tested, 4 x 300 μ L ASOs [10 μ M] were infiltrated at 4 different locations on the adaxial surface of leaves of four-week-old plants using a needleless syringe. Twenty-four hours after ASO infiltration, plants were spray-inoculated with *Xep* (OD = 0.3) and immediately placed in a humid chamber for 48h. Evaluations were repeated three times in a non-climatized greenhouse. The severity of foliar symptoms was compared between leaves infiltrated with *SITFIIA γ* and Random ASO. Three leaves for each of three plants were included for each treatment (N=9), and this was repeated in three independent experiments carried out in April 2021, March 2022, and January 2023. The leaves were photographed to evaluate the foliar symptoms and measurement of necrotic spots at 7, 12, 15, and 20 days post-infiltration (dpi).

Since it was established that the symptoms were too incipient at 7 dpi while senescence symptoms were observed at 20 dpi, the percentage of injured leaf area was measured only at 12 and 15 dpi. The quantification of injured leaf area was conducted with QUANT (Vale *et al.* 2003). Data were analyzed using GraphPad Prism 9 (<https://www.graphpad.com/>) with ANOVA statistics followed by Student's *t*-test (P value ≤ 0.05).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Susceptibility genes are fundamental to the full-pathogenesis process of many and varied phytopathogen species and are often conserved between different crops. Hence, we evaluated the relative expression of *SWEET* genes and other known S-genes in tomato (*S. lycopersicum* cv. Santa Cruz) plant leaves after bacterial inoculation. We designed primers for 30 tomato *SWEET* genes (*SISWEET*) that were previously described in the literature, of which only 14 were successfully amplified and analyzed by qRT-PCR (**Supplementary Table 1**). We also evaluated the relative expression of three other S-genes, including *SIDND1*, *SITFIIA γ* and *SIDMR6*. *SIDMR6* has been well characterized as involved in the susceptibility to *Xep* (Thomazella *et al.* 2021) and therefore was used for expression comparison with the other S-genes selected in the present work. We focused on evaluating the expression at early time points of *Xep* infection (24 and 48 hpi). The relative expression of *SITFIIA γ* , *SIDMR6* and *SISWEET 12c* were significantly increased in all time points evaluated, when compared with plants treated with saline solution (**Figure 1**). *SISWEET 12a* expression gene was negatively modulated initially after bacterial inoculation, however, the expression was upregulated after 48 hpi. In contrast, the expression of *SIDND1* and *SISweet 1a* genes were initially increased at 24 hpi and then decreased at 48 hpi. The other genes evaluated were either downregulated or non-significant in the analyzed time points.

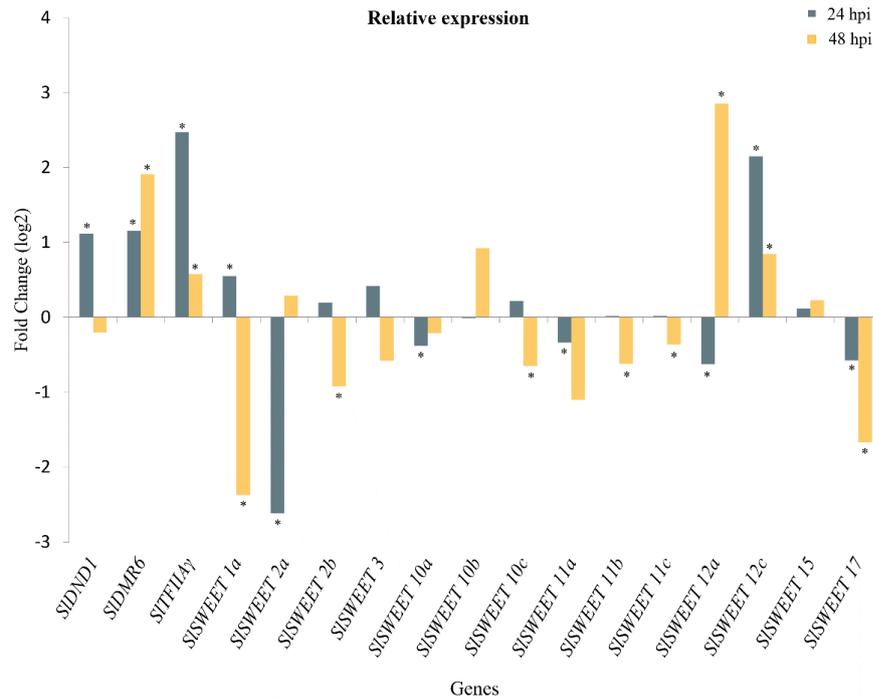


FIGURE 1| Analysis of relative expression of S-genes in tomato leaves at 24 and 48 hours post *Xep* inoculation (hpi) compared to plants treated with saline solution. The asterisks indicate statistical significance of gene expression ($P \leq 0.05$).

The expression of *SWEET* genes has been surveyed in different plant-pathosystems (Gupta *et al.* 2021). During the interaction of tomato crops with *Botrytis cinerea*, the necrotrophic fungus induced the expression of only *SWEET 15* gene, meanwhile the expression of other *SWEET* representatives was downregulated (Asai & Kobayashi 2016). Another interesting study involving bacteria-cassava plant interaction showed that the expression of *SWEET 10a* is induced by a TAL effector of *Xanthomonas phaseoli* pv. *manihotis* and necessary for virulence. Thus, methylation in the promoter of this gene prevents activation of transcription and confers resistance against bacteria (Veley *et al.* 2023). In addition to the key role in the pathogenesis process, *SWEET* genes act in several plant physiological processes, such as pollen development, nectar secretion, cold tolerance, and saline stress (Gautam *et al.* 2022). Given that, the knockout or knockdown of some S-genes may lead to pleiotropic effects (i.e., fitness penalties), as they are essential for plant development (Kieu *et al.* 2021). However, some susceptibility genes have been shown not to interfere with plant development. For example, the knockout of *DMR6* gene in potato (*Solanum tuberosum* L.) did not cause observable pleiotropic effects, whereas a decrease in fruit size was observed in tomato loss-of-function mutants (Kieu *et al.* 2021; Thomazella *et al.* 2021). Ultimately, every relevant

agronomical-related trait must be cautiously evaluated in case of developing a commercial plant cultivar deficient (knockdown or knockout) in a particular S-gene (van Schie & Takken 2014).

DMR6 gene is described as a flavone synthase responsible for catalyzing naringenin into apigenin and which competes with chorismate, the precursor of salicylic acid (SA) biosynthesis, thus, a mutation in this gene increases SA accumulation and shows resistance to pathogens (Ferreira *et al.* 2015). Additionally, Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2017) showed that *DMR6* encodes a salicylic acid 5-hydroxylase (S5H) that catalyzes the formation of 2,5-Dihydroxybenzoic acid by the hydroxylation of SA. This conversion serves as a mechanism that maintains SA homeostasis in *Arabidopsis* cells. *DND1* gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel (Clough *et al.* 2000) and has been shown to be involved in plant defense responses (Sun *et al.* 2016). Some evidence shows that the activation of multiple defense pathways occurs in loss of function *dnd1* mutants and leads to broad-spectrum resistance (Moeder *et al.* 2011; Sun *et al.* 2017). *SIDND1* gene in tomato led to a reduction in spore germination, as well as the growth of hyphae of the fungus *Botrytis cinerea* and a decrease in disease symptoms (Sun *et al.* 2017). In addition to the role in susceptibility, *DND1* is important for the flowering period and fertility of plants (Chin *et al.* 2013), and thus *DND1* might not be a suitable target for the generation of resistant crops.

Transcription factors silencing can also increase resistance against pathogens. For instance, it is supported that *Xanthomonas* spp. use basal transcription factors such as *TFIIA γ* to induce transcription of susceptibility genes in rice, pepper and tomato via interaction with TAL effectors (Huang *et al.* 2017), although it has not yet been demonstrated whether *TFIIA γ* gene behaves in the same way in the tomato-*Xep* interaction. Although our data indicate an increase in the expression of surveyed S-genes during the tomato-*Xep* interaction, there are still great knowledge gaps to be fulfilled regarding the molecular mechanisms associated with the triggering of plant susceptibility in this pathosystem. Further studies addressing the engaged *Xep* effectors and plant target counterparts are also desired. Considering that S-genes are generally conserved among plant species and due to the fact that plants have evolved along with phytopathogens, it is very reasonable to suggest that the *SITFIIA γ* gene is also required by *Xep* to thereby induce the expression of S-genes to succeed in establishing a compatible interaction.

Plant recessive resistance is currently in the spotlight as an alternative and resolute approach to control plant diseases, mainly due to the broad range and durability of the resistance, as are new techniques for gene editing leading to loss of function mutations, such as

the CRISPR/Cas9 technology, which have been applied to knockout S-genes in different plant crops (Thomazella *et al.* 2021; Távora *et al.* 2022). However, besides the fitness penalties issue addressed earlier, the simple knockout of a single S-gene may not always be able to guarantee a long-lasting plant resistance against adapted *Xanthomonas* bacterial phytopathogens, which may be able to circumvent plant recessive resistance through genetic adaptation of TAL effectors to new promoter regions of S-genes (Teper & Wang 2021). In this context, the ASO technology is a very appealing strategy to obtain plant resistance since the ectopic foliar application can knockdown the expression of S-genes and avoid the pleiotropic effects associated with their knockout. Furthermore, the technology of silencing by ASOs can be used for rapid gene validation, minimizing the work involved in the development of transformed plants.

In this perspective, we also evaluated the potential of the reduction of bacterial spot disease after application of ASO for *SITFIIA* γ gene silencing, whose expression stood out after inoculation of *Xep* in qRT-PCR experiments. The results of all the experiments revealed that the symptoms were milder with the application of *SITFIIA* γ ASO compared to Random ASO (**Figure 2a and Supplementary Figure 1**). At 12 dpi, the percentage of injured leaf area was lower than at 15 dpi in all experiments, suggesting disease progression (**Figure 2b**). Nevertheless, leaves treated with *SITFIIA* γ ASO had fewer disease symptoms than Random ASO at 15 dpi, which was significantly different ($P \leq 0.05$) in all independent experiments. These results strongly suggest that the silencing of the *SITFIIA* γ gene may have occurred and led to a lower rate of disease in the leaves. However, more phosphorothioate modifications in ASO sequence or more than one application could maintain lasting foliar health for more efficient disease control. Modifications increase the stability of the molecule, however this would increase production costs, which is an issue that needs to be taken into account when aiming at a biotechnological asset.

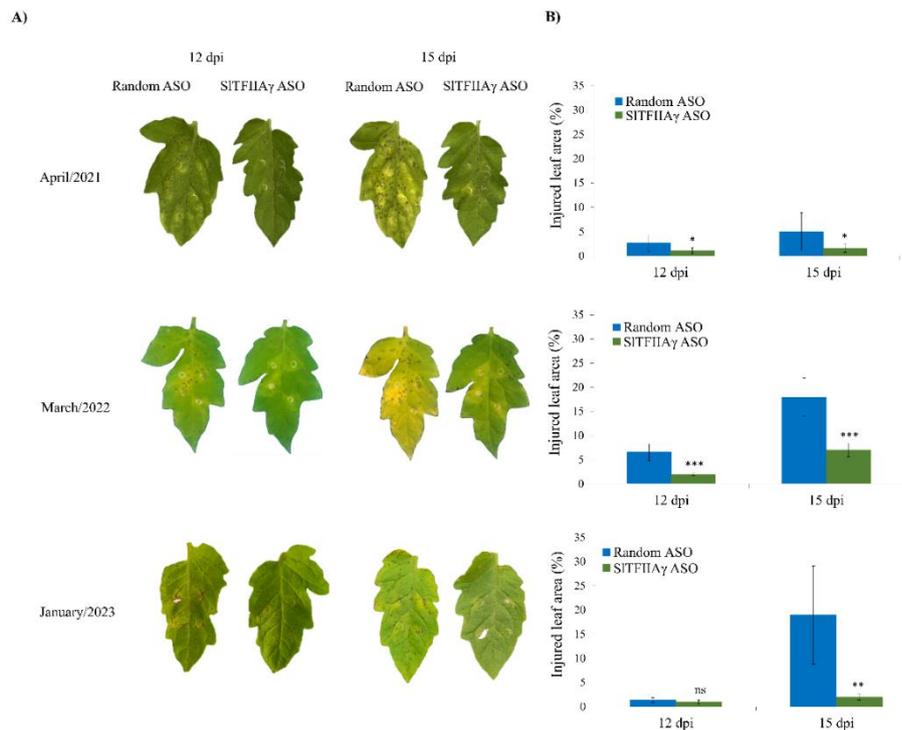


FIGURE 2 | Bacterial spot disease control by ASO. **A)** Progress of disease symptoms on leaves treated with Random ASO and *SITFIIA γ* ASO captured at 12 and 15 days in April/2021, March/2022 and January/2023. **B)** Injured leaf area percentage at 12 and 15 days-post inoculation (dpi) in independent experiments performed in April/2021, March/2022 and January/2023. The asterisks indicate statistical significance by Student's *t*-test (ns, not significant, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ or *** $P \leq 0.001$).

Strategies for bacterial spot control in tomato culture mainly involve the use of copper-based products and antibiotics (Potnis *et al.* 2015; Abrahamian *et al.* 2019). On the other hand, the frequent applications of these products not only raise environmental concerns but also favors the emergence of novel resistant strains (Khanal *et al.* 2020; Osdaghi *et al.* 2021). Thus, the ASO strategy has the potential to reduce tomato yield losses caused by bacterial spot as well as provide a more sustainable management of this disease.

4. CONCLUSIONS

Our results showed that the expression of some specific tomato S-genes are induced upon inoculation with *Xep*. Moreover, when targeting *SITFIIA γ* (one of the most representative upregulated genes in our qRT-PCR study) with ASO gene silencing approach, we observed a significant reduction of injured leaf area, when compared with control samples treated with Random ASO. Hence, our results indicate that *SITFIIA γ* gene may somehow contribute to the compatible interaction outcome on this pathosystem, serving as a basis for further and deeper

molecular studies. This study also provides new insights into strategies to control bacterial spot plant disease.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Co-authorship information

Lucas José de Sousa^{1,2} lucas.agro@outlook.com ORCID: 0000000247471999; Ana Carolina Mendes Bezerra¹ anacarolina.mebe@gmail.com ORCID: 0000-0002-8472-1811; Mariana Rocha Maximiano^{1,3} marianamaximianor@gmail.com ORCID: 0000000258896984; Fabiano T P K Távora¹ fabianotouz@gmail.com ORCID 0000-0003-1512-1254; Natália Faustino Cury¹ nataliafpres@gmail.com ORCID 0000-0001-9141-9736; Osmundo Brilhante de Oliveira Neto¹ osmundobrilhante@gmail.com ORCID: 0000-0002-4026-6810; Laurence Véronique Bindschedler⁴ Laurence.bindschedler@rhul.ac.uk ORCID: 0000-0002-0421-9857; Octávio Luiz Franco^{3,5} ocfranco@gmail.com ORCID 0000-0001-9546-0525; Luiz Eduardo Bassay Blum² luizblum@unb.br ORCID: 0000000239686615; Angela Mehta¹ angela.mehta@embrapa.br ORCID: 0000000253485123.

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PBI, Av. W/5 Norte Final CEP 70770917, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70910900, Brazil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília/Campus II, CEP 70790160, Brazil.

⁴ Department of Biological Sciences, Royal Holloway University of London (RHUL), Egham TW20 0EX, United Kingdom.

⁵ S-Inova Biotech/Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande/MS, Brazil

***Corresponding author:**

Angela Mehta (e-mail: angela.mehta@embrapa.br)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PBI, Av. W/5 Norte Final CEP 70770-917, Brasília, DF, Brazil.

5. REFERENCES

J.B. Jones, T.A. Zitter, T.M. Momol, S.A. Miller, Compendium of Tomato Diseases and Pests, Second Edition, The American Phytopathological Society, 2016. <https://doi.org/doi:10.1094/9780890544341>.

A.M. Quezado-Duval, C.A. Lopes, Mancha-bacteriana: uma atualização para o sistema de produção integrada de tomate indústria, Brasília, 2010. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/882148/1/CircularTecnica84.pdf>.

E. Osdaghi, J.B. Jones, A. Sharma, E.M. Goss, P. Abrahamian, E.A. Newberry, N. Potnis, R. Carvalho, M. Choudhary, M.L. Paret, S. Timilsina, G.E. Vallad, A centenary for bacterial spot of tomato and pepper, *Mol. Plant Pathol.* 22 (2021) 1500–1519. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.13125>.

E. Araújo, J.R. Costa, M. Ferreira, A.M. Quezado-Duval, Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil, *Plant Pathol.* 66 (2016). <https://doi.org/10.1111/ppa.12543>.

L. Morinière, A. Bulet, E.R. Rosenthal, X. Nesme, P. Portier, C.T. Bull, C. Lavire, M. Fischer-Le Saux, F. Bertolla, Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach reveals that *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 emend. Timilsina et al. 2019 is a later heterotypic synonym of *Xanthomonas hortorum* Vauterin et al., *Syst. Appl. Microbiol.* 43 (2020) 126087. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126087>.

J.D. Barak, T. Vancheva, P. Lefeuvre, J.B. Jones, S. Timilsina, G. V Minsavage, G.E. Vallad, R. Koebnik, Whole-Genome Sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* Strains Clarify Taxonomy and Reveal a Stepwise Erosion of Type 3 Effectors, *Front. Plant Sci.* 7 (2016). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01805>.

- J. Boch, U. Bonas, Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function., *Annu. Rev. Phytopathol.* 48 (2010) 419–436. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>.
- A. Muñoz Bodnar, A. Bernal, B. Szurek, C.E. López, Tell me a tale of TALEs., *Mol. Biotechnol.* 53 (2013) 228–235. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9619-3>.
- A.N.-S. Mak, P. Bradley, R.A. Cernadas, A.J. Bogdanove, B.L. Stoddard, The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target., *Science.* 335 (2012) 716–719. <https://doi.org/10.1126/science.1216211>.
- R. Moore, A. Chandrabhas, L. Bleris, Transcription Activator-like Effectors: A Toolkit for Synthetic Biology, *ACS Synth. Biol.* 3 (2014) 708–716. <https://doi.org/10.1021/sb400137b>.
- C.C.N. van Schie, F.L.W. Takken, Susceptibility genes 101: how to be a good host., *Annu. Rev. Phytopathol.* 52 (2014) 551–581. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045854>.
- P.K. Gupta, H.S. Balyan, T. Gautam, SWEET genes and TAL effectors for disease resistance in plants: Present status and future prospects., *Mol. Plant Pathol.* 22 (2021) 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/mpp.13075>.
- J. Streubel, C. Pesce, M. Hutin, R. Koebnik, J. Boch, B. Szurek, Five phylogenetically close rice SWEET genes confer TAL effector-mediated susceptibility to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*., *New Phytol.* 200 (2013) 808–819. <https://doi.org/10.1111/nph.12411>.
- M. Cohn, R.S. Bart, M. Shybut, D. Dahlbeck, M. Gomez, R. Morbitzer, B.-H. Hou, W.B. Frommer, T. Lahaye, B.J. Staskawicz, *Xanthomonas axonopodis* Virulence Is Promoted by a Transcription Activator-Like Effector–Mediated Induction of a SWEET Sugar Transporter in Cassava, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27 (2014) 1186–1198. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-14-0161-R>.
- J. Chong, M.-C. Piron, S. Meyer, D. Merdinoglu, C. Bertsch, P. Mestre, The SWEET family of sugar transporters in grapevine: *VvSWEET4* is involved in the interaction with *Botrytis cinerea*., *J. Exp. Bot.* 65 (2014) 6589–6601. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru375>.
- K. Sun, A.-M.A. Wolters, A.E.H.M. Loonen, R.P. Huibers, R. van der Vlugt, A. Goverse, E. Jacobsen, R.G.F. Visser, Y. Bai, Down-regulation of *Arabidopsis DND1* orthologs in potato and tomato leads to broad-spectrum resistance to late blight and powdery mildew., *Transgenic Res.* 25 (2016) 123–138. <https://doi.org/10.1007/s11248-015-9921-5>.

- D.P. de T. Thomazella, K. Seong, R. Mackelprang, D. Dahlbeck, Y. Geng, U.S. Gill, T. Qi, J. Pham, P. Giuseppe, C.Y. Lee, A. Ortega, M.-J. Cho, S.F. Hutton, B. Staskawicz, Loss of function of a *DMR6* ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118 (2021). <https://doi.org/10.1073/pnas.2026152118>.
- R. Huang, S. Hui, M. Zhang, P. Li, J. Xiao, X. Li, M. Yuan, S. Wang, A Conserved Basal Transcription Factor Is Required for the Function of Diverse TAL Effectors in Multiple Plant Hosts, *Front. Plant Sci.* 8 (2017). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01919>.
- J. Tian, S. Hui, Y. Shi, M. Yuan, The key residues of *OsTFIIA γ 5/Xa5* protein captured by the arginine-rich TFB domain of TALEs compromising rice susceptibility and bacterial pathogenicity, *J. Integr. Agric.* 18 (2019) 1178–1188. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62108-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62108-2).
- S. Pavan, E. Jacobsen, R.G.F. Visser, Y. Bai, Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance, *Mol. Breed.* 25 (2010) 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9323-6>.
- A. Ortigosa, S. Gimenez-Ibanez, N. Leonhardt, R. Solano, Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of *SlJAZ2*., *Plant Biotechnol. J.* 17 (2019) 665–673. <https://doi.org/10.1111/pbi.13006>.
- X. Zeng, Y. Luo, N.T.Q. Vu, S. Shen, K. Xia, M. Zhang, CRISPR/Cas9-mediated mutation of *OsSWEET14* in rice cv. Zhonghua11 confers resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* without yield penalty, *BMC Plant Biol.* 20 (2020) 313. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02524-y>.
- J.N. Tripathi, V.O. Ntui, T. Shah, L. Tripathi, CRISPR/Cas9-mediated editing of *DMR6* orthologue in banana (*Musa* spp.) confers enhanced resistance to bacterial disease., *Plant Biotechnol. J.* 19 (2021) 1291–1293. <https://doi.org/10.1111/pbi.13614>.
- A. Kilanowska, S. Studzińska, In vivo and in vitro studies of antisense oligonucleotides – a review, *RSC Adv.* 10 (2020) 34501–34516. <https://doi.org/10.1039/D0RA04978F>.
- K. Sun, A. van Tuinen, J.A.L. van Kan, A.-M.A. Wolters, E. Jacobsen, R.G.F. Visser, Y. Bai, Silencing of *DND1* in potato and tomato impedes conidial germination, attachment and hyphal growth of *Botrytis cinerea*, *BMC Plant Biol.* 17 (2017) 235. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1184-2>.

- M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *J. Eur. Ceram. Soc.* 37 (2017) 1141. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2016.09.026>.
- O.A. Müller, J. Grau, S. Thieme, H. Prochaska, N. Adlung, A. Sorgatz, U. Bonas, Genome-Wide Identification and Validation of Reference Genes in Infected Tomato Leaves for Quantitative RT-PCR Analyses, *PLoS One.* 10 (2015) e0136499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136499>.
- F.T.P.K. Távara, R. Bevitori, R.N. Mello, M.M.D.F. Cintra, O.B. Oliveira-Neto, W. Fontes, M.S. Castro, M. V Sousa, O.L. Franco, A. Mehta, Shotgun proteomics coupled to transient-inducible gene silencing reveal rice susceptibility genes as new sources for blast disease resistance., *J. Proteomics.* 241 (2021) 104223. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104223>.
- F. Vale, E. Fernandes-Filho, J. Liberato, Quant – A Software for Plant Disease Severity Assessment, 2003.
- Y. Asai, Y. Kobayashi, Increased Expression of the Tomato *SISWEET15* Gene During Grey Mold Infection and the Possible Involvement of the Sugar Efflux to Apoplasm in the Disease Susceptibility, *J. Plant Pathol. Microbiol.* 07 (2016). <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000329>.
- K.M. Veley, K. Elliott, G. Jensen, Z. Zhong, S. Feng, M. Yoder, K.B. Gilbert, J.C. Berry, Z.-J.D. Lin, B. Ghoshal, J. Gallego-Bartolomé, J. Norton, S. Motomura-Wages, J.C. Carrington, S.E. Jacobsen, R.S. Bart, Improving cassava bacterial blight resistance by editing the epigenome., *Nat. Commun.* 14 (2023) 85. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35675-7>.
- T. Gautam, M. Dutta, V. Jaiswal, G. Zinta, V. Gahlaut, S. Kumar, Emerging Roles of SWEET Sugar Transporters in Plant Development and Abiotic Stress Responses, *Cells.* 11 (2022). <https://doi.org/10.3390/cells11081303>.
- N.P. Kieu, M. Lenman, E.S. Wang, B.L. Petersen, E. Andreasson, Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes, *Sci. Rep.* 11 (2021) 4487. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w>.
- M.L.F. Ferreyra, J. Emiliani, E.J. Rodriguez, V.A. Campos-Bermudez, E. Grotewold, P. Casati, The Identification of Maize and Arabidopsis Type I FLAVONE SYNTHASEs Links Flavones

- with Hormones and Biotic Interactions., *Plant Physiol.* 169 (2015) 1090–1107. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00515>.
- Y. Zhang, L. Zhao, J. Zhao, Y. Li, J. Wang, R. Guo, S. Gan, C.-J. Liu, K. Zhang, S5H/DMR6 Encodes a Salicylic Acid 5-Hydroxylase That Fine-Tunes Salicylic Acid Homeostasis, *Plant Physiol.* 175 (2017) 1082–1093. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00695>.
- S.J. Clough, K.A. Fengler, I.C. Yu, B. Lippok, R.K.J. Smith, A.F. Bent, The Arabidopsis dnd1 “defense, no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 9323–9328. <https://doi.org/10.1073/pnas.150005697>.
- W. Moeder, W. Urquhart, H. Ung, K. Yoshioka, The Role of Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels in Plant Immunity, *Mol. Plant.* 4 (2011) 442–452. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr018>.
- K. Chin, T.A. DeFalco, W. Moeder, K. Yoshioka, The Arabidopsis cyclic nucleotide-gated ion channels *AtCNGC2* and *AtCNGC4* work in the same signaling pathway to regulate pathogen defense and floral transition., *Plant Physiol.* 163 (2013) 611–624. <https://doi.org/10.1104/pp.113.225680>.
- F.T.P.K. Távora, A.C. Meunier, A. Vernet, M. Portefaix, J. Milazzo, H. Adreit, D. Tharreau, O.L. Franco, A. Mehta, CRISPR/Cas9-Targeted Knockout of Rice Susceptibility Genes *OsDjA2* and *OsERF104* Reveals Alternative Sources of Resistance to *Pyricularia oryzae*, *Rice Sci.* 29 (2022) 535–544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rsci.2022.04.001>.
- D. Teper, N. Wang, Consequences of adaptation of TAL effectors on host susceptibility to *Xanthomonas*, *PLOS Genet.* 17 (2021) e1009310. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009310>.
- N. Potnis, S. Timilsina, A. Strayer, D. Shantharaj, J.D. Barak, M.L. Paret, G.E. Vallad, J.B. Jones, Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge, *Mol. Plant Pathol.* 16 (2015) 907–920. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12244>.
- P. Abrahamian, J.B. Jones, G.E. Vallad, Efficacy of copper and copper alternatives for management of bacterial spot on tomato under transplant and field production, *Crop Prot.* 126 (2019) 104919. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104919>.

S. Khanal, S.R. Hind, M. Babadoost, Occurrence of Copper-Resistant *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* in Illinois Tomato Fields, *Plant Heal. Prog.* 21 (2020) 338–344. <https://doi.org/10.1094/PHP-06-20-0048-RS>.

Supporting information

This study was funded by Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN, CNPq (National Council of Scientific and Technological Development), CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) and FAPDF (Foundation for Research Support of the Federal District).

Supplementary Table 1. Susceptibility genes and primer sequences used for qRT-PCR analysis.

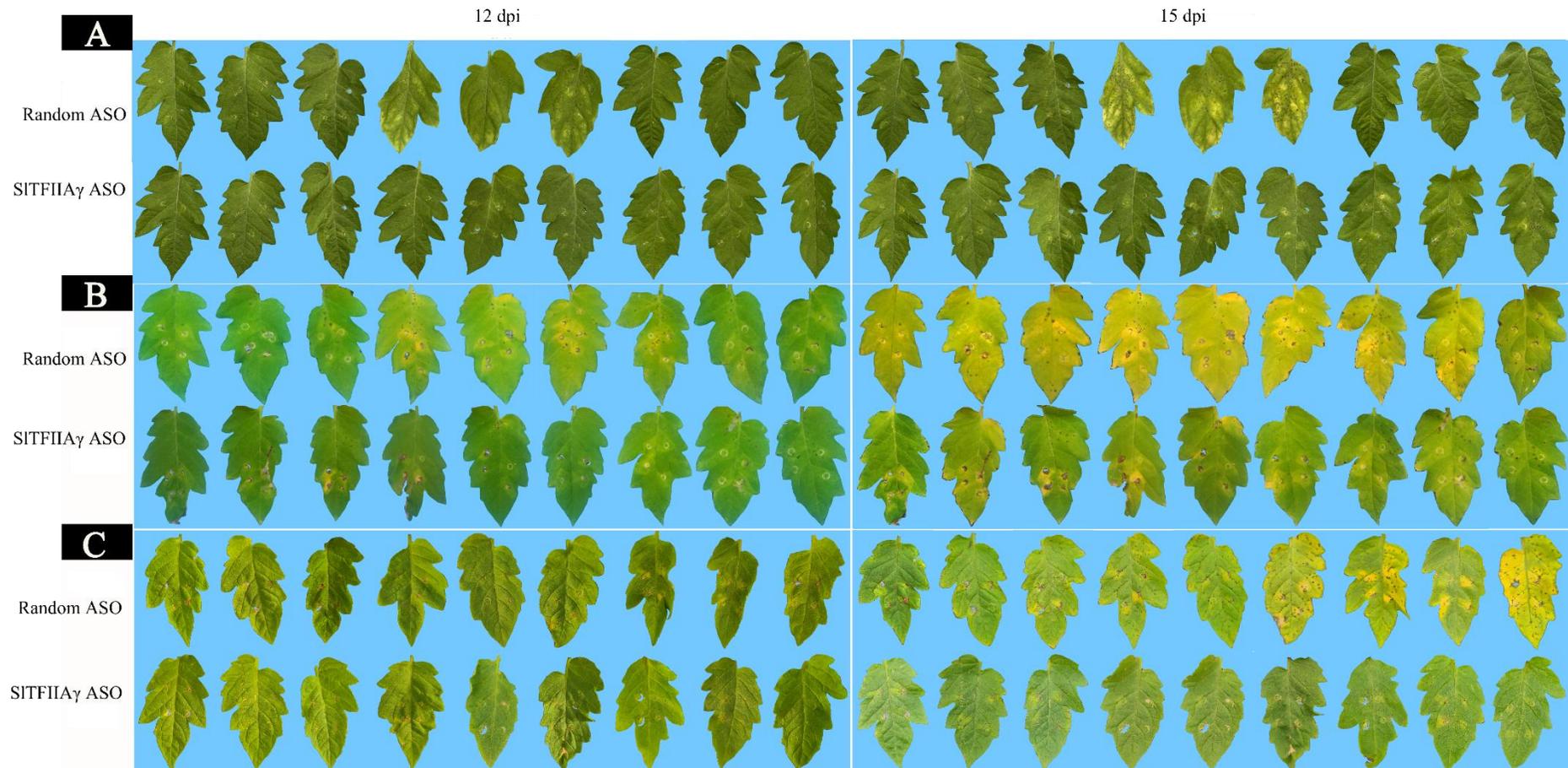
Gene	Description	Access	Plant / Targeted pathogen	References	Primer Sequence 5'-3' F/R	Amplicon size (bp)	qRT-PCR efficiency
<i>SISWEET 1a</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc04g064610	Not reported	-	F- TTTGCTGCTGTAGCCCTTGTT R- GAACTCCACGCTCTTCGTCTTG	152	88
<i>SISWEET 2a</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc02g071520	Not reported	-	F- GGGGTCCAAGAAGTTGAAAA R- CGAAAGTTTGCCGACTAGAA	113	93
<i>SISWEET 2b</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc07g062120	Not reported	-	F- GTTCAGGATGTTTGGATGG R- ATCAAGGAAGCACAACCTCAG	130	90
<i>SISWEET 3</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc03g007360	Not reported	-	F- CTTGCTTGAGTTTGTTCATCG R- GAACACCCCTTTGTATCCTG	120	97
<i>SISWEET 10a</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc03g097580	Cassava/ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	(Veley <i>et al.</i> 2023)	F- CCAAAGAAAGACAGGGTCCA R- TGTCCACGAACAACCTCCTT	113	91
<i>SISWEET 10b</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc03g097600	Not reported	-	F- CCAGAGATACAAAAGGGTGA R- CCATTAACCAAGCCTCACA	115	97
<i>SISWEET 10c</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc03g097610	Not reported	-	F- ACCAAAGAAAGCCAGGGTTA R- TGTCCACGAACAACCTCCTT	114	88
<i>SISWEET 11a</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc03g097870	Rice/ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	(Schepler-Luu <i>et al.</i> 2023)	F- AAAGAAAGCCAGGGTCCATA R- ATTTGTCCACGAACGACTCC	114	91
<i>SISWEET 11b</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc03g097570	Rice/ <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	(Wu <i>et al.</i> 2022)	F- TCTACCTTTTCTACGCACCA R- TGTCCACGAACAACCTCTTT	130	99
<i>SISWEET 11c</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc06g072620	not reported	-	F- GTTGGATGGATTTGCCTTGT R-AAGTGAGGAAAACAGAGAGGAG	124	89

<i>SISWEET 12a</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc03g097590	Not reported	-	F- ACCTTCTCTACGCACCAAACA R- TGTCCACGAACAACCTCCTTT	127	90
<i>SISWEET 12c</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc05g024260	Not reported	-	F- CAGCACCTCTTAGCATCGTG R- AGGAGTCCATAGCCAAACCA	118	95
<i>SISWEET 15</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc09g074530	Tomato / <i>Botrytis cinerea</i>	(Asai & Kobayashi 2016)	F- CGCTGTGATGTGGTTTTTC R- CGGTAGAACTTGTTGCTTTC	139	91
<i>SISWEET 17</i>	<i>Sugar efflux transporter</i>	Solyc01g099870	Not reported	-	F- TCCCCTCTTGGTGTTATGAA R- AAGCACGGCGTACAATGTC	117	93
<i>SITFIIAγ</i>	<i>Transcription initiation factor IIA subunit 2</i>	Solyc12g088030	Rice, tomato and citrus / <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> and <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i>	(Huang <i>et al.</i> 2017; Tian <i>et al.</i> 2019)	F- TGGGATGTGCTTGACTGAAA R- CCTTGCTCTTTACTTGAGTCTC	133	84
<i>SIDMR6</i>	<i>Flavanone 3-hydroxylase-like protein</i>	Solyc03g080190	Tomato, banana and potato / <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>Xanthomonas gardneri</i> , <i>Xanthomonas perforans</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>musacearum</i> , <i>Phytophthora infestans</i>	(Kieu <i>et al.</i> 2021; Thomazella <i>et al.</i> 2021; Tripathi <i>et al.</i> 2021)	F- TTGGGTGAACAAGGACAACA R- GCGTCAGGTTGAGGTTTTA	189	95
<i>SIDND1</i>	<i>Cyclic nucleotide-regulated ion channel family protein</i>	Solyc02g088560	Potato and tomato / <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Phytophthora infestans</i>	(Sun <i>et al.</i> 2016, 2017; Kieu <i>et al.</i> 2021)	F- CAACCTGATAACAGCGACGA R- CAACTGGTGGAGTGGAAAAC	110	92

<i>PHD*</i>	<i>Methylated histone binding</i>	Solyc06g051420	-	-	F- ATTCGTGGCTGCTCTCTGTC R- TAAAGGCTTCCTCCCTGTCA	128	90
<i>LSM7*</i>	<i>Small nuclear ribonucleoprotein family protein</i>	Solyc09g009640	-	-	F- GGTGGAAGACAAGTGGTTGG R- TTCAGGGGATCATCAGCAT	104	94

* Reference genes used for normalization

Supplementary Figure 1. Progress of disease symptoms on leaves treated with Random ASO and *SITFIIA* γ ASO captured at 12 and 15 days in independent experiments performed in A) April/2021, B) March/2022 and C) January/2023.



CAPÍTULO 2

**ABORDAGEM PROTEÔMICA REVELA NOVOS GENES DE
TOMATEIRO POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA
SUSCETIBILIDADE À MANCHA BACTERIANA**

Abordagem proteômica revela novos genes de tomateiro potencialmente envolvidos na suscetibilidade à mancha bacteriana

RESUMO

A análise proteômica realizada neste estudo buscou compreender os mecanismos moleculares que contribuem para suscetibilidade do tomateiro durante a interação com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*. Para isso, adotou-se uma abordagem proteômica comparativa de plantas suscetíveis inoculadas com a bactéria e com o controle (solução salina) em 24 e 48 horas após a inoculação (hai). Os resultados deste estudo revelaram que a maior parte das proteínas identificadas tiveram sua abundância aumentada, e foram classificadas em diferentes grupos de ontologia gênica. Oito dessas proteínas foram relacionadas com a suscetibilidade em outros patossistemas, indicando portanto um potencial envolvimento no favorecimento ao desenvolvimento da mancha bacteriana do tomateiro. Algumas destas proteínas estão envolvidas com regulação negativa de ácido salicílico, de Proteínas PR e de espécies reativas de oxigênio, além de colaborar com a aquisição de açúcares pelo patógeno. Os resultados deste trabalho forneceram informações importantes para os programas de melhoramento genético visando o desenvolvimento de cultivares de tomateiro com maior resistência a mancha bacteriana.

Palavras-chave: Proteínas, resistência recessiva, expressão diferencial, interação planta-patógeno,

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de cultivares com resistência genética a mancha bacteriana do tomateiro tem sido uma prioridade para o controle da doença, por ser a maneira mais econômica quando comparada às estratégias tradicionais de controle da doença que utilizam produtos à base de cobre e antibióticos (Adhikari *et al.* 2020). Até o momento, a maioria dos estudos envolvem a caracterização de genes de resistência (genes R) os quais foram identificados em tomate selvagem para controlar as diferentes espécies causadoras da doença (Hutton *et al.* 2010; Scott *et al.* 2013; Bernal *et al.* 2020).

Entretanto, a introgressão dos genes R não tem permitido a obtenção de linhagens com níveis de resistência satisfatórios (Scott *et al.* 2013). Além disso, a ocorrência de diferentes

espécies bacterianas e a rápida mudança na predominância de raças são fatores limitantes para a implementação de cultivares resistentes com esta estratégia. Nesse sentido, estratégias que visam o emprego de resistência ampla podem ser uma alternativa mais duradoura no campo para o controle de doenças (Adhikari *et al.* 2020).

Uma forma de alcançar esse objetivo é por meio da resistência recessiva, mediada pelo nocaute ou silenciamento de genes que conferem suscetibilidade, conhecidos como genes de suscetibilidade (genes S) (Pavan *et al.* 2010). A resistência baseada nos genes S é mais difícil de ser superada pelos patógenos, pois estes genes desempenham papéis fundamentais no processo de colonização e, para isso, os patógenos devem ser capazes de superar a dependência dos fatores do hospedeiro (van Schie & Takken 2014). A resistência conferida pelo gene recessivo *Mildew resistance locus O (MLO)* é um exemplo de resistência bem-sucedida mediada por gene S. Este gene codifica proteínas transmembrana e sua expressão regula negativamente as vias de defesa, favorecendo a colonização de oídio na cevada. Plantas que apresentam mutações neste gene têm sido cultivadas há anos conferindo resistência a todas as raças do patógeno e, até o momento, não foram encontradas raças que superem esse tipo de resistência (Bai *et al.* 2008). Os genes S codificam proteínas que contribuem para a nutrição dos patógenos, como por exemplo, os genes codificadores de proteínas *Sugars Will Eventually Be Exported Transporters (SWEET)* que são necessários para o efluxo de açúcar para o apoplasto, local onde alguns patógenos colonizam e se nutrem desses açúcares (Gupta *et al.* 2021).

Foi relatado que alguns genes S são induzidos por diferentes patógenos no tomateiro, e algumas estratégias de nocaute ou silenciamento melhoraram a resistência das plantas. O gene *Downy Mildew Resistance 6 (DMR6)* é um exemplo que possivelmente regula negativamente a sinalização de defesa das plantas, e sua inativação aumenta os níveis de ácido salicílico e leva à resistência das plantas contra bactérias e oomicetos (Sun *et al.* 2016; Thomazella *et al.* 2021). O silenciamento do gene *Transcription initiation factor IIA subunit 2 (gamma) (TFIIA γ)* melhorou a resistência contra *Xanthomonas* (Sousa *et al.* 2023) e alguns genes S foram demonstrados como induzidos após a inoculação de *Xanthomonas*, como os genes *UPA20* (Schwartz *et al.* 2017) e *SWEET* (Sousa *et al.* 2023). Embora alguns genes S tenham sido identificados para controlar patógenos em tomate, muitos deles podem apresentar efeitos pleiotrópicos, inviabilizando a produção de uma cultivar comercial (Garcia-Ruiz *et al.* 2021).

Nesse sentido, novos estudos são necessários para identificar genes S, sendo a proteômica uma importante estratégia para identificar esses fatores de suscetibilidade. Os mecanismos que levam à suscetibilidade do tomateiro a *Xanthomonas* têm sido pouco explorados visando a implementação de cultivares resistentes. As espécies de *Xanthomonas* possuem sofisticados sistemas de secreção de efetores que ativam os genes S do hospedeiro visando favorecer a colonização (Boch & Bonas 2010; Muñoz Bodnar *et al.* 2013), o que torna interessante o estudo de genes S potenciais que podem ser nocauteados ou silenciados para conferir resistência a doença.

Neste contexto, um estudo de proteômica comparativa foi realizado para identificação e comparação da abundância de proteínas em plantas cv. Santa Cruz inoculadas e não inoculadas com *Xep* em dois estágios após a inoculação. Os resultados revelaram genes candidatos a serem utilizados futuramente para o silenciamento e/ou nocaute, contribuindo assim para os programas de melhoramento genético destinados ao desenvolvimento de cultivares de tomateiro com maior resistência à mancha bacteriana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo da bactéria e inoculação das plantas

Plantas de tomateiro (cv. Santa Cruz) com três semanas de idade foram cultivadas em casa de vegetação não climatizada e inoculadas com *Xep* ou solução salina (NaCl 0,85%) para investigações proteômicas e de expressão gênica relativa. A cepa *Xep* raça T3 (isolado EH 2012-22) foi cedida gentilmente pela pesquisadora Alice Quezado (Embrapa Hortaliças) e identificada molecularmente por Araújo *et al.* (2017). A bactéria foi cultivada por 48 horas a 28 °C em meio de cultura complexo Nutrient Yeast Glycerol (NYG). Em seguida, as células bacterianas foram suspensas e a concentração foi ajustada para OD 600 = 0.3 (~10⁸ UFC/mL) em solução salina (0,85% NaCl). Para inocular as plantas, utilizou-se uma seringa sem agulha em dois pontos de cada folha de tomate. Todas as plantas foram mantidas em câmara úmida até a conclusão dos bioensaios. Foram realizadas três réplicas biológicas (RB) para cada tratamento, sendo cada repetição composta por três plantas. Três folhas de cada planta foram coletadas 24 e 48 horas após a inoculação (hai) e mantidas a -80 °C para uso posterior.

2.2 Preparação das amostras para proteômica

As proteínas totais foram extraídas seguindo o procedimento descrito por Ribeiro et al. (2019). Cerca de 300 mg de tecido vegetal macerado em nitrogênio líquido foram homogeneizados em tampão de extração e em seguida foi adicionado fenol. As amostras foram agitadas em vórtex por 15 min e centrifugadas a $10.000 \times g$ por 3 min, e a precipitação foi realizada com acetato de amônio 0,1 M em metanol seguido da lavagem com acetona 80%. As proteínas totais foram solubilizadas com 60 μL de bicarbonato de amônio 50 mM (NH_4HCO_3 pH 8,5) e foram adicionados 25 μL de RapiGestTM SF – Waters (0,2% v/v), seguido de aquecimento a 80 °C por 15 min sob agitação e adição de 2,5 μL de ditioneitol 100 mM. A alquilação das proteínas foi realizada com adição de 2,5 μL de iodoacetamida 300 mM e as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 30 min no escuro. Em seguida, as amostras foram hidrolisadas com 2 μg de tripsina a 37 °C por 19 h. Posteriormente, foram adicionados 10 μL de ácido trifluoroacético (TFA) a 5% e as amostras foram incubadas com homogeneização por 1,5 horas a 37°C. Posteriormente, foi adicionado 10 μL de ácido trifluoroacético (TFA) a 5% e as amostras foram incubadas novamente a 37 °C por 90 min. As amostras foram centrifugadas a 10 °C durante 30 min e o sobrenadante foi recuperado e seco. A quantificação das proteínas foi realizada com Fluorômetro Qubit[®] (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A dessalinização das amostras foi realizada conforme o protocolo descrito por (Rappsilber *et al.* 2007). Resumidamente, discos Empore[®] C18 foram adicionados em ponteiras (P200 μL) e lavadas com 20 μL de metanol e centrifugadas a $2.000 \times g$ por 30 s. Em seguida, 20 μL de resina POROS[®] R2 em solvente B (0,1% de ácido fórmico/98% de acetonitrila) foram adicionados e as ponteiras foram centrifugadas a $2.000 \times g$ por 30 s. Cada ponteira foi lavada duas vezes com 20 μL de solvente A (0,1% de ácido fórmico/2% de acetonitrila) seguido de centrifugação. Após o preparo das ponteiras, as amostras foram solubilizadas em solvente A, inseridas nas ponteiras e centrifugadas a $2.000 \times g$ por 2 min. Os peptídeos foram eluídos com 20 μL de solvente B e secos em centrífuga a vácuo por 45 min. Em seguida, os peptídeos foram solubilizados com ácido fórmico a 0,1% e injetados no ESI LC-MS/MS.

2.3 Análise por cromatografia e espectrometria de massa

Os peptídios obtidos foram injetados em sistema cromatográfico (Dionex Ultimate 3000 RSLCnano UPLC, Thermo, USA), configurado com coluna de aprisionamento (trap column)

de 3 cm x 100 µm contendo partículas de C18 5 µm, 120 Å (ReprosilPur, Dr. Maich GmbH), conectada em série à coluna analítica de 24 cm x 75 µm contendo partículas de C18 3 µm, 120 Å (ReprosilPur, Dr. Maich GmbH). As amostras foram injetadas de forma a se obter 2 µg na coluna, submetidas a gradiente linear de eluição entre solventes A (ácido fórmico 0,1% em 2% acetonitrila/água) e B (ácido fórmico 0,1% em 80% acetonitrila/água) de 2% B a 35% B durante 155 min. As frações separadas no sistema cromatográfico foram eluídas diretamente na fonte de ionização de um espectrômetro de massas Orbitrap Elite (Thermo, USA), configurado para operar em modo DDA (data dependent acquisition), sendo que os espectros de MS1 foram adquiridos no analisador orbitrap, com resolução de 120000 e faixa de m/z entre 300 e 1650. Os 15 íons mais intensos, acima do limite de intensidade de 3000 foram fragmentados, gerando espectros de MS2, no analisador orbitrap por HCD, com resolução de 15000 (Anastasia & Sonja 2013). A reanálise de íons já fragmentados foi inibida por exclusão dinâmica (Andrews *et al.* 2011), favorecendo a identificação de peptídeos menos abundantes.

2.4 Análise quantitativa e qualitativa de proteínas

Os espectros obtidos foram analisados para a identificação do conjunto total de proteínas detectáveis nas amostras, bem como para analisar a abundância das proteínas que apresentaram diferenças relativas e significantes entre as condições de infectadas e controle. A metodologia adotada foi conforme a descrita em Arshid *et al.* (2017a) e Arshid *et al.* (2017b), com algumas adaptações. Para a análise qualitativa, o conjunto completo de espectros foi analisado utilizando-se o software Peaks versão 7.0 (BSI, USA), com os seguintes parâmetros: banco de dados obtido do repositório Uniprot em dezembro de 2022, filtrado para a espécie *Solanum lycopersicum*, tax. ID 4081. A busca foi realizada com base em sequenciamento de novo e em PSM, tolerância para a massa do precursor de 10 ppm, e dos fragmentos de 0,05 Da, tolerância de até 2 clivagens perdidas, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável. Além disso foram ativados os módulos de busca por modificações do banco Unimod com base em padrões de fragmentação, bem como busca de mutações pontuais (Zhang *et al.* 2012). Para as análises quantitativas, os espectros foram analisados com auxílio do programa Progenesis QI for Proteomics (Waters, USA) (Välikangas *et al.* 2018), com o qual foi realizado o alinhamento dos cromatogramas, a quantificação por área dos picos extraídos (XIC – extracted ion chromatogram), normalização e análise estatística

(ANOVA) dos eventos de MS1. Os eventos significativamente diferentes (q -valor $<0,05$) tiveram seus espectros de MS2 submetidos à identificação utilizando-se o programa Peaks, com os mesmos parâmetros descritos na análise qualitativa. Após a inferência de proteínas, a quantificação foi refinada considerando a média dos peptídeos atribuídos a cada proteína e foi realizada a análise estatística em nível de proteínas, sendo consideradas reguladas as proteínas que apresentaram ANOVA ($p < 0,05$). As proteínas identificadas por meio de dois ou mais peptídeos foram agrupadas em clusters de acordo com os perfis de abundância relativa.

2.5 Classificação funcional de proteínas

Após a identificação e quantificação, a análise da ontologia genética (GO) foi realizada utilizando o software Blast2GO® para identificar os processos biológicos associados, funções moleculares e localizações celulares esperadas das proteínas. Os termos GO foram categorizados com baseado em suas anotações funcionais.

3. RESULTADOS

Neste estudo, investigamos os mecanismos moleculares envolvidos na suscetibilidade do tomateiro a *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* por meio de uma abordagem proteômica, para identificar fatores de suscetibilidade que potencialmente contribuem para a colonização da bactéria no hospedeiro. Para isso, as folhas de tomateiro cv. Santa Cruz suscetível à bactéria foram inoculadas e coletadas após 24 e 48 h e comparadas com plantas tratadas com solução salina. A análise proteômica comparativa por meio de LC-MS/MS identificou um total de 1089 proteínas. A análise de componentes principais (PCA) demonstrou a clara distinção entre as condições avaliadas. As amostras provenientes do grupo inoculado apresentaram maior homogeneidade entre si, enquanto houve uma maior variação entre as amostras do grupo controle (**Figura 1a**). Quando a identificação da proteína foi realizada considerando a presença de apenas 1 peptídeo, em 24 h foram identificadas 100 proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) entre o grupo inoculado com *Xep* e o grupo controle (tratado com solução salina).

Entretanto, quando foram aplicados parâmetros mais estridentes, ou seja, quando a identificação das proteínas foi baseada na presença de pelo menos 2 peptídeos, foram

observadas 28 DAPs, sendo 24 aumentas e 4 diminuídas (**Tabela Suplementar 1**). O mapa de correlação demonstrou padrão contrastante entre as proteínas mais discriminantes entre as condições analisadas (**Figura 1b**).

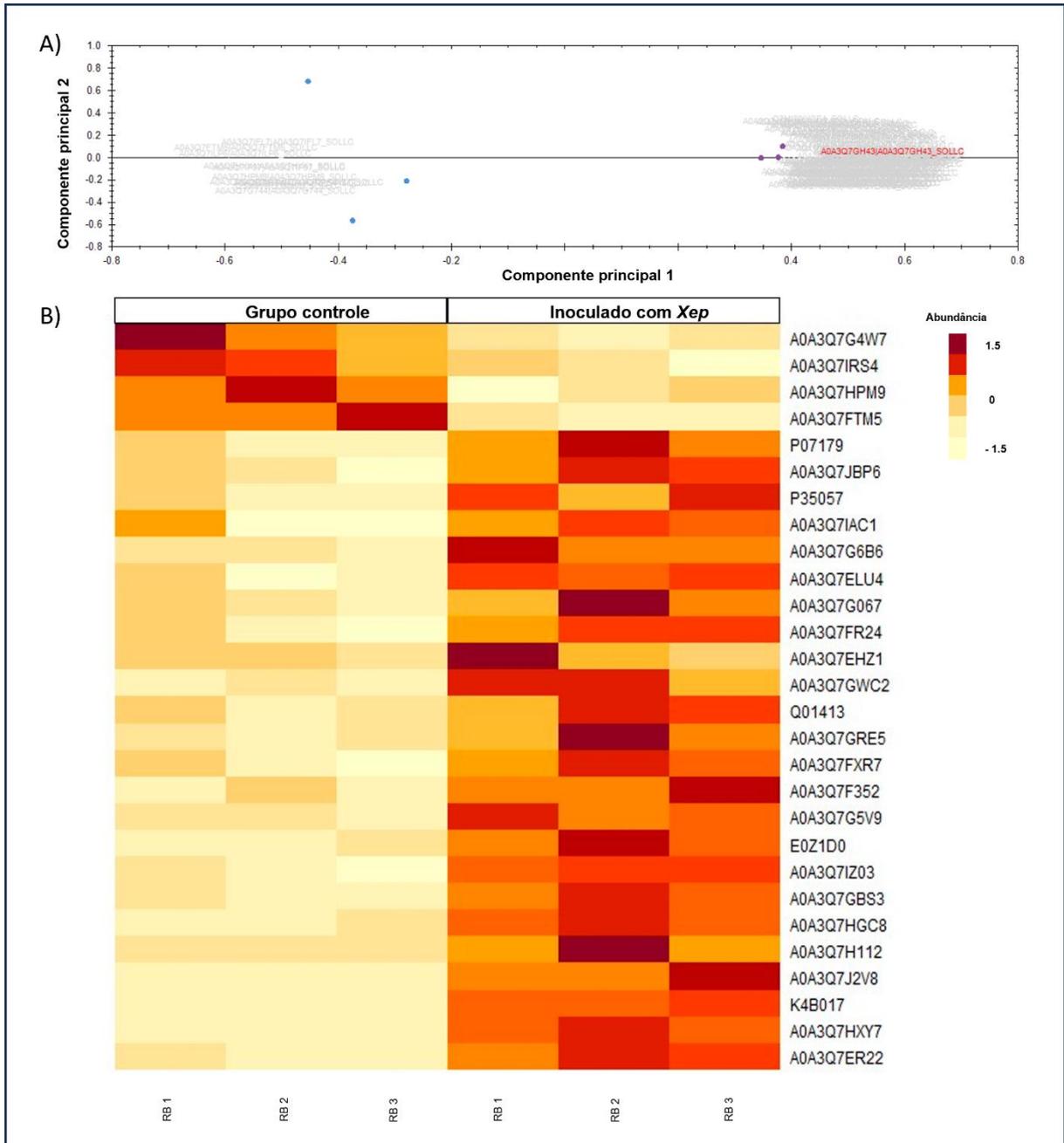


Figura 1. **A)** Análises de PCA, em cinza indicando cada proteína, pontos coloridos indicam o posicionamento de cada amostra, sendo que as cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam as réplicas biológicas (RB) ; Azul= grupo controle; roxo= Inoculado com *Xep*. **B)** Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e agrupamento de condições.

A maioria das proteínas diferencialmente abundantes foi identificada nas análises proteômicas em 48 hai, totalizando 497 DAPs quando apenas 1 peptídeo foi considerado na identificação. O gráfico de componentes principais demonstrou a evidente distinção entre as amostras controle e inoculadas com *Xep* (**Figura 2a**). Quando a identificação das proteínas foi baseada na presença de pelo menos 2 peptídeos, foram obtidas 213 aumentadas e 54 diminuídas (**Tabela Suplementar 2**), totalizando 267 DAPs. O mapa de correlação por perfis de abundância demonstrou um padrão contrastante das 100 proteínas que melhor discriminam entre as amostras provenientes das folhas inoculadas com *Xep* e do grupo controle (**Figura 2b**).

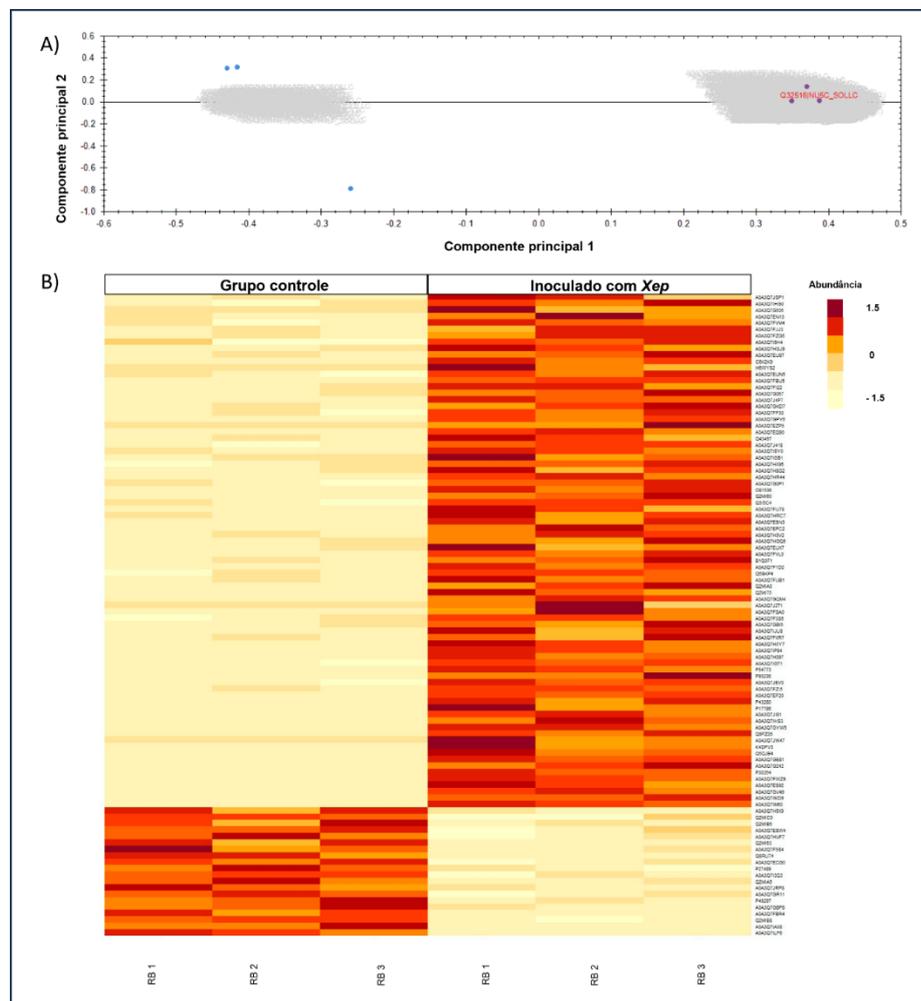


Figura 2. A) Análises de PCA, em cinza indicando cada proteína, pontos coloridos indicam o posicionamento de cada amostra, sendo que as cores indicam as condições e os pontos da mesma cor indicam réplicas biológicas (RB) ; Azul= grupo controle; roxo= Inoculado com *Xep*. B) Mapa de correlações (heatmap) entre padrões de abundância normalizada e agrupamento de condições.

As análises de ontologia gênica demonstraram o aumento das proteínas em processos biológicos esperados para plantas estressadas, como por exemplo resposta ao estresse, processo metabólico de carboidratos, tradução, fotossíntese e outros (**Figura 3a e 4a**). As categorias funcionais dominantes para proteínas reguladas pela infecção da bactéria abrangeram atividade de transferase, ligação ao ácido nucléico, atividade de hidrolase, atividade quinase, ligação à proteína e atividade catalítica (**Figura 3b e 4b**).

A)

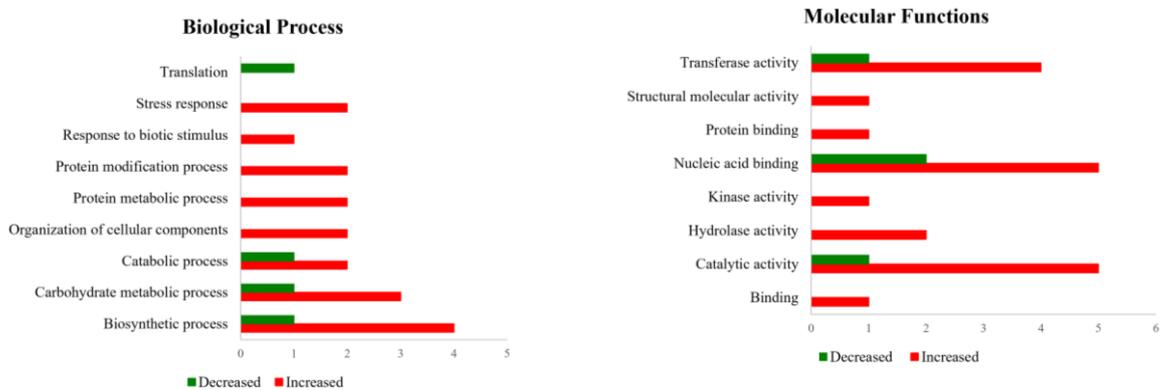
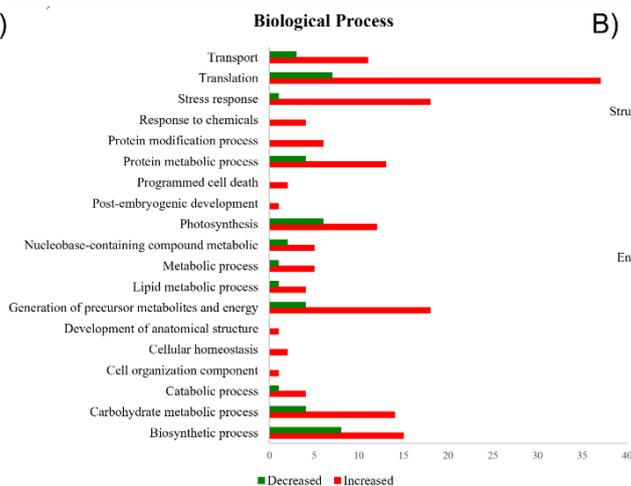


Figura 3. Análise de ontologia gênica em 24 hai. **A)** Processos biológicos nos quais estão inseridas as DAPs das plantas inoculadas com *Xep* quando comparadas com a condição controle. **B)** Função molecular na qual estão inseridas as DAPs das plantas inoculadas com *Xep* quando comparadas com a condição controle.

A)



B)

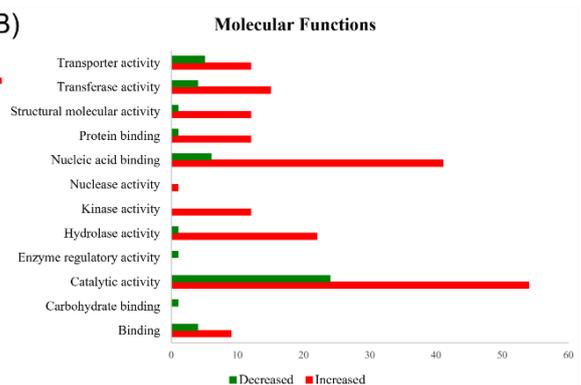


Figura 4. Análise de ontologia genética em 48 hai. **A)** Processos biológicos nos quais estão inseridas as DAPs das plantas inoculadas com *Xep* quando comparadas com a condição

controle. **B)** Função molecular na qual estão inseridas as DAPs das plantas inoculadas com *Xep* quando comparadas com a condição controle.

4. DISCUSSÃO

Respostas moleculares induzidas por *Xep*

As plantas evoluíram diferentes estratégias para se defenderem do ataque de patógenos, e por sua vez, os patógenos desenvolveram mecanismos para driblar essas estratégias de defesa (Jones & Dangl 2006). Existem duas vias moleculares de defesa das plantas contra patógenos, a primeira é ativada por meio do reconhecimento de Padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), percebidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), localizadas na membrana plasmática da planta e levam a imunidade desencadeada por PAMPs (PTI). As quinases são importantes para a sinalização e indução das respostas de defesa contra patógenos após a percepção do patógeno por PRRs, levando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), além da PTI e transcrição de genes relacionados a defesa (Romeis 2001; Klymiuk *et al.* 2021).

Neste trabalho, quatro quinases foram abundantes nas análises proteômicas e uma delas foi abundante apenas em 24 hai, enquanto quatro foram abundantes em 48 hai. As proteínas *Protein kinase domain-containing protein* (A0A3Q7GV49) e *Leucine-rich repeat-containing N-terminal plant-type domain-containing protein* (A0A3Q7FKJ0) foram mais abundantes em 48 hai e são receptores de repetição rico em leucina presente na membrana plasmática, que possivelmente reconhecem a flagelina bacteriana e desencadeia a PTI. A endocitose de flagelinas nos receptores PRRs é realizada pela proteína *Clathrin heavy chain* (A0A3Q7HNN1) (Mbengue *et al.* 2016) e que também foi identificada com abundância aumentada em 48 hai neste trabalho. Adicionalmente, a proteína *Heat shock cognate 70 kDa protein* (A0A3Q7IZ03) e *Histidine kinase/HSP90-like ATPase domain-containing protein* (A0A3Q7GBI5) que foram abundantes neste estudo 24 e 48 hai, respectivamente, podem se ligar a domínios LRR e atuar na maturação gênica (Shirasu & Schulze-Lefert 2003). O *Elongation factor Tu* (A0A3Q7FRC7) é outro receptor de PAMPs bacterianos, (Kunwar *et al.* 2018) e foi encontrado com menor abundância nas plantas inoculadas em 48 hai. Possivelmente o patógeno é capaz de modular a expressão gênica de receptores por meio da secreção de efetores, colaborando com a suscetibilidade.

As respostas iniciais de reconhecimento da bactéria podem promover a defesa das plantas contra as infecções por meio do fechamento estomático e deposição de calosidades. É possível que o aumento na abundância da *Cysteine proteinase* (A0A3Q7GB74) observada neste estudo possa controlar o fechamento estomático nas folhas de tomateiro, prejudicando assim a entrada da bactéria, conforme já relatado por Liu *et al.* (2020). Apesar do tomateiro possuir PRRs, estas parecem não ter elicitado o sistema de defesa da planta de maneira suficiente para induzir respostas fortes de PTI e controlar a colonização de *Xep*, resultando em uma resposta de suscetibilidade. Por outro lado, Du *et al.* (2015) e Shi & Panthee (2020) observaram que a expressão dos genes codificadores para *Mitogen activated protein kinase* (MAPK), fatores de transcrição do tipo WRKY e metabolismo de fenilalanina durante a interação do tomateiro e *Xanthomonas* spp. é aumentada no genótipo de tomate resistente comparado ao suscetível.

Neste estudo, algumas proteínas relacionadas a defesa foram mais abundantes nas plantas inoculadas, como por exemplo a *Glucan endo-1,3-beta-glucosidase B* em 24 hai e as proteínas *Catalase isozyme 1*, *Chitin-binding type-1 domain-containing protein* e *Cytosolic ascorbate peroxidase 1* em 48 hai. Curiosamente, a *Lipoxygenase* foi menos abundante nas plantas inoculadas em 48 hai. A *Lipoxygenase* tem sido reportada como fator limitante para resistência em alguns patossistemas, como demonstrado por Vellosillo *et al.* (2013), por meio da mutação no gene codificador para *Lipoxygenase* em plantas *Arabidopsis thaliana*, que tornaram mais suscetíveis a *Pseudomonas syringae*. Dessa maneira, é possível que a suscetibilidade do tomateiro seja influenciada pela baixa abundância de Proteínas PR. pois Outras proteínas relacionadas com a defesa de plantas e abundantes neste estudo foram a *Glutathione transferase* (A0A3Q7GRY0) e *DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 56* (A0A3Q7GZ89), que têm sido demonstradas como importantes proteínas para induzir sinalizações de defesa que levam a produção de Proteínas PR e acúmulo de ácido salicílico (Li *et al.* 2008; Dubreuil-Maurizi & Poinssot 2012).

Os fitopatógenos podem modificar ou suprimir a PTI para evitar o reconhecimento pelo hospedeiro e modular as respostas de defesa por meio da secreção de efetores, capazes de modular proteínas envolvidas na defesa, como por exemplo os componentes envolvidos na sinalização de cálcio, MAPK, proteólise, vias de sinalização de hormônios (Tsuda & Katagiri 2010), além de induzir a expressão de genes envolvidos na suscetibilidade (van Schie & Takken 2014). Esse reconhecimento leva à suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS), porém, as plantas podem reconhecer esses efetores por meio de genes de resistência (Genes R), que

codificam para proteínas intracelulares de repetição rica em leucina (LRR) com domínio de ligação a nucleotídeos (NB), levando a ocorrência da segunda via de defesa das plantas, que é a imunidade desencadeada por efetores (ETI) (Padmanabhan *et al.* 2009; Thordal-Christensen 2020). Neste estudo não foram encontradas proteínas que interagem com efetores bacterianos para induzir a ETI, indicando a suscetibilidade da planta. As respostas de ETI levam a um prolongamento das sinalizações por MAPK e ROS, resultando na resposta de hipersensibilidade (HR), um tipo de morte celular localizada que inibe a invasão do patógeno em interações resistentes (Wang *et al.* 2023). No entanto, algumas proteínas, como *Aconitate hydratase* (A0A3Q7HBK4) e *Long-chain-fatty-acid--CoA ligase* (A0A3Q7HWQ1) foram aumentadas nas plantas inoculadas e colaboram para a ocorrência da morte celular em resposta a infecção por bactérias (Moeder *et al.* 2007; Raffaele *et al.* 2008). Respostas de hipersensibilidade em tomateiro a *X. perforans* tem sido obtida por meio da incorporação do gene *Bs2* de *Capsicum annuum*, entretanto, esse tipo de resistência também pode ser suplantada pelo hospedeiro ao longo do tempo, uma vez que pode ocorrer mutações no efector bacteriano, bem como a aquisição de novos efetores para o não reconhecimento pelo gene R e causar a doença (Kunwar *et al.* 2018).

Proteínas potencialmente envolvidas com a suscetibilidade

Em uma interação suscetível há uma ineficiência no reconhecimento do patógeno, além disso, uma série de proteínas que contribuem para o desenvolvimento do patógeno podem ser induzidas durante e após a infecção (van Schie & Takken 2014). A identificação destes potenciais genes que colaboram com o desenvolvimento da doença é fundamental para os programas de melhoramento genético, uma vez que a perda da função de alelos destes genes pode levar a melhoria da resistência da planta (Koseoglou *et al.* 2022). O desenvolvimento de ferramentas moleculares de edição gênica como por exemplo o CRISPR/Cas tem possibilitado explorar mais a resistência recessiva das plantas (Koseoglou *et al.* 2022). Um trabalho interessante realizado por Thomazella *et al.* (2021) objetivou o nocaute do gene *DMR6* de tomateiro e demonstrou aumento na resistência da planta contra múltiplos patógenos. Até o momento nenhum trabalho amplo de interação entre *Xep* e tomate foi realizado especificamente em busca de potenciais fatores de suscetibilidade. Por outro lado, os mecanismos envolvidos nas repostas de defesa do tomateiro a *Xanthomonas* foram bem estudados por Du *et al.* (2015);

Shi & Panthee (2020). Nesse sentido, algumas proteínas identificadas neste trabalho com maior abundância nas plantas inoculadas e que apresentaram papel na suscetibilidade a doenças em outros patossistemas são discutidas a seguir.

As proteínas envolvidas com o transporte de açúcar podem ser visadas por fitopatógenos para o aumento da disponibilidade de açúcares no apoplasto, e dessa maneira, eles obtêm vantagens nutricionais do hospedeiro. Neste estudo, a proteína *Sucrose transporter* (A0A3Q7ISY0) um membro da família *Sugar transporters (SUTs)*, foi encontrada com abundância aumentada nas plantas inoculadas com *Xep* em 48 hai. Diferentemente das proteínas *Sugars Will Eventually Be Exported Transporters (SWEET)*, que desempenham função uniportadora de açúcares, os *SUTs* desempenham a função simportadora de H⁺ e açúcares (Julius *et al.* 2017). O papel dos genes *SWEET* em diferentes patossistemas tem sido bastante documentada (Chen *et al.* 2010), no entanto, a possibilidade dos *SUTs* colaborarem com a patogenicidade ainda não foi demonstrada. Além do aumento de *SUTs*, foi observada a abundância aumentada das proteínas *Sucrose synthase* (E0Z1D0) em 24 hai e da *Glycosyltransferase* (A0A3Q7H9C9) em 48 hai. Essas proteínas realizam a clivagem da sacarose em frutose e glicose, tornando-a disponível para utilização em diversos processos celulares e que podem ser utilizadas para a nutrição de fitopatógenos no apoplasto (Koch 2004; Stein & Granot 2019).

A proteína *Remorin 1* (Q9XEX8) foi diferencialmente abundante em 48 hai. A importância das remorinas na interação planta-patógeno tem sido demonstrada em várias espécies. A capacidade de fosforilação das remorinas promove a interação física com *Kinase Like Receptor* e efetores de patógenos, levando a produção de ROS e de proteínas relacionadas com a morte celular programada, contribuindo assim com a defesa da planta (Yu 2020). No entanto, Son *et al.* (2014) demonstraram outra função para essa proteína, relacionando-a com a suscetibilidade de *A. thaliana* aos vírus *Beet Curly Top Virus* and *Beet Severe Curly Top Virus*. Outro trabalho demonstrou que a superexpressão de remorina em tomate promove morte celular programada e uma maior suscetibilidade ao fungo *Botrytis cinerea* (Cai *et al.* 2020). Além disso, as remorinas podem promover a infecção de *Phytophthora infestans* em tomateiro (Bozkurt *et al.* 2014). Nesse sentido, levantamos a hipótese desta proteína estar relacionada com a suscetibilidade de tomate à *Xep*.

Bet v I/Major latex protein domain-containing protein (A0A3Q7FXR7) (A0A3Q7I9H4) foram encontradas em maior abundância nas plantas inoculadas em 24 e 48

hai. Estas proteínas podem regular fatores de transcrição, genes envolvidos em vias de sinalização de fitohormônios, bem como de genes que codificam para proteínas PR (Fujita & Inui 2021). Yang *et al.* (2015) observaram que houve uma maior tolerância ao fungo *Verticillium dahliae* ao realizar a superexpressão ectópica do gene em tabaco. No entanto, a superexpressão do gene codificador desta proteína em maçã revelou uma maior sensibilidade a infecções fúngicas, e a expressão de vários genes de defesa foram inibidas, demonstrando o envolvimento com a suscetibilidade (He *et al.* 2020). Nota-se que essas proteínas podem levar a resultados de resistência ou suscetibilidade, e portanto, mais investigações são necessárias para elucidar o papel destas proteínas durante a interação de *Xep* em tomate.

A proteína *ATP citrate synthase* (A0A3Q7EPC2) encontrada com abundância aumentada em 48 hai é responsável por catalisar o citrato para gerar oxaloacetato e acetil-CoA. Um estudo de mutação no gene que codifica para essa proteína em arroz demonstrou que houve maior acúmulo de ROS e ativação da via de defesa mediada por ácido salicílico, o que levou ao aumento da resistência à *X. oryzae* (Ruan *et al.* 2019). O favorecimento desta proteína para a infecção fúngica também foi relatada em algodoeiro à *V. dahliae*. Plantas mutantes apresentaram aumento de Proteínas PR e níveis de ácido salicílico, o que contribuiu para a resistência da planta ao patógeno (Liu *et al.* 2022).

A proteína *J domain-containing protein* (A0A3Q7G784) também denominada de *HSP40* foi encontrada com maior abundância nas plantas inoculadas 48 hai. Essas proteínas participam de diversos processos celulares das plantas, incluindo os estresses abióticos e bióticos. Evidências mostram o envolvimento dessas proteínas no favorecimento da patogênese de alguns vírus e o silenciamento promoveu tolerância das plantas (Hofius *et al.* 2007). Outro trabalho interessante mostrou que o nocaute no gene codificador de *HSP40* promoveu uma melhora na tolerância a *Pyricularia oryzae* em arroz (Távora *et al.* 2022). No entanto, essas proteínas também podem desempenhar papel positivo na resistência contra outros patógenos. Um exemplo foi demonstrado em *Nicotiana tabacum* superexpressando o gene codificador de *HSP40* para a tolerância de *Pseudomonas solanacearum* (Wang *et al.* 2014). Entretanto o papel destas proteínas em interações suscetíveis não é bem compreendido. Dessa maneira, estudos de silenciamento visando identificar o papel desta proteína na interação tomate e *Xep* poderá esclarecer melhor se a atuação é na resistência ou suscetibilidade.

Outra proteína diferencialmente abundante em 48 hai foi a *Nucleoside diphosphate kinase* (A0A3Q7F3S0), que está envolvida em vários processos celulares, como na biossíntese

da clorofila e no desenvolvimento do cloroplasto, crescimento das raízes e metabolismo de açúcar. Além disso, é uma proteína bastante importante para o controle do estado redox em estresses abióticos e bióticos (Moon *et al.* 2003). O nocaute em um gene que codifica para essa proteína em arroz mostrou maior resistência a *Xanthomonas oryzae* e a regulação positiva de genes marcadores relacionados à patogênese, bem como melhorou a homeostase energética e o metabolismo hormonal (Ye *et al.* 2020).

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados deste trabalho ajudaram a elucidar mecanismos envolvidos na suscetibilidade do tomateiro a *Xep*, e identificar proteínas que potencialmente colaboram para o desenvolvimento da doença. As proteínas envolvidas com a suscetibilidade encontradas com abundância aumentada foram relacionadas com modulação negativa de fitohormônios relacionados a defesa e espécies reativas de oxigênio, bem como na colaboração de transporte de açúcar para o apoplasto, que favorece a nutrição de fitopatógenos. Para confirmação do papel das proteínas identificadas neste estudo na suscetibilidade a *Xep*, poderá ser realizado silenciamento gênico para a avaliação dos efeitos no desenvolvimento da doença. Além disso, a resistência recessiva livre de transgenes poderá ser alcançada por meio de edição gênica com ferramentas, como por exemplo CRISPR/Cas, que pode ser utilizada para se obter a perda da função do gene alvo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adhikari P, Adhikari TB, Louws FJ, Panthee DR (2020) Advances and challenges in bacterial spot resistance breeding in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). International Journal of Molecular Sciences 21:1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21051734>

Anastasia K, Sonja H (2013) Evaluation and Optimization of Mass Spectrometric Settings during Data-dependent Acquisition Mode: Focus on LTQ-Orbitrap Mass Analyzers

Andrews GL, Dean RA, Hawkrigde AM, Muddiman DC (2011) Improving proteome coverage on a LTQ-Orbitrap using design of experiments. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 22:773–783

- Araújo ER, Costa JR, Ferreira MAS V, Quezado-Duval AM (2017) Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. *Plant Pathology* 66:159–168. <https://doi.org/10.1111/ppa.12543>
- Arshid S, Tahir M, Fontes B, Montero EF de S, Castro MS, Sidoli S, Schwämmle V, Roepstorff P, Fontes W (2017a) Neutrophil proteomic analysis reveals the participation of antioxidant enzymes, motility and ribosomal proteins in the prevention of ischemic effects by preconditioning. *Journal of proteomics* 151:162–173
- Arshid S, Tahir M, Fontes B, de Souza Montero EF, Castro MS, Sidoli S, Roepstorff P, Fontes W (2017b) High performance mass spectrometry based proteomics reveals enzyme and signaling pathway regulation in neutrophils during the early stage of surgical trauma. *PROTEOMICS–Clinical Applications* 11:1600001
- Bai Y, Pavan S, Zheng Z, Zappel NF, Reinstädler A, Lotti C, De Giovanni C, Ricciardi L, Lindhout P, Visser R, Theres K, Panstruga R (2008) Naturally occurring broad-spectrum powdery mildew resistance in a Central American tomato accession is caused by loss of *mlo* function. *Molecular plant-microbe interaction. MPMI* 21:30–39. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-1-0030>
- Bernal E, Liabeuf D, Francis DM (2020) Evaluating Quantitative Trait Locus Resistance in Tomato to Multiple *Xanthomonas* spp. *Plant disease* 104:423–429
- Boch J, Bonas U (2010) *Xanthomonas AvrBs3* family-type III effectors: discovery and function. *Annual review of phytopathology* 48:419–436. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>
- Bozkurt TO, Richardson A, Dagdas YF, Mongrand S, Kamoun S, Raffaele S (2014) The Plant Membrane-Associated *REMORINI.3* Accumulates in Discrete Perihyphae Domains and Enhances Susceptibility to *Phytophthora infestans*. *Plant physiology* 165:1005–1018. <https://doi.org/10.1104/pp.114.235804>
- Cai J, Chen T, Wang Y, Qin G, Tian S (2020) SIREM1 Triggers Cell Death by Activating an Oxidative Burst and Other Regulators. *Plant physiology* 183:717–732. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00120>
- Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB,

- Frommer WB (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468:527–532. <https://doi.org/10.1038/nature09606>
- Du H, Wang Y, Yang J, Yang W (2015) Comparative Transcriptome Analysis of Resistant and Susceptible Tomato Lines in Response to Infection by *Xanthomonas perforans* Race T3. *Frontiers in Plant Science* 6:
- Dubreuil-Maurizi C, Poinssot B (2012) Role of glutathione in plant signaling under biotic stress. *Plant signaling & behavior* 7:210–212. <https://doi.org/10.4161/psb.18831>
- Fujita K, Inui H (2021) Review: Biological functions of major latex-like proteins in plants. *Plant Science* 306:110856. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.110856>
- Garcia-Ruiz H, Szurek B, Van den Ackerveken G (2021) Stop helping pathogens: engineering plant susceptibility genes for durable resistance. *Current opinion in biotechnology* 70:187–195. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.05.005>
- Gupta PK, Balyan HS, Gautam T (2021) SWEET genes and TAL effectors for disease resistance in plants: Present status and future prospects. *Molecular plant pathology* 22:1014–1026. <https://doi.org/10.1111/mpp.13075>
- He S, Yuan G, Bian S, Han X, Liu K, Cong P, Zhang C (2020) Major Latex Protein *MdMLP423* Negatively Regulates Defense against Fungal Infections in Apple. *International journal of molecular sciences* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21051879>
- Hofius D, Maier AT, Dietrich C, Jungkunz I, Börnke F, Maiss E, Sonnewald U (2007) Capsid protein-mediated recruitment of host *DnaJ-like proteins* is required for *Potato virus Y* infection in tobacco plants. *Journal of virology* 81:11870–11880
- Hutton SF, Scott JW, Yang W, Sim S-C, Francis DM, Jones JB (2010) Identification of QTL associated with resistance to bacterial spot race T4 in tomato. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 121:1275–1287. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1387-5>
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>

Julius BT, Leach KA, Tran TM, Mertz RA, Braun DM (2017) Sugar Transporters in Plants: New Insights and Discoveries. *Plant and Cell Physiology* 58:1442–1460. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx090>

Klymiuk V, Coaker G, Fahima T, Pozniak CJ (2021) Tandem Protein Kinases Emerge as New Regulators of Plant Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 34:1094–1102. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-21-0073-CR>

Koch K (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current opinion in plant biology* 7:235–246

Koseoglou E, van der Wolf JM, Visser RGF, Bai Y (2022) Susceptibility reversed: modified plant susceptibility genes for resistance to bacteria. *Trends in Plant Science* 27:69–79. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.07.018>

Kunwar S, Iriarte F, Fan Q, da Silva E, Ritchie L, Nguyen NS, Freeman JH, Stall RE, Jones JB, Minsavage G V, Colee J, Scott JW, Vallad GE, Zipfel C, Horvath D, Westwood J, Hutton SF, Paret ML (2018) Transgenic Expression of *EFR* and *Bs2* Genes for Field Management of Bacterial Wilt and Bacterial Spot of Tomato. *Phytopathology®* 108:1402–1411. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0424-R>

Li D, Liu H, Zhang H, Wang X, Song F (2008) *OsBIRH1*, a DEAD-box RNA helicase with functions in modulating defence responses against pathogen infection and oxidative stress. *Journal of experimental botany* 59:2133–2146. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern072>

Liu F, Ma Z, Cai S, Dai L, Gao J, Zhou B (2022) *ATP-citrate lyase B* (ACLB) negatively affects cell death and resistance to *Verticillium* wilt. *BMC plant biology* 22:443. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03834-z>

Liu Y, Wang K, Cheng Q, Kong D, Zhang X, Wang Z, Wang Q, Xie Q, Yan J, Chu J, Ling H-Q, Li Q, Miao J, Zhao B (2020) Cysteine protease *RD21A* regulated by E3 ligase *SINAT4* is required for drought-induced resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 71:5562–5576. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa255>

Mbengue M, Bourdais G, Gervasi F, Beck M, Zhou J, Spallek T, Bartels S, Boller T, Ueda T, Kuhn H, Robatzek S (2016) Clathrin-dependent endocytosis is required for immunity mediated by pattern recognition receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:11034–11039. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606004113>

- Moeder W, del Pozo O, Navarre DA, Martin GB, Klessig DF (2007) Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology* 63:273–287. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9087-x>
- Moon H, Lee B, Choi G, Shin D, Prasad DT, Lee O, Kwak S-S, Kim DH, Nam J, Bahk J (2003) NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:358–363
- Muñoz Bodnar A, Bernal A, Szurek B, López CE (2013) Tell me a tale of TALEs. *Molecular biotechnology* 53:228–235. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9619-3>
- Padmanabhan M, Cournoyer P, Dinesh-Kumar SP (2009) The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cellular microbiology* 11:191–198. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01260.x>
- Pavan S, Jacobsen E, Visser RGF, Bai Y (2010) Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular breeding: new strategies in plant improvement* 25:1–12. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9323-6>
- Raffaele S, Vaillau F, Léger A, Joubès J, Miersch O, Huard C, Blée E, Mongrand S, Domergue F, Roby D (2008) A *MYB* Transcription Factor Regulates Very-Long-Chain Fatty Acid Biosynthesis for Activation of the Hypersensitive Cell Death Response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20:752–767. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.054858>
- Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature protocols* 2:1896–1906
- Ribeiro DG, de Almeida RF, Fontes W, de Souza Castro M, de Sousa MV, Ricart CAO, da Cunha RNV, Lopes R, Scherwinski-Pereira JE, Mehta A (2019) Stress and cell cycle regulation during somatic embryogenesis plays a key role in oil palm callus development. *Journal of proteomics* 192:137–146
- Romeis T (2001) Protein kinases in the plant defence response. *Current Opinion in Plant Biology* 4:407–414. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00193-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00193-X)

- Ruan B, Hua Z, Zhao J, Zhang B, Ren D, Liu C, Yang S, Zhang A, Jiang H, Yu H, Hu J, Zhu L, Chen G, Shen L, Dong G, Zhang G, Zeng D, Guo L, Qian Q, et al. (2019) *OsACL-A2* negatively regulates cell death and disease resistance in rice. *Plant biotechnology journal* 17:1344–1356. <https://doi.org/10.1111/pbi.13058>
- Schwartz AR, Morbitzer R, Lahaye T, Staskawicz BJ (2017) TALE-induced *bHLH* transcription factors that activate a pectate lyase contribute to water soaking in bacterial spot of tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: E897–E903. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620407114>
- Scott JW, Hutton SF, Shekasteband R, Sim SC, Francis DM (2013) Identification of tomato bacterial spot race T1, T2, T3, T4, and *Xanthomonas gardneri* resistance QTLs derived from PI 114490 populations selected for race T4. In: IV International Symposium on Tomato Diseases 1069. pp 53–58
- Shi R, Panthee DR (2020) Transcriptome-Based Analysis of Tomato Genotypes Resistant to Bacterial Spot (*Xanthomonas perforans*) Race T4. *International journal of molecular sciences* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21114070>
- Shirasu K, Schulze-Lefert P (2003) Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends in plant science* 8:252–258
- Son S, Oh CJ, An CS (2014) *Arabidopsis thaliana* Remorins Interact with *SnRK1* and Play a Role in Susceptibility to *Beet Curly Top Virus* and *Beet Severe Curly Top Virus*. *The plant pathology journal* 30:269–278. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2014.0061>
- Sousa LJ, Bezerra ACM, Maximiano MR, Távora FKP, Cury NF, Oliveira-Neto OB, Bindschedler LV, Franco OL, Blum LEB, Mehta A (2023) Expression of tomato susceptibility genes triggered by *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* and disease control by short antisense oligodeoxynucleotide gene silencing. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 128:102163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102163>
- Stein O, Granot D (2019) An Overview of Sucrose Synthases in Plants. *Frontiers in Plant Science* 10:
- Sun K, Wolters A-MA, Loonen AEHM, Huibers RP, van der Vlugt R, Goverse A, Jacobsen E, Visser RGF, Bai Y (2016) Down-regulation of *Arabidopsis DND1* orthologs in potato and

tomato leads to broad-spectrum resistance to late blight and powdery mildew. *Transgenic research* 25:123–138. <https://doi.org/10.1007/s11248-015-9921-5>

Távora FTPK, Meunier AC, Vernet A, Portefaix M, Milazzo J, Adreit H, Tharreau D, Franco OL, Mehta A (2022) CRISPR/Cas9-Targeted Knockout of Rice Susceptibility Genes *OsDjA2* and *OsERF104* Reveals Alternative Sources of Resistance to *Pyricularia oryzae*. *Rice Science* 29:535–544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rsci.2022.04.001>

Thomazella DP de T, Seong K, Mackelprang R, Dahlbeck D, Geng Y, Gill US, Qi T, Pham J, Giuseppe P, Lee CY, Ortega A, Cho M-J, Hutton SF, Staskawicz B (2021) Loss of function of a *DMR6* ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2026152118>

Thordal-Christensen H (2020) A holistic view on plant effector-triggered immunity presented as an iceberg model. *Cellular and Molecular Life Sciences* 77:3963–3976. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03515-w>

Tsuda K, Katagiri F (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 13:459–465. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.006>

Välkängas T, Suomi T, Elo LL (2018) A comprehensive evaluation of popular proteomics software workflows for label-free proteome quantification and imputation. *Briefings in bioinformatics* 19:1344–1355

van Schie CCN, Takken FLW (2014) Susceptibility genes 101: how to be a good host. *Annual review of phytopathology* 52:551–581. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045854>

Vellosillo T, Aguilera V, Marcos R, Bartsch M, Vicente J, Cascón T, Hamberg M, Castresana C (2013) Defense activated by 9-lipoxygenase-derived oxylipins requires specific mitochondrial proteins. *Plant physiology* 161:617–627

Wang D, Wei L, Liu T, Ma J, Huang K, Guo H, Huang Y, Zhang L, Zhao J, Tsuda K, Wang Y (2023) Suppression of ETI by PTI priming to balance plant growth and defense through an *MPK3/MPK6-WRKYs-PP2Cs* module. *Molecular Plant* 16:903–918. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molp.2023.04.004>

- Wang G, Cai G, Kong F, Deng Y, Ma N, Meng Q (2014) Overexpression of tomato chloroplast-targeted *DnaJ* protein enhances tolerance to drought stress and resistance to *Pseudomonas solanacearum* in transgenic tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry* 82:95–104. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.05.011>
- Yang C-L, Liang S, Wang H-Y, Han L-B, Wang F-X, Cheng H-Q, Wu X-M, Qu Z-L, Wu J-H, Xia G-X (2015) Cotton major latex protein 28 functions as a positive regulator of the ethylene responsive factor 6 in defense against *Verticillium dahliae*. *Molecular plant* 8:399–411. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.023>
- Ye J, Ding W, Chen Y, Zhu X, Sun J, Zheng W, Zhang B, Zhu S (2020) A nucleoside diphosphate kinase gene *OsNDPK4* is involved in root development and defense responses in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 251:77. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03355-9>
- Yu Y (2020) Remorins: Essential Regulators in Plant-Microbe Interaction and Cell Death Induction. *Plant Physiology* 183:435–436. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00490>
- Zhang J, Xin L, Shan B, Chen W, Xie M, Yuen D, Zhang W, Zhang Z, Lajoie GA, Ma B (2012) PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Molecular & cellular proteomics* 11.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela Suplementar 1. Proteínas diferencialmente abundantes de plantas de tomateiro 24 horas após a inoculação com *Xep* em comparação com plantas inoculadas com solução salina.

ID proteínas aumentadas 24h (UniProt)	Peptídeos usados para quantificação	Score	Anova (p)	FC	Descrição	Código GO	Processo biológico	Função molecular	Componente celular
A0A3Q7ER22	2	105.16	0.0004	4.4	MEP cytidyltransferase	GO:0008299	Processo biossintético	Atividade de transferase	-
A0A3Q7HXY7	2	120.58	0.0005	654.4	Ribosomal protein L10e/L16 domain-containing	GO:0006412	Tradução	Structural molecule activity	Ribossomo
K4B017	4	232.32	0.0006	11.8	Ubiquitin-like domain-containing protein	GO:0016567	Processo de modificação de proteínas	Ligação à proteína	Citoplasma
A0A3Q7J2V8	2	114.15	0.0022	43.2	Gamma aminobutyrate transaminase 2	GO:0009102	Processo biossintético	Atividade de transferase	-
A0A3Q7H112	2	89.11	0.0037	144.1	Peptidase M24 domain-containing protein	-	-	-	-
A0A3Q7HGC8	3	148.68	0.0041	3.95	Chaperonin CPN60-2, mitochondrial	GO:0006457	Processo biossintético	Ligação ao ácido nucléico	Mitocôndria
A0A3Q7GBS3	2	104.61	0.0046	20.61	30S ribosomal protein S13, chloroplastic	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7IZ03	10	892.01	0.0061	6.296	Heat shock cognate 70 kDa protein	GO:0051085	Processo metabólico de proteínas	Ligação à proteína	Citoplasma
E0Z1D0	2	66.32	0.0109	6.615	Sucrose synthase	GO:0005985	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de transferase	-
A0A3Q7G5V9	2	131.2	0.0111	10.275	KOW domain-containing protein	GO:0002181	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7F352	2	96.62	0.0168	3.152	Histidinol dehydrogenase	GO:0000105	Processo biossintético	Ligação	Citoplasma
A0A3Q7FXR7	5	305.52	0.0202	3.231	Bet v I/Major latex protein domain-containing protein	GO:0006952	Resposta ao estresse	-	-
A0A3Q7GRE5	3	148.46	0.0219	5.411	60S ribosomal protein L7a	GO:0003723	-	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo

Q01413	3	182.54	0.0294	4.261	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase B	GO:0006952	Resposta ao estresse	Atividade de hidrolase	Vacúolo
A0A3Q7GWC2	2	183.47	0.0306	16.875	NADP-dependent oxidoreductase domain-containing protein	GO:0016491	-	Atividade catalítica	-
A0A3Q7EHZ1	2	119.29	0.0324	23.873	Protein kinase domain-containing protein	GO:0006468	Processo de modificação de proteínas	Atividade quinase	-
A0A3Q7FR24	2	113.48	0.0324	3.836	Miraculin-like	GO:0010466	Processo metabólico de proteínas	Atividade de hidrolase	-
A0A3Q7G067	2	76.48	0.0351	4.7125	Methyltransferase type 11 domain-containing protein	GO:0008168	-	Atividade de transferase	-
A0A3Q7ELU4	2	140.39	0.0355	5.2840	ATPase	-	-	-	Membrana
A0A3Q7G6B6	3	144.45	0.0392	21.446	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit M, chloroplastic	GO:0016655	-	Atividade catalítica	Cloroplasto
A0A3Q7IAC1	23	1517.7	0.0449	1.6348	(S)-2-hydroxy-acid oxidase	GO:0051707	Resposta à estimulo biótico	Atividade catalítica	Perixissomo
P35057	4	327.72	0.0478	6.7732	Histone H4	GO:0006334	Organização de componentes celulares	Ligação ao ácido nucléico	Núcleo
A0A3Q7JBP6	5	336.86	0.0493	3.2407	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	GO:0046177	Processo catabólico	Atividade catalítica	Citosol
P07179	3	153.84	0.0497	5.0391	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit, chloroplastic 2	-	Resposta à estimulo biótico	Atividade catalítica	Cloroplasto
ID proteínas diminuídas 24h (UniProt)	Peptídeos usados para quantificação	Score	Anova (p)	FC	Descrição	Código GO	Processo biológico/ Função molecular/ Componente celular	Função molecular	Componente celular
A0A3Q7FTM5	6	281.84	0.00603	3.4	Ribonuclease	GO:0003723	Processo catabólico	Ligação ao ácido nucléico	Núcleo
A0A3Q7HPM9	2	162.32	0.02570	2.06	30S ribosomal protein S3	GO:0019843	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Núcleo
A0A3Q7IRS4	8	494.32	0.0351	1.33	UTP--glucose-1-phosphate	GO:0005977	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de transferase	Citoplasma
A0A3Q7G4W7	2	80.05	0.03831	3.46	Inositol-3-phosphate synthase	GO:0006021	Processo biossintético	Atividade catalítica	Citoplasma

Tabela Suplementar 2. Proteínas diferencialmente abundantes de plantas de tomateiro 48 horas após a inoculação com *Xep* em comparação com plantas inoculadas com solução salina.

ID proteínas aumentadas 48 h (UniProt)	Peptídeos usados para quantificação	Score	Anova (p)	FC	Descrição	Código GO	Processo biológico	Função molecular	Componente celular
A0A3Q7IM60	2	89.57	6.3128	23.028	V-type proton ATPase subunit	GO:0007034	Transporte	Atividade de transportador	Membrana
A0A3Q7IMD9	4	160.38	5.5828	23.805	S-adenosylmethionine synthase	GO:0006556	Processo biossintético	Atividade de transferase	Citosol
A0A3Q7GV49	12	992.72	8.5010	11.210	Protein kinase domain-containing protein	GO:0098542	Resposta ao estresse	Atividade quinase	Membrana
A0A3Q7ES92	2	83.91	0.0001	34.574	CBS domain-containing protein	-	-	-	-
A0A3Q7FWZ9	2	100.23	0.0001	6.1975	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	GO:0042026	Processo biossintético	Ligação ao ácido nucléico	-
P30264	15	1050.4	0.0001	23.742	Catalase isozyme 1	GO:0042542	Resposta ao estresse	Atividade catalítica	Citoplasma
A0A3Q7G242	3	178.38	0.0001	12.258	Phosphoglucumutase (alpha-D-glucose-1,6-bisphosphate-dependent)	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade catalítica	Citosol
A0A3Q7GE81	2	120.24	0.0002	6.0952	Uncharacterized protein	-	-	-	-
Q5QJB4	2	120.2	0.0002	8.0959	Harpin binding protein 1	-	-	-	-
K4DFV3	2	116.57	0.0003	38.292	Plasmamembrane intrinsic protein 13	GO:0009414	Resposta ao estresse	Atividade de transportador	Membrana plasmática
A0A3Q7JW47	2	81.76	0.0004	36.200	Heat shock 70 kDa protein 14	GO:0006457	Processo metabólico de proteína	Ligação ao ácido nucléico	Núcleo
Q9FZ05	3	175.26	0.0004	2.4848	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	GO:0010411	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de hidrolase	Região extracelular
A0A3Q7GYW5	4	229.71	0.0005	34.237	50S ribosomal protein L21, chloroplastic	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7IHS3	3	273.94	0.0005	6.5555	Chitin-binding type-1 domain-containing protein	GO:0016998	Processo catabólico	Atividade de hidrolase	Vacúolo

A0A3Q7JI81	2	114.51	0.0005	6.4787	Pyruvate kinase	GO:0006096	Precursor de geração de metabólitos e energia	de	Atividade quinase	Citoplasma
P17786	15	1270.9	0.0006	223.33	Elongation factor 1-alpha	GO:0006412	Tradução		Ligação ao ácido nucléico	Citoplasma
P43280	7	347.74	0.0006	11.470	S-adenosylmethionine synthase 1	GO:0006556	Processo biossintético		Atividade de transferase	Citosol
A0A3Q7EF20	4	248.79	0.0006	16.958	4-coumarate--CoA ligase	-	-	-	-	-
A0A3Q7FZI5	11	873.85	0.0009	5.8502	Triosephosphate isomerase, cytosolic	GO:0006096	Precursor de geração de metabólitos e energia	de	Atividade catalítica	Citosol
A0A3Q7JBV0	3	186.46	0.0009	2.9346	Polyadenylate-binding protein	-	-		Ligação ao ácido nucléico	Núcleo
P93236	2	115.82	0.0009	24.061	Zeaxanthin epoxidase, chloroplastic	GO:0009688	Processo biossintético		Atividade de nuclease	Cloroplasto
P54773	8	455.88	0.0010	12.913	Photosystem II 22 kDa protein, chloroplastic	GO:0015979	Fotossíntese		Ligação à proteína	Cloroplasto
A0A3Q7IGT1	2	83.63	0.0011	4.7200	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	GO:0019509	Processo biossintético		Atividade catalítica	Citoplasma
A0A3Q7H097	4	216.58	0.0011	9.0101	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	GO:0008652	Processo biossintético		Atividade de transferase	Cloroplasto
A0A3Q7IP94	13	798.62	0.0012	4.9671	Elongation factor G, chloroplastic	GO:0032543	Tradução		Ligação ao ácido nucléico	Mitocôndria
A0A3Q7HXY7	2	120.58	0.0014	37.367	Ribosomal protein L10e/L16 domain-containing protein	GO:0006412	Tradução		Atividade molecular estrutural	Ribossomo
A0A3Q7FXR7	5	305.52	0.0015	20.857	Bet v I/Major latex protein domain-containing protein	GO:0006952	Resposta ao estresse		-	-
A0A3Q7IJU8	2	123.5	0.0016	31.526	Magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase	GO:0015979	Fotossíntese		Atividade catalítica	Cloroplasto
A0A3Q7GBI5	3	143.66	0.0016	12.237	Histidine kinase/HSP90-like ATPase domain-containing protein	GO:0006457	Processo metabólico de proteínas	de	Ligação à proteína	-
A0A3Q7F3S5	5	298.42	0.0016	3.9472	S5 DRBM domain-containing protein	GO:0006412	Tradução		Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7FSA0	3	213.83	0.0016	41.083	Ribulose-phosphate 3-epimerase	GO:0009052	Precursor de geração de metabólitos e energia	de	Atividade catalítica	Citosol

A0A3Q7J2T1	2	125.22	0.0016	Infinity	Aconitate hydratase	GO:0006099	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade catalítica	Citosol
A0A3Q7GQM4	4	238.08	0.0017	17.358	Elongation factor 1-gamma 2	GO:0042221	Resposta à químicos	Atividade do fator de tradução	-
Q2MI75	34	2899.9	0.0019	48.930	Photosystem II CP47 reaction center protein	GO:0009772	Fotossíntese	Ligação	Cloroplasto
Q2MIA0	9	699.1	0.0019	5.8513	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	GO:0015979	Fotossíntese	Ligação	Cloroplasto
A0A3Q7FUB1	3	151.78	0.0020	3.1394	Magnesium-protoporphyrin IX methyltransferase C-terminal domain-containing protein	GO:0015995	Processo biossintético	Atividade de transferase	-
Q6SKP4	4	320.2	0.0020	4.5789	Ribosomal protein L3	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7F1D2	2	112.03	0.0021	19.974	Dienelactone hydrolase domain-containing protein	-	-	Atividade de hidrolase	-
B1Q3F1	8	404.17	0.0021	3.7421	Glutamate decarboxylase	GO:0006538	Processo catabólico	Atividade catalítica	Citosol
A0A3Q7FVL0	3	137.27	0.0022	24.061	Hydroxyphenylpyruvate reductase	-	-	Atividade catalítica	Citosol
A0A3Q7EUX7	3	168	0.0022	132.70	DHFR domain-containing protein	GO:0032259	Processo metabólico	Atividade catalítica	Citosol
A0A3Q7HGQ5	4	265.8	0.0022	10.419	Glutathione transferase	GO:0006749	Processo metabólico	Atividade de transferase	Citoplasma
A0A3Q7H3V2	7	566.57	0.0023	8.2590	AAA+ ATPase domain-containing protein	GO:0006508	Processo metabólico de proteína	Atividade de hidrolase	Cloroplasto
A0A3Q7EPC2	2	79.52	0.0023	9.2482	ATP citrate synthase	GO:0006099	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade de transferase	-
A0A3Q7ESN3	4	188.86	0.0024	119.77	Peptidase M16C associated domain-containing protein	GO:0016485	Processo metabólico de proteína	Atividade de hidrolase	Cloroplasto
A0A3Q7HRC7	6	466.47	0.0025	6.3319	Peptidase M20 dimerisation domain-containing protein	-	-	Atividade de hidrolase	-
A0A3Q7FU78	3	184.6	0.0025	14.183	Calnexin	GO:0030433	Resposta ao estresse	Ligação à proteína	Retículo endoplasmático
Q3I5C4	4	287.08	0.0025	51.691	Cytosolic ascorbate peroxidase 1	GO:0034599	Resposta ao estresse	Atividade catalítica	-

Q2MI60	2	128.29	0.0026	3.7029	Small ribosomal subunit protein uS19c	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo	
O81536	2	124.32	0.0028	48.755	Annexin	GO:0009414	Resposta ao estresse	Ligação à proteína	Membrana	
A0A3Q7G0P1	3	113.49	0.0028	27.240	Chorismate synthase	GO:0008652	Processo biossintético	Atividade catalítica	Citosol	
A0A3Q7HR44	3	121.17	0.0028	2.5141	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, chloroplastic	GO:0016024	Processo metabólico de lipídeos	Atividade de transferase	Cloroplasto	
A0A3Q7H8G2	5	273.08	0.0029	35.528	Cysteine proteinase 3	GO:2001235	Morte celular programada	Atividade de hidrolase	Região extracelular	
A0A3Q7HX95	2	99.76	0.0029	7.774	Fructose-bisphosphate aldolase	GO:0006096	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade catalítica	Citosol	
A0A3Q7IGB1	6	302.32	0.0031	3.2970	60S ribosomal protein L18a	GO:0006412	Tradução	Atividade molecular estrutural	Ribossomo	
A0A3Q7ISY0	2	95.77	0.0031	8.556	Sucrose transporter	GO:0005985	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de transportador	Vacúolo	
A0A3Q7J4I8	2	102.46	0.0032	6.9742	Adenylate kinase	GO:0009142	Processo metabólico de composto contendo nucleobase	Atividade quinase	Citoplasma	
Q43497	5	301.23	0.0036	8.5219	Monodehydroascorbate reductase	GO:0098869	Resposta à químicos	Atividade catalítica	Citoplasma	
A0A3Q7EQ90	3	227.45	0.0037	132.70	STI1/HOP DP domain-containing protein	GO:0045036	Transporte	Ligação	Estrutura intracelular	anatômica
A0A3Q7EZP5	2	106.29	0.0038	20.080	AB hydrolase-1 domain-containing protein	GO:0009694	Processo metabólico de lipídeos	Atividade de hidrolase	-	
A0A3Q7GPY6	2	102.15	0.0040	22.230	AB hydrolase-1 domain-containing protein	-	-	Atividade de hidrolase	-	
A0A3Q7FF30	3	167.24	0.0042	3.454	3-isopropylmalate dehydratase	GO:0009098	Processo biossintético	Atividade catalítica	-	
A0A3Q7GKD7	11	622.79	0.0043	7.390	Malic enzyme	GO:0006090	Processo metabólico	Atividade catalítica	Cloroplasto	
A0A3Q7J4P7	4	249.66	0.0043	95.058	50S ribosomal protein L13, chloroplastic	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Cloroplasto	
A0A3Q7G067	2	76.48	0.0045	8.511	Methyltransferase type 11 domain-containing protein	-	-	Atividade de transferase	-	
A0A3Q7FI22	3	163.49	0.0045	17.925	Rhodanese domain-containing protein	GO:0071277	Resposta à químicos	-	-	

A0A3Q7FBU5	2	64.18	0.0046	12.529	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	GO:0042026	Processo metabólico de proteínas	Ligação à proteína	Mitocôndria
A0A3Q7EUN5	4	191.28	0.0047	3.524	Glutamate--tRNA ligase	GO:0006424	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Mitocôndria
H6WYS2	2	131.66	0.0047	22.647	Assimilatory sulfite reductase (ferredoxin)	GO:0009409	Resposta ao estresse	Atividade catalítica	Plastídeo
C6K2K9	3	133.26	0.0047	10.025	GDP-mannose 3',5'-epimerase	-	-	Atividade catalítica	-
A0A3Q7EU87	2	138.96	0.0057	8.107	Triosephosphate isomerase, chloroplatic	GO:0006094	Processo metabólico de carboidratos	Atividade catalítica	Citosol
A0A3Q7HGJ9	44	3573.8	0.0063	2.660	Phosphoglycerate kinase	GO:0006094	Processo metabólico de carboidratos	Atividade quinase	Citosol
A0A3Q7I9H4	3	162.49	0.0063	2.138	Bet v I/Major latex protein domain-containing protein	GO:0006952	Resposta ao estresse	Atividade de hidrolase	Citoplasma
A0A3Q7FZG5	2	111.86	0.0065	15.218	UDP-glucuronate decarboxylase	GO:0042732	Processo metabólico de carboidratos	Atividade catalítica	Citoplasma
A0A3Q7FJJ3	10	691.54	0.0067	3.977	Actin	-	-	Atividade de hidrolase	Citoesqueleto
A0A3Q7FVM4	2	43.68	0.0067	1.583	Ras-related protein Rab7	-	-	Atividade de hidrolase	Membrana
A0A3Q7EN13	8	533.73	0.0068	4.059	TPM domain-containing protein	-	-	-	Membrana
A0A3Q7G505	2	147.86	0.0068	223.91	PLAT domain-containing protein	-	-	-	-
A0A3Q7IHG0	3	139.25	0.0069	4.681	Triosephosphate isomerase, chloroplatic	GO:0006094	Processo metabólico de carboidratos	Atividade catalítica	Citosol
A0A3Q7JGP1	8	631.84	0.0071	22.251	Tubulin beta chain	GO:0000226	Componente de organização celular	Atividade molecular estrutural	Citoesqueleto
Q6LB28	2	86.71	0.0074	19.988	Histone H3	-	-	Ligação ao ácido nucléico	Núcleo
A0A3Q7FS97	2	104.97	0.0075	8.137	Lactoylglutathione lyase	GO:0019243	Processo catabólico	Atividade catalítica	Citoplasma
A0A3Q7E824	2	124.78	0.0075	77.164	Formate--tetrahydrofolate ligase	GO:0035999	Processo metabólico	Ligação ao ácido nucléico	-
A0A3Q7FB67	4	263.31	0.0076	19.961	Ovule protein	-	-	Ligação	-
P36181	10	573.59	0.0077	2.204	Heat shock cognate protein 80	GO:0034605	Resposta ao estresse	Ligação à proteína	Citoplasma

A0A3Q7JHJ2	2	122.21	0.0078	212.27	40S ribosomal protein S18	GO:0006412	Tradução		Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7HRC2	2	135.86	0.0081	5.306	DUF642 domain-containing protein	-	-	-	-	-
A0A3Q7GU88	2	123.48	0.0083	Infinity	40S ribosomal protein S16	GO:0006412	Tradução		Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7JEJ5	2	117.68	0.0089	42.579	40S ribosomal protein S6	GO:0006412	Tradução		Atividade molecular estrutural	Ribossomo
A0A3Q7FWE8	14	1326.7	0.0090	31.978	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GO:0006006	Processo metabólico de carboidratos		Atividade catalítica	-
A0A3Q7I245	6	272.8	0.0090	14.410	Translation elongation factor EF1B beta/delta subunit guanine nucleotide exchange domain-containing protein	GO:0006414	Tradução		Ligação ao ácido nucléico	Citoplasma
A0A3Q7J8R5	3	212.53	0.0091	347.80	40S ribosomal protein S19	GO:0006412	Tradução		Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
P21568	6	441.88	0.0093	1.735	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	GO:0006457	Processo metabólico de proteínas		Atividade catalítica	Citoplasma
Q2MIB4	4	198.81	0.0093	96.439	ATP synthase subunit b, chloroplastic	GO:0046933	Transporte		Atividade de transportador	Cloroplasto
A0A3Q7IM00	6	462.73	0.0094	7.610	AB hydrolase-1 domain-containing protein	GO:0006412	Tradução		Atividade molecular estrutural	Ribossomo
A0A3Q7JDW3	2	81.83	0.0095	8.072	Rieske domain-containing protein	GO:0045036	Transporte		Atividade catalítica	Membrana
A0A3Q7EXK0	3	131.72	0.0096	447.26	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GO:0006006	Processo metabólico de carboidratos		Atividade catalítica	-
A0A3Q7J564	4	202.02	0.0097	288.92	Histone H2B	-	-		Ligação ao ácido nucléico	Núcleo
A0A3Q7H287	2	100.6	0.0097	16.873	PSI subunit V	GO:0015979	Fotossíntese		-	Membrana
A0A3Q7FNL7	5	271.09	0.0098	7.3744	40S ribosomal protein S3a	GO:0006412	Tradução		Atividade molecular estrutural	Ribossomo
A0A3Q7FAE2	3	146.48	0.0098	104.32	Peptidylprolyl isomerase	GO:0000413	Processo de modificação de proteínas		Atividade catalítica	-
A0A3Q7ENJ9	2	124.02	0.0099	2.5249	LOV domain-containing protein	GO:0006468	Processo de modificação de proteínas		Ligação ao ácido nucléico	Citoplasma

A0A3Q7HE62	2	80.04	0.0100	3.3936	NAD(P)-binding domain-containing protein	GO:0051555	Processo biossintético	Atividade catalítica	-
A0A3Q7HW79	3	140.28	0.0101	121.37	Peptidase M1 alanyl aminopeptidase C-terminal domain-containing protein	-	-	Ligação	-
A0A3Q7JER0	2	88.71	0.0102	11.575	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like UBA domain-containing protein	GO:0043066	Morte celular programada	-	-
A0A3Q7JBQ5	2	123.95	0.0104	69.985	Ribosomal protein S2	GO:0006412	Tradução	Atividade estrutural	molecular Ribossomo
A0A3Q7FW96	2	96.05	0.0107	2.3273	Pyruvate kinase	GO:0006096	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade quinase	Citoplasma
A0A3Q7EB31	2	88.41	0.0107	3.0264	Ricin B-type lectin domain-containing protein	-	-	-	-
A0A3Q7F2B5	3	174.38	0.0109	2.3688	60S ribosomal protein L32	GO:0006412	Tradução	Atividade estrutural	molecular Ribossomo
A0A3Q7FCE4	21	1619.4	0.0111	64.257	Serine hydroxymethyltransferase	GO:0019264	Processo biossintético	Atividade de transferase	Citoplasma
A0A3Q7GRY3	3	125.11	0.0116	4.9470	50S ribosomal protein L3, chloroplastic	GO:0006412	Tradução	Atividade estrutural	molecular Ribossomo
A0A3Q7F386	10	757.26	0.0117	104.90	Photosystem I reaction center subunit III	GO:0015979	Fotossíntese	-	Cloroplasto
A0A3Q7HCH3	2	112.07	0.0117	89.749	NADP-dependent oxidoreductase domain-containing protein	-	-	Atividade catalítica	Citoplasma
A0A3Q7I6K7	3	135.66	0.0120	29.111	Aldo_ket_red domain-containing protein	-	-	-	Membrana
A0A3Q7JYX1	5	304.79	0.0120	2.2091	Ribosomal protein L6 alpha-beta domain-containing protein	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7ES45	3	289.58	0.0121	47.376	GTP-binding nuclear protein	GO:0006606	Transporte	Ligação ao ácido nucléico	Citoplasma
Q2MI94	5	335.31	0.0124	9.1412	ATP synthase epsilon chain, chloroplastic	GO:0046933	Transporte	Atividade de transportador	Membrana
A0A3Q7HMR2	18	1080.6	0.0124	3.1773	Tr-type G domain-containing protein	GO:0006414	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Citosol

A0A3Q7IA43	2	88.53	0.0129	41.518	C2 NT-type domain-containing protein	-	-	-	-
B6ECN9	2	71.95	0.0131	5.3543	Aminoaldehyde dehydrogenase 2	GO:0019285	Processo biossintético	Atividade catalítica	-
A0A3Q7FWH1	2	205.43	0.0134	238.97	Germin-like protein	-	-	Ligação	Região extracelular
A0A3Q7HW81	2	102.76	0.0134	48.386	60S ribosomal protein L4 C-terminal domain-containing protein	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7HT62	4	271.12	0.0137	6.1200	PGR5-like protein 1A, chloroplastic	GO:0009773	Fotossíntese	Atividade catalítica	Cloroplasto
O65818	2	133.33	0.0137	98.959	Histone H2B.2	-	-	Ligação ao ácido nucléico	Núcleo
Q9SDZ6	2	108.48	0.0139	2.8893	Phospholipase D	GO:0046470	Processo metabólico de lipídeos	Atividade de hidrolase	Membrana plasmática
A0A3Q7HX94	3	148.08	0.0141	10.660	Bacterial surface antigen (D15) domain-containing protein	GO:0045037	Transporte	Atividade de transportador	Membrana
A0A3Q7JYM3	2	177.58	0.0143	7.3922	Plectin/S10 N-terminal domain-containing protein	GO:0003735	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7J9P7	5	252.44	0.0145	5.325	Cytochrome c domain-containing protein	GO:0006122	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade catalítica	Mitocôndria
Q2MI71	2	94.15	0.0149	3.2677	Cytochrome b6	GO:0015979	Fotossíntese	Ligação	Membrana
A0A3Q7G6A3	2	62.7	0.0156	8.589	Protein kinase domain-containing protein	GO:0006468	Processo de modificação de proteínas	Atividade quinase	-
Q9XEX8	3	165.99	0.0156	2.550	Remorin 1	-	-	-	-
A0A3Q7EZK3	2	97.34	0.0160	5.041	Leucine--tRNA ligase	GO:0009791	Desenvolvimento pós-embriogênico	Atividade catalítica	-
A0A3Q7JBP6	6	336.86	0.0161	4.544	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	GO:0009051	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade catalítica	Citosol
P05119	3	128.71	0.0162	30.459	Wound-induced proteinase inhibitor 2	GO:0010466	Processo metabólico de proteínas	Atividade de hidrolase	Região extracelular
A0A3Q7I883	3	126.55	0.0169	3.721	60S ribosomal protein L13a	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7J1M0	4	170.16	0.0170	36.639	Plastoquinol--plastocyanin reductase	GO:0045158	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade de transportador	Cloroplasto

K4AT92	2	88.71	0.0172	30.984	AGO4A	GO:0051607	Resposta ao estresse	Ligação ao ácido nucléico	Citoplasma
Q645M9	3	265.62	0.0174	160.65	Malate dehydrogenase	GO:0006099	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade catalítica	Citoplasma
A0A3Q7IQZ0	3	211.32	0.0184	9.308	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	GO:0008652	Processo biossintético	Atividade de transferase	Cloroplasto
A0A3Q7GEI3	2	126.78	0.0191	42.294	Ribosomal protein L18e/L15P domain-containing protein	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7GZX3	3	220.26	0.0194	2.2292	Ribosomal protein L6 alpha-beta domain-containing protein	GO:0002181	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7HWQ1	3	158.96	0.0201	5.3116	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase	GO:0004467	Processo metabólico de lipídeos	Atividade catalítica	Retículo endoplasmático
A0A3Q7HLZ4	2	113.21	0.0206	4.5757	tRNA-binding domain-containing protein	-	-	Ligação ao ácido nucléico	-
K4BYA6	2	71.11	0.0208	4.0297	Protein SIEVE ELEMENT OCCLUSION B-like	GO:0010088	Desenvolvimento da estrutura anatômica	-	-
A0A3Q7FPB3	2	124.7	0.0208	64.060	Adenylate kinase	GO:0004017	Processo metabólico de composto contendo nucleobase	Atividade quinase	Citoplasma
A0A3Q7EUR6	3	178.51	0.0209	4.011	Protein kinase domain-containing protein	GO:0006468	Processo de modificação de proteínas	Atividade quinase	Citoplasma
A0A3Q7HY56	4	341.47	0.0210	12.939	Large ribosomal subunit protein uL5c	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7FW21	2	120.02	0.0211	32.063	WD_REPEATS_REGION domain-containing protein	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Ligação à proteína	Citoplasma
A0A3Q7GXS5	2	97.02	0.0212	18.581	60S ribosomal protein L34	GO:0006412	Tradução	Atividade molecular estrutural	Ribossomo
A0A3Q7JAQ4	3	135.79	0.0213	246.89	V-type proton ATPase catalytic subunit A	GO:0046034	Processo metabólico de composto contendo nucleobase	Atividade de transportador	Cloroplasto
A0A5H1ZRW2	2	133.25	0.0213	9.829	Cytosol aminopeptidase domain-containing protein	GO:0006508	Processo metabólico de proteínas	Atividade de hidrolase	Citoplasma
Q2MI97	2	108.33	0.0216	8.328	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit J, chloroplastic	GO:0019684	Fotossíntese	Atividade catalítica	Cloroplasto

A0A3Q7EHZ1	2	119.29	0.0217	31.24	Protein kinase domain-containing protein	GO:0006468	Processo de modificação de proteínas	Atividade quinase	-
P07180	51	3547.1	0.0220	16.089	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit, chloroplastic 3	GO:0019253	Fotossíntese	Atividade catalítica	Cloroplasto
P26300	4	234.31	0.0222	30.697	Enolase	GO:0006096	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade catalítica	Citosol
K4BRC3	4	138.04	0.0222	24.577	ATPase F1/V1/A1 complex alpha/beta subunit nucleotide-binding domain-containing protein	-	-	Ligação ao ácido nucléico	-
K4BNY4	2	103.35	0.0223	2.0310	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase	GO:0051252	Processo metabólico de composto contendo nucleobase	Atividade catalítica	-
Q2MI64	2	80.23	0.0224	5.6872	Large ribosomal subunit protein uL14c	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7GKU3	5	395.74	0.0225	12.981	30S ribosomal protein S15, chloroplastic	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7GGP4	2	90.57	0.0225	8.5040	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta, mitochondrial	GO:0006508	Processo metabólico de proteínas	Atividade de hidrolase	Mitocôndria
K4BDP2	4	219.65	0.0226	7.4892	Phosphorus transporter	GO:0009651	Resposta ao estresse	Atividade de transportador	Mitocôndria
A0A3Q7GLK1	8	401.71	0.0234	3.876	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic	GO:0006000	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de hidrolase	Citoplasma
A0A3Q7F7G5	3	181.62	0.0240	8.511	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial	GO:0006099	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade catalítica	Mitocôndria
A0A3Q7J0B1	2	92.91	0.0241	50.035	Glutathione reductase	GO:0045454	Homeostase celular	Atividade catalítica	Citoplasma
A0A3Q7F507	2	71.5	0.0246	8.0856	RRM domain-containing protein	-	-	Ligação ao ácido nucléico	Citosol
A0A3Q7IT40	2	131.61	0.0247	4.080	Pyruvate kinase	GO:0006096	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade quinase	Citoplasma
A0A3Q7IQB7	3	186.07	0.0249	52.093	Phosphoglycolate phosphatase	-	-	Atividade de hidrolase	-
A0A3Q7FRE5	5	373.06	0.0251	2.709	Rhodanese domain-containing protein	GO:0071277	Resposta à químicos	-	Membrana

A0A3Q7HNN1	3	136.21	0.0258	64.579	Clathrin heavy chain	GO:0006886	Transporte		Ligação à proteína	Membrana plasmática
Q5NE17	2	135.48	0.0261	294.24	Malate dehydrogenase [NADP], chloroplatic	GO:0006099	Precursor de geração de metabólitos e energia	de	Atividade catalítica	Cloroplasto
A0A3Q7HVG8	3	169.18	0.0262	3.9181	Aminotransferase class I/classII domain-containing protein	GO:1901566	Processo biossintético		Atividade de transferase	-
A0A3Q7HDJ6	7	467.59	0.0263	10.193	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplatic	GO:0009768	Fotossíntese		Ligação	Cloroplasto
A0A3Q7G720	3	210.81	0.0268	9.367	Fructose-bisphosphatase	GO:0006000	Processo metabólico de carboidratos	de	Atividade de hidrolase	Citoplasma
A0A3Q7HBK4	8	497.2	0.0277	8.710	Aconitate hydratase	GO:0006099	Precursor de geração de metabólitos e energia	de	Atividade catalítica	Mitocôndria
A0A3Q7IZ03	11	892.01	0.0280	3.409	Heat shock cognate 70 kDa protein	GO:0042026	Processo metabólico de proteínas	de	Ligação à proteína	Citoplasma
A0A3Q7G784	2	52.67	0.0281	55.814	J domain-containing protein	GO:0072318	Transporte		Ligação à proteína	Citoplasma
Q2MI62	2	112.09	0.0288	41.741	Small ribosomal subunit protein uS3c	GO:0006412	Tradução		Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7EQJ0	2	134.95	0.0298	4.090	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	GO:0009088	Processo biossintético		Atividade catalítica	-
A0A3Q7H652	7	445.36	0.0299	2.454	Plasma membrane ATPase	GO:0051453	Homeostase celular		Atividade de transportador	Membrana plasmática
A0A3Q7IZI6	4	218.91	0.0303	1.3107	NADP-dependent oxidoreductase domain-containing protein	-	-	-	-	-
Q9THX6	4	309.79	0.0305	42.651	Thylakoid lumenal 29 kDa protein, chloroplatic	GO:0034599	Resposta ao estresse		Atividade catalítica	Cloroplasto
A0A3Q7G6B6	3	144.45	0.0310	3.7948	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit M, chloroplatic	-	-		Atividade catalítica	Cloroplasto
A0A3Q7F5X2	2	128.41	0.0317	90.700	40S ribosomal protein S15	GO:0006412	Tradução		Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7GYZ2	3	116.34	0.0321	2.084	T-complex protein 1 subunit eta	GO:0006457	Processo metabólico de proteínas	de	Ligação à proteína	Citosol
A0A3Q7FE06	4	197.68	0.0327	3.458	V-type proton ATPase subunit a	GO:0046961	Transporte		Atividade de transportador	Membrana

A0A3Q7EQN7	2	100.08	0.0327	10.562	Fibronectin type III-like domain-containing protein	GO:0031222	Processo metabólico de carboidratos	Atividade de hidrolase	Região extracelular
A0A3Q7EY39	3	136.82	0.0337	4.131	Obg-like ATPase 1	-	-	Ligação	Citoplasma
A0A3Q7FJ73	2	101.85	0.0344	16.525	Mitochondrial outer membrane protein porin 2-like	GO:0008308	Transporte	Atividade de transportador	Mitocôndria
A0A3Q7H7Q7	3	175.14	0.0353	3.820	DNA-directed RNA polymerase	GO:0034605	Resposta ao estresse	Ligação ao ácido nucléico	Citosol
Q2MI54	2	107.14	0.0354	2.537	Small ribosomal subunit protein uS7cz/uS7cy	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7GRY0	2	96.38	0.0358	17.715	Glutathione transferase	GO:0009407	Processo catabólico	Atividade de transferase	Citoplasma
A0A3Q7ID32	3	119.72	0.0365	57.424	Rhodanese domain-containing protein	-	-	Atividade de transferase	-
P23322	23	1488.8	0.0370	3.570	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	GO:0010207	Fotossíntese	Atividade catalítica	Cloroplasto
A0A3Q7H9C9	3	182.13	0.0373	10.494	Glycosyltransferase	-	-	Atividade de transferase	-
A0A3Q7FKJ0	2	85.48	0.0376	5.084	Leucine-rich repeat-containing N-terminal plant-type domain-containing protein	GO:0098542	Resposta ao estresse	-	-
A0A3Q7I0I6	2	155.96	0.0387	14.856	Methyltransferase type 11 domain-containing protein	-	-	Atividade de transferase	-
P49118	3	232.3	0.0390	5.432	Luminal-binding protein	GO:0030968	Resposta ao estresse	Ligação à proteína	Citoplasma
A0A3Q7I7B3	3	234.21	0.0396	51.560	Malate dehydrogenase	GO:0006099	Precursor de geração de metabólitos e energia	-	-
A0A3Q7FWS2	2	134.3	0.0396	4.793	Cyclin N-terminal domain-containing protein	GO:0000079	Processo de modificação de proteínas	Atividade quinase	Citoplasma
A0A3Q7H0E8	3	175.45	0.0399	2.762	40S ribosomal protein S7	GO:0006412	Tradução	Atividade molecular estrutural	Ribossomo
A0A3Q7ILV3	7	912.87	0.0405	63.854	Thioredoxin-dependent peroxiredoxin	GO:0006979	Resposta ao estresse	Atividade catalítica	-
A0A3Q7E8I1	2	116.34	0.0408	10.412	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	GO:0006099	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade catalítica	Mitocôndria

A0A3Q7HQF1	2	60.22	0.0420	11.899	60S ribosomal protein L7	GO:0003735	Tradução		Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7GB74	2	91.18	0.0422	3.8012	Cysteine proteinase	GO:0051603	Processo metabólico de	Atividade de hidrolase		Região extracelular
A0A3Q7GX88	2	133.39	0.0428	4.623	Protein disulfide-isomerase	GO:0034976	Resposta ao estresse	Atividade catalítica		Retículo endoplasmático
A0A3Q7F0J1	3	150.79	0.0435	28.900	30S ribosomal protein S21, chloroplastic	GO:0006412	Tradução	Atividade molecular estrutural		Ribossomo
A0A3Q7F898	3	197.97	0.0440	8.102	Peptidylprolyl isomerase	-	-	Atividade catalítica		Tilacoide
A0A3Q7FR24	2	113.48	0.0445	3.807	Miraculin-like	GO:0010466	Processo metabólico de	Atividade de hidrolase		-
A0A3Q7GZ89	2	132.06	0.0451	1.5617	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 56	-	-	-		-
A0A3Q7GGQ3	3	196.42	0.0461	11.087	Protein HHL1, chloroplastic	-	-	-		-
A0A3Q7ISE3	3	256.23	0.0485	18.579	Dehydroascorbate reductase	GO:0033355	Processo metabólico de	Atividade catalítica		-
A0A3Q7F3S0	2	150.87	0.0493	Infinity	Nucleoside diphosphate kinase	GO:0006241	Processo metabólico de	Atividade quinase		-
Q08307	6	348.19	0.0494	2.854	Polyphenol oxidase E, chloroplastic	GO:0046148	Processo metabólico	Atividade catalítica		Cloroplasto
ID proteínas diminuídas 48 h (UniProt)	Peptídeos usados para quantificação	Score	Anova (p)	FC	Descrição	Código GO	Processo biológico/ Função molecular/ Componente celular	Função molecular	Componente celular	
A0A3Q7ILF6	2	94.2	0.0001	4.6712	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	GO:0015995	Processo biossintético	Atividade catalítica	Citosol	
A0A3Q7IAX8	2	126.43	0.0002	12.456	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	GO:0009768	Fotossíntese	Ligação	Cloroplasto	
Q2MIB8	2	56.16	0.0014	5.2300	Small ribosomal subunit protein bS16c	GO:0006412	Tradução	Atividade molecular estrutural	Ribossomo	
A0A3Q7FBR4	2	47.69	0.0019	5.2203	Cyclin delta-3	-	-	-	-	
A0A3Q7GBP8	5	352.29	0.0021	2.0089	Thioredoxin domain-containing protein	-	-	Atividade catalítica	-	

P49297	3	158.48	0.0022	2.4431	Isocitrate lyase	GO:0006097	Processo metabólico de carboidratos	Atividade catalítica	Peroxisomo
A0A3Q7GR11	2	120.45	0.0025	3.5649	NERD domain-containing protein	-	-	-	-
A0A3Q7JRP8	2	124.59	0.0026	4.1357	VOC domain-containing protein	GO:0019243	Processo catabólico	Atividade catalítica	Citoplasma
Q2MIA5	11	995.58	0.0027	4.2925	Photosystem II D2 protein	GO:0009772	Fotossíntese	Atividade catalítica	Cloroplasto
A0A3Q7I3Q3	3	358.47	0.0030	1.3897	Ribosome-recycling factor, chloroplastic	GO:0032544	Tradução	Ligação	Cloroplasto
P27489	5	221.05	0.0031	1.7793	Chlorophyll a-b binding protein 13, chloroplastic	GO:0009768	Fotossíntese	Ligação	Cloroplasto
A0A3Q7ECG0	9	666.56	0.0033	2.6520	RuBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic	GO:0042026	Processo metabólico de proteínas	Ligação ao ácido nucléico	-
Q8RU74	2	158.67	0.0034	2.7021	3-dehydroquinate synthase, chloroplastic	GO:0008652	Processo biossintético	Atividade catalítica	Cloroplasto
A0A3Q7F5S4	2	94.4	0.0035	4.2637	Cyanobacterial aminoacyl-tRNA synthetase CAAD domain-containing protein	-	-	-	Cloroplasto
Q2MI63	4	300.83	0.0045	3.8758	Large ribosomal subunit protein uL16c	GO:0032543	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7HVF7	2	98.75	0.0054	3.344	50S ribosomal protein L11, chloroplastic	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7ESW4	7	430.27	0.0059	1.937	Ferredoxin--nitrite reductase, chloroplastic	GO:0020037	-	Ligação	-
Q2MIB5	29	2198.8	0.0060	2.437	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	GO:0046933	Transporte	Atividade de transportador	Cloroplasto
Q2MIC0	5	203.58	0.0063	1.738	Photosystem II protein D1	GO:0009772	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade catalítica	Cloroplasto
A0A3Q7H5X9	4	149.95	0.0065	6.236	Elongation factor Ts, mitochondrial	GO:0070125	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Mitocôndria
A0A3Q7G087	2	119.21	0.0074	2.512	Phosphoglucomutase (alpha-D-glucose-1,6-bisphosphate-dependent)	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Atividade catalítica	Citosol

A0A3Q7IRF8	2	154.66	0.0080	1.589	Glutamine synthetase	GO:0006542	Processo biossintético	Atividade catalítica	Citoplasma
A0A3Q7FRC7	3	142.24	0.0080	1.973	Elongation factor Tu	GO:0070125	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Mitocôndria
C6K2L0	9	532.14	0.0082	2.411	GDP-mannose 3',5'-epimerase	-	-	Atividade catalítica	-
A0A3Q7FSE5	3	142.95	0.0084	1.832	Aldehyde dehydrogenase domain-containing protein	-	-	Atividade catalítica	-
A0A3Q7IDX8	32	2207.4	0.0089	1.886	Transketolase	GO:0006098	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade de transferase	Citosol
A0A3Q7EYM6	4	325.48	0.0093	2.201	Fructose-bisphosphate aldolase	GO:0006096	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade catalítica	Citosol
A0A3Q7EUS0	2	115.47	0.0103	1.970	PCI domain-containing protein	GO:0042176	Processo metabólico de proteínas	Atividade reguladora enzimática	Estrutura anatômica intracelular
A0A3Q7IQJ3	4	227.4	0.0104	2.427	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain-containing protein At4g39970	-	-	Atividade de hidrolase	-
A0A3Q7ISK8	3	133.08	0.0114	3.647	Nitrate reductase	GO:0006809	Processo biossintético	Atividade catalítica	-
A0A3Q7HG29	3	203.81	0.0124	2.801	Multifunctional fusion protein	GO:0006096	Precursor de geração de metabólitos e energia	Atividade catalítica	Citosol
P43282	2	116.54	0.0124	3.504	S-adenosylmethionine synthase 3	GO:0006556	Processo biossintético	Atividade de transferase	Citosol
A0A3Q7FP18	4	202.13	0.0132	2.358	Uncharacterized protein	-	-	-	-
A0A3Q7JXC3	4	137.32	0.0134	13.19	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	GO:0019253	Fotossíntese	Atividade catalítica	Plastídeo
A0A3Q7F8M2	2	147.06	0.0141	2.738	H(+)-exporting diphosphatase	GO:0009678	Transporte	Atividade de transportador	Membrana
A0A3Q7ERA8	4	232.54	0.0141	2.823	Lipoxygenase	GO:0006633	Processo biossintético	Atividade catalítica	-
A0A3Q7G0X6	7	338.15	0.0144	3.751	Sulfate adenyltransferase	GO:0000103	Processo metabólico	Atividade de transferase	-
A0A3Q7FMY9	3	203.52	0.0154	1.714	PDZ domain-containing protein	-	-	-	Membrana
A0A3Q7F1Z4	2	89.66	0.0161	2.270	DUF4283 domain-containing protein	-	-	-	-
K4BF05	2	137.56	0.0165	4.277	Alcohol acyl transferase	-	-	Atividade de transferase	-

A0A3Q7GDG7	9	524.85	0.0175	1.859	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GO:0006006	Processo metabólico de carboidratos	Atividade catalítica	-
Q8GZR6	2	137.32	0.0195	2.753	GcpE	GO:0019288	Processo metabólico de lipídeos	Atividade catalítica	Cloroplasto
Q2MI87	13	1075.7	0.0211	2.201	Cytochrome f	GO:0015979	Fotossíntese	Atividade catalítica	Cloroplasto
A0A3Q7G7W4	3	193.11	0.0084	1.832	Uncharacterized protein	GO:0005975	Processo metabólico de carboidratos	Ligação à carboidrato	-
A0A3Q7EQ38	10	518.33	0.0279	2.558	Phosphoribosylamine--glycine ligase	GO:0140662	Processo metabólico de proteínas	Atividade catalítica	Citoplasma
A0A3Q7J408	4	265.1	0.0281	1.988	20 kDa chaperonin, chloroplastic	GO:1901671	Resposta ao estresse	Ligação à proteína	Cloroplasto
A0A3Q7FLA3	31	2090.5	0.0281	1.539	Glutamine amidotransferase type-2 domain-containing protein	GO:0006537	Processo biossintético	Atividade catalítica	-
A0A3Q7ENV3	4	262.87	0.0335	4.817	Thioredoxin domain-containing protein	GO:0006457	Processo metabólico de proteínas	Atividade catalítica	Reticulo endoplasmático
A0A3Q7HPM9	4	162.32	0.0347	3.069	30S ribosomal protein S3, chloroplastic	GO:0006412	Tradução	Ligação ao ácido nucléico	Ribossomo
A0A3Q7JX44	6	367.72	0.0358	4.436	ATP synthase delta chain, chloroplastic	GO:0009773	Fotossíntese	Atividade de transportador	Membrana
Q40147	3	168.33	0.0400	1.848	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, chloroplastic	GO:0015995	Processo biossintético	Atividade catalítica	Cloroplasto
A0A3Q7FLI5	2	101.86	0.0403	2.623	Mitochondrial outer membrane protein porin of 34 kDa	GO:0008308	Transporte	Atividade de transportador	Mitocôndria
A0A3Q7HV38	2	144.91	0.0483	3.701	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	GO:0006086	Processo metabólico de composto contendo nucleobase	Atividade catalítica	Mitocôndria
A0A3Q7F529	13	732.23	0.0484	2.297	ATP synthase gamma chain, chloroplastic	GO:0015986	Processo metabólico de composto contendo nucleobase	Atividade de transportador	Membrana

CAPÍTULO 3

**NOCAUTE NO GENE *SITFIIA*_γ DE TOMATEIRO VISANDO
RESISTÊNCIA À MANCHA BACTERIANA**

Nocaute do gene *SITFIIA* γ de tomateiro por meio de CRISPR/Cas9 visando resistência à mancha bacteriana

RESUMO

O descobrimento do sistema CRISPR/Cas para a edição de genomas tem permitido a exploração de outras maneiras para conferir a resistência de plantas à patógenos, como por exemplo a resistência recessiva mediada por meio do nocaute de genes que contribuem para o desenvolvimento da doença, denominados de genes de suscetibilidade (Genes S). Nesse sentido, este estudo teve como objetivo o nocaute no gene *SITFIIA* γ que demonstrou papel na suscetibilidade do tomateiro à mancha bacteriana. Assim, uma construção no vetor B357p9ioR-35sCasWT:*SITFIIA* γ contendo o RNAGuia e a enzima *Cas9* foi utilizada para produzir o nocaute gênico. As plantas editadas foram avaliadas molecularmente para conferir as mutações na sequência alvo (*on-target*). Os resultados demonstraram que sete linhagens T0 positivas para *Cas9* apresentaram mutações na sequência alvo. Em relação a natureza das mutações, cinco linhagens foram consideradas bialélicas e duas quiméricas. Os eventos de mutação mais predominante foram as deleções (61,54%), seguido das substituições de nucleotídeos (37,50%) e apenas uma inserção (0,96%) encontrada em uma das linhagens. Os resultados deste trabalho são bastante promissores para a geração de plantas resistentes a *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*, uma vez que resultados prévios demonstraram que o silenciamento de *SITFIIA* γ foi capaz de reduzir os sintomas da mancha bacteriana do tomateiro.

Palavras-chave: Genes de suscetibilidade, Resistência recessiva, edição gênica, *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans*

1. INTRODUÇÃO

A cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é bastante afetada pela mancha bacteriana, causada por três espécies do gênero *Xanthomonas* que levam a perdas econômicas substanciais (Pereira *et al.* 2011; Barak *et al.* 2016). Atualmente, a forma mais eficaz para o controle dos danos causados pela bactéria é por meio da aplicação de antibióticos e produtos à base de cobre (Potnis *et al.* 2015). As aplicações frequentes desses produtos não só levantam preocupações ambientais, mas também dão origem a cepas resistentes (Khanal *et al.* 2020).

Nesse aspecto, a resistência da planta tem sido priorizada para o manejo da doença e alguns autores identificaram vários genes de resistência (Genes R) (Hutton *et al.* 2010).

Entretanto, Adhikari *et al.* (2020) discutem que para os programas de melhoramento visando o controle da mancha bacteriana deve ser realizada a piramidação gênica, devido à especificidade de cada Gene R aos diferentes efetores de cada uma das três espécies de *Xanthomonas* que infectam o tomateiro. Ainda assim, a bactéria possui mecanismos para obtenção de novos efetores, que podem suplantam esse tipo de resistência ao longo do tempo (Gassmann *et al.* 2000). Uma forma de driblar essas dificuldades é a busca pela resistência recessiva, por meio do silenciamento ou nocaute de genes que contribuem para a virulência do patógeno, denominados genes de Suscetibilidade (Genes S) (Koseoglou *et al.* 2022).

Sabe-se que a produção de uma proteína é dependente da sequência correta do mRNA expresso e uma pequena variação na sequência do gene correspondente, incluindo a substituição de nucleotídeos e inserção/deleção de certos fragmentos, pode levar à produção de uma proteína não funcional (Liu *et al.* 2021). Nesse aspecto, por meio da ferramenta de edição genômica *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein Cas9* (CRISPR/Cas9) é possível direcionar um RNA guia (gRNA) que tenha complementariedade a uma sequência específica de um Gene S e levar à quebra da dupla fita de DNA, para assim ativar mecanismos de reparação celular resultando em alterações na sequência do gene com consequente perda da função gênica (Jinek *et al.* 2012).

No primeiro capítulo deste trabalho, identificamos que o gene *SITFIIA γ* (*Transcription initiation factor IIA subunit 2 (gamma) gene*) teve sua expressão aumentada durante a interação de *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* com tomateiro e o silenciamento levou a uma diminuição dos sintomas da doença. O gene *SITFIIA γ* está envolvido na transcrição dependente de RNA polimerase II e interage com outras proteínas reguladoras da transcrição para formar um complexo de pré-iniciação da transcrição, que se liga ao sítio TATA box de promotores, iniciando a expressão gênica (Høiby *et al.* 2007). Huang *et al.* (2017) relatam que esse gene é visado por efetores bacterianos do tipo *TALs* (*Transcription Activator-like Effectors*) para induzir a transcrição de Genes S. Alguns autores demonstram que o silenciamento ou nocaute deste gene em arroz pode melhorar a resistência das plantas a bactérias do gênero *Xanthomonas* (Yuan *et al.* 2016; Tian *et al.* 2019).

Baseado nas evidências da literatura e as fomentadas no capítulo anterior, propomos a busca de maiores conhecimentos acerca da importância do gene para o estabelecimento da doença. Nesse sentido, este capítulo tem como objetivo verificar a resistência de tomateiro a

Xanthomonas, mediante aos efeitos do nocaute do gene *SITFIIA γ* por meio da ferramenta CRISPR/Cas9.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Construção do vetor CRISPR/Cas9

O gene *SITFIIA γ* (Solyc12g088030) foi caracterizado *in silico* quanto à adequação aos parâmetros obrigatórios e limitantes do sistema CRISPR/Cas9, como a presença de uma sequência *PAM* (*protospacer adjacent motif*) singularidade da sequência alvo no genoma, predição de *off-targets*, entre outros. O RNA-guia (gRNA) foi desenhado *in silico* utilizando a ferramenta *on-line* (*web-based*) *CRISPOR* (<http://crispor.tefor.net>). Os componentes do sistema CRISPR foram acomodados no vetor 357-p9ioR-35sCasWT (<https://dna-cloning.com/>). As etapas necessárias para a montagem do cassete de expressão foram realizadas pela empresa Epoch Life Science (USA) e posteriormente inseridos em *Agrobacterium tumefaciens* cepa EH105 por meio da técnica de eletroporação (**Figura 1b**) (Brasileiro & Carneiro 2015).

2.1 Preparação de *Agrobacterium tumefaciens*

Foram plaqueados 80 μ L da cultura de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo B357p9ioR-35sCasWT:*SITFIIA γ* em meio de cultura LB sólido com 50 mg/L⁻¹ de rifampicina e 100 mg L⁻¹ de espectinomicina. A cultura bacteriana foi incubada por 48 h a 28°C e em seguida a massa bacteriana foi coletada e suspensa em meio de cultura composto por sais MS e vitamina na concentração total (Murashige & Skoog 1962), acrescido de 30 g/L⁻¹ de sacarose. A concentração bacteriana foi ajustada para 10⁸ UFC/mL⁻¹ (densidade ótica a 600 nm [OD₆₀₀] = 0,3) e foram adicionados 100 μ M de acetoseringona. A suspensão bacteriana foi incubada em temperatura ambiente por 10 min e utilizada no item a seguir para a transformação dos explantes.

2.2 Regeneração de explantes de MicroTom

O processo de co-cultura e transformação de tomate da cultivar MicroTom foi realizado conforme Pino *et al.* (2010), com algumas modificações. Cerca de 45 sementes previamente

desinfestadas foram colocadas para germinar em cada frasco de plástico contendo meio de cultura MS, em seguida os frascos foram selados com plástico filme e incubados a 25°C por 4-5 dias no escuro, seguido de 3 dias sob fotoperíodo de 16 horas.

Os explantes foram obtidos por meio da divisão transversal de cotilédones, com a remoção das extremidades distal e proximal. Os explantes foram mantidos sob agitação por 15 minutos em co-cultura líquida e em seguida, foram transferidos para papel filtro esterilizado para remoção do excesso do líquido. Os explantes foram transferidos com a face abaxial para baixo em placas contendo meio de co-cultura sólido, composto por sais MS e vitamina B5 na concentração total, acrescido de 30 g/L⁻¹ de sacarose, 0,4 µM de ANA, 100 µM de acetoseringona e 6 g/L⁻¹ de ágar com pH 5,8. As placas foram seladas com micropore e mantidas no escuro por 48 horas.

Os explantes foram transferidos para o meio de indução de gemas composto por sais MS e vitamina na concentração total (Murashige & Skoog 1962), acrescido de 30 g/L⁻¹ de sacarose, 5 µM de zeatina, 200 mg/L⁻¹ de cefotaxima, 100 mg/L⁻¹ de timentina, 100 mg/L⁻¹ de canamicina e 6 g/L⁻¹ de Agar com pH 5,8. Os explantes foram transferidos três vezes a cada dez dias para novas placas contendo meio de seleção para desenvolvimento das gemas e brotos. As brotações das gemas com desenvolvimento maior que 1,5 cm foram transferidas para frascos de vidro contendo sais MS e vitamina B5 na concentração total, acrescido de 30 g/L⁻¹ de sacarose, 200 mg/L⁻¹ de cefotaxima, 100 mg/L⁻¹ de timentina, 100 mg/L⁻¹ de canamicina e 6 g/L⁻¹ de Agar com pH 5,8 para alongamento da parte aérea e enraizamento. As plantas que alongaram, mas não enraizaram foram transferidas para o meio descrito anteriormente, acrescido de 0,5 mg/L⁻¹ de AIB.

2.3 Aclimação e obtenção da geração T1

As plantas T0 enraizadas foram retiradas do meio de cultura, lavadas em água corrente e transferidas para vasos de 500 mL contendo substrato orgânico (Carolina Soil) e vermiculita numa proporção de 1:1. As plantas foram mantidas em câmara úmida por meio de uma cobertura plástica por três dias, após isso, foi realizada a retirada gradual do plástico para submeter as plantas nas condições naturais de crescimento. As plantas T0 foram autofecundadas naturalmente para produção frutos. As sementes T1 foram extraídas dos frutos aos 80 dias após

a aclimação, lavadas para retirada da mucilagem e secas por cinco dias à temperatura ambiente.

Para a confirmação da transformação das plantas, foi realizada a extração de DNA conforme Doyle & Doyle (1987) de folíolos das plantas, seguido da amplificação das regiões genômicas da *Cas9* por meio de PCR convencional utilizando ao pares de primers específicos (F- CTACGACGTTTCGCAAGATGA e R- CACTTCCTTGGTGGAGGTGT), resultando em um produto de amplificação de 982 pb.

2.4 Caracterização das mutações

Para comprovar a ocorrência da edição gênica no gene *SITFIIA γ* e caracterização dos tipos de mutação foi realizado a PCR da região que flanqueia o sítio alvo da edição (*on-target*) com primers específicos (F- TGTGTTACTGGGTTTCATAGGTG e R- CATTTTTGGGATGTCGCCTC), resultando em 629 pb, seguido do sequenciamento Sanger dos eventos positivos para a *Cas9* (linhagens mutantes T0). Os cromatogramas obtidos foram analisados utilizando a ferramenta CRISPR-ID (<http://crispid.gbiomed.kuleuven.be/>) para a decodificação das mutações em alelos de cada evento de mutação. Adicionalmente, os cromatogramas de cada linhagem foram checados manualmente para análise apropriada dos dados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para estudar a eficiência da edição gênica de tomateiro cv. MicroTom por meio de CRISPR/Cas9, foram geradas linhagens mutantes induzidas pelo sistema de edição com o vetor B357p9ioR-35sCasWT visando o nocaute do gene *SITFIIA γ* . O RNA guia acoplado ao vetor foi projetado com 100 % de complementariedade com a região *on-target*, e inserido em *A. tumefaciens* (**Figura 1 a-b**).

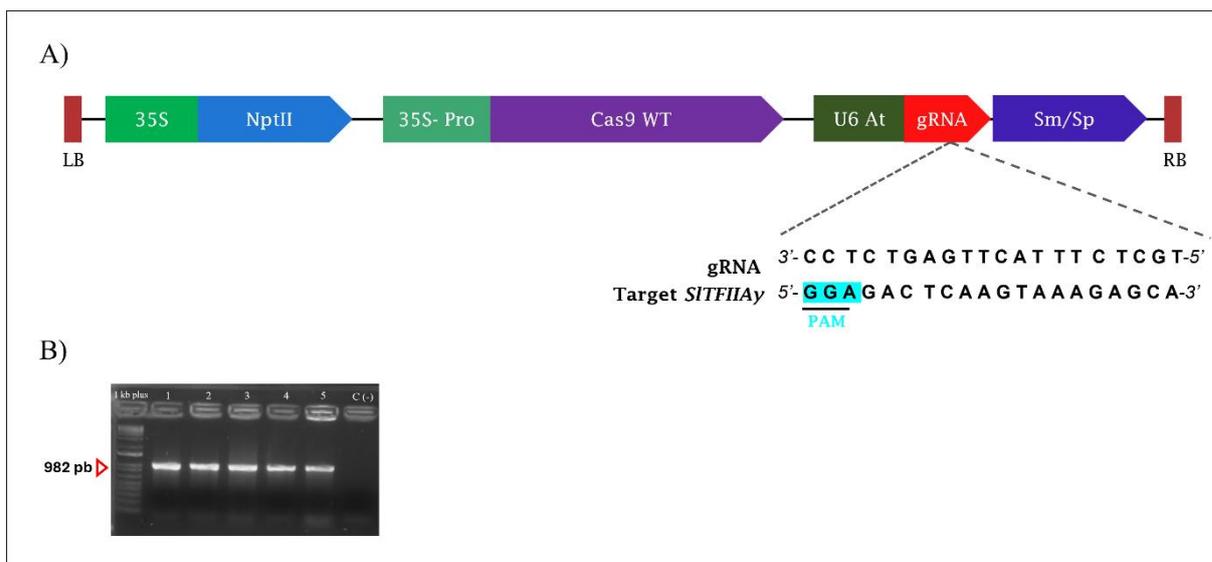


Figura 1. Construção do vetor de expressão contendo os componentes CRISPR/Cas9 para a edição gênica; **A)** Mapa do vetor B357p9ioR-35sCasWT contendo os cassetes dos componentes CRISPR/Cas, o cassete para o gene marcador de seleção de plantas *NPTII* (Neomicina fosfotransferase II) e o cassete para o gene marcador de seleção de bactérias espectinomomicina/estreptomicina entre as bordas do T-DNA; **B)** Gel de eletroforese dos produtos de amplificação para o gene da *Cas9* das colônias de *A. tumefaciens* transformadas.

Este estudo possibilitou a regeneração de 10 linhagens da geração T0 (**Figura 2 a-g**) e sete eventos foram positivos para o gene *Cas9* (**Figura 2 h**). Sementes T1 foram obtidas dos eventos *sltIIaγ*₂, 3, 4, 5 e 9 cerca de 55 dias após a aclimação, no entanto, o evento *sltIIaγ*₁ não alongou a parte aérea após a aclimação e foi descartada, enquanto o *sltIIaγ*₈ produziu frutos sem sementes.

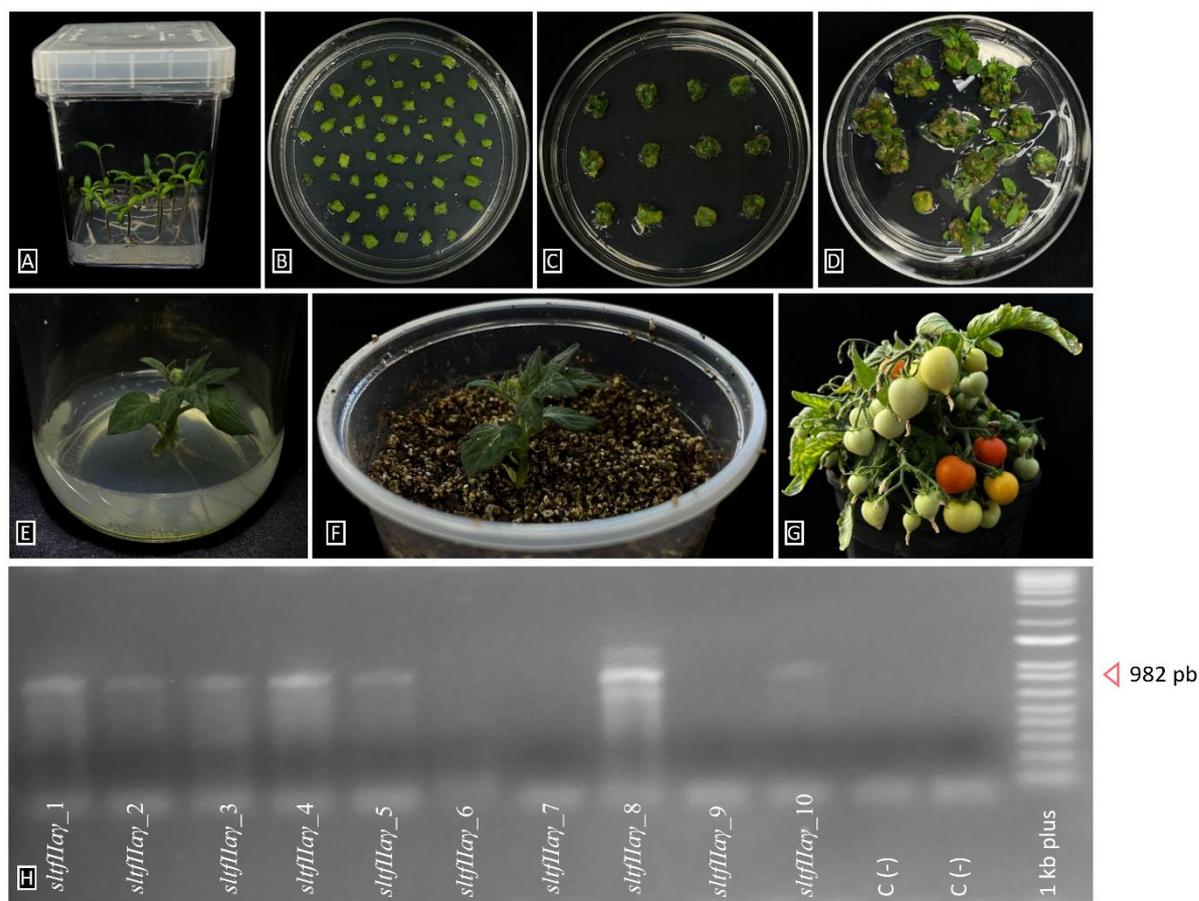


Figura 2. Etapas para a obtenção das linhagens editadas. A) Semeadura em meio MS; B) Explantes em meio de co-cultura; C-D) Gemas e brotos em meio de regeneração; E) Planta em meio de enraizamento; F) Planta aclimatada em substrato; G) Planta aclimatada em vaso produzindo frutos após 55 dias da aclimatação; H) Produtos de amplificação do gene *Cas9* das linhagens T0 obtidas.

A PCR utilizando primers específicos para a amplificação da região alvo de edição gênica permitiu a realização do sequenciamento Sanger e análise das mutações. Os resultados do sequenciamento mostraram que todos os eventos positivos para a *Cas9* apresentavam algum tipo de mutação na sequência alvo do gene *SITFLIAY* (**Figura 3 a**). Entre os eventos mutantes, duas linhagens (28,57 %) foram quiméricas (a mutação ocorreu em apenas algumas células) e cinco (71,43 %) foram bialélicas (ocorreram diferentes tipos de mutação nos dois alelos) (**Figura 3 b**). Mutações heterozigótica (mutação apenas em um dos alelos) e homozigóticas (mesmo tipo de mutação em ambos os alelos) não foram encontradas nas linhagens T0 obtidas. As mutações na região *PAM* encontradas foram substituições de nucleotídeos, enquanto na região *seed* foi observada apenas a inserção de um nucleotídeo (+ G) no *sltflay_3* e deleções

curtas de nucleotídeos únicos ou múltiplos nas demais linhagens (**Figura 3 b**). As substituições na região alvo representaram 61,54% das ocorrências de mutações, enquanto as deleções foram 37,50% e inserção de nucleotídeos de 0,96% (**Figura 3 c**).

A eficiência de transformação da planta depende de diversos fatores, tais como a espécie de planta, o sucesso na expressão da proteína Cas9, sequência alvo, expressão do RNA guia e o protocolo de transformação (Ma *et al.* 2016). A frequência de mutação por meio da expressão da Cas9 sob o promotor CaMV 35S varia significativamente de 37 a 95% em dicotiledôneas (Jiang *et al.* 2014). A sequência alvo com um conteúdo GC de 50 a 70 % pode resultar em alta eficiência de edição (Ma *et al.* 2015). Neste estudo, o RNA guia foi projetado para emparelhar com uma região alvo com conteúdo GC de 45 %, abaixo do recomendado, mas apresentando alta eficiência de mutação. A alta expressão do RNA guia pode ser alcançada com o promotor U6 utilizado neste trabalho, que possui uma série de vantagens, como o início preciso da transcrição (Li *et al.* 2007). Além disso, as plântulas são regeneradas a partir de explantes contendo células mutantes e não mutantes de maneira aleatória, o que aumenta as chances das plantas apresentarem mutações quiméricas na região alvo, uma vez que pode ocorrer formação de calos que protegem as células da seleção pelo antibiótico.

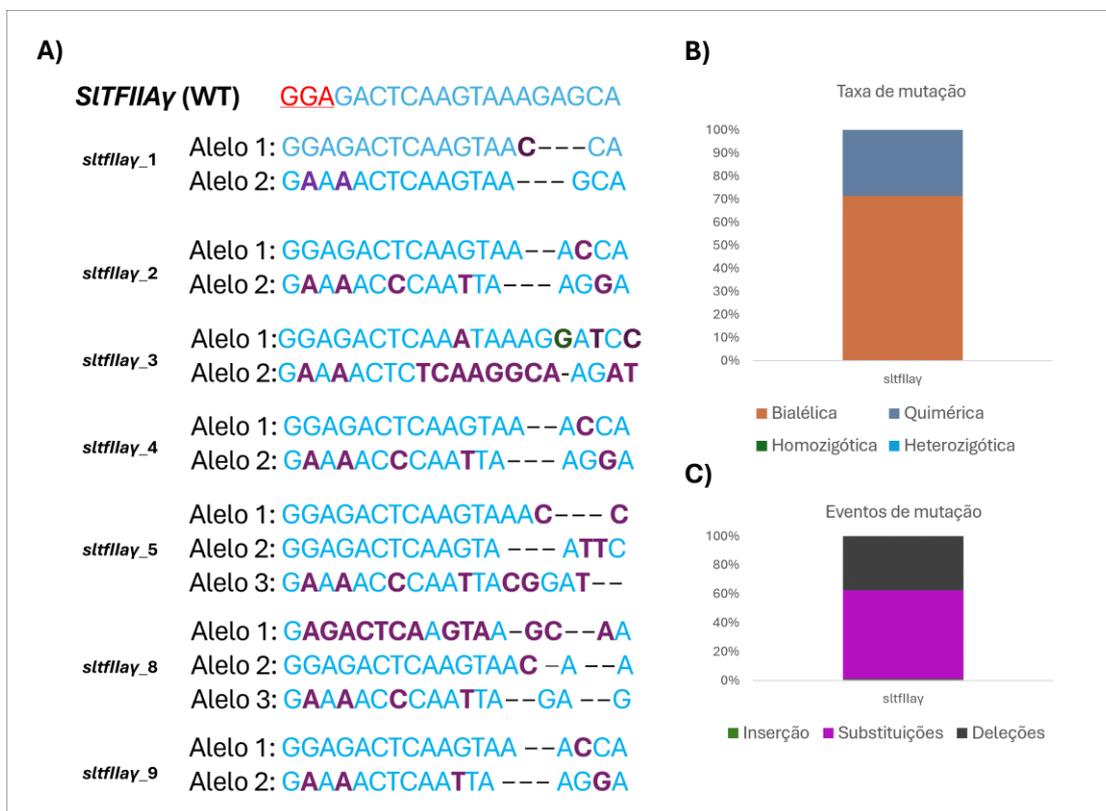


Figura 3. A) Eficiência das mutações gênicas induzidas por CRISPR/Cas9 nos locais alvos do gene *SITFIIAγ* nas linhagens T0. Nucleotídeos em vermelho representam a região *PAM*, nucleotídeos em azul representam a região *seed* conservada, nucleotídeos em roxo representam as substituições, nucleotídeos em verde representam a inserção e traços pretos representam as deleções; B e C) Natureza das mutações encontradas nas linhagens editadas.

O vetor de expressão utilizado neste trabalho exibiu a atividade de edição gênica esperada nos locais alvos do RNA guia, demonstrando o seu potencial uso para programas de melhoramento genético visando o nocaute gênico. A metodologia adotada para regeneração de planta editada via *A. tumefaciens* encurtou o tempo para melhoramento de tomateiro cv. MicroTom, eliminando vários fatores de risco associados a incorporação de genes exógenos.

Alguns trabalhos visando à edição em genes de suscetibilidade de tomateiro demonstram a eficiência da ferramenta de CRISPR/Cas para conferir nocaute gênico, bem como a resistência ou tolerância à patógenos. Os genes *XSP10* e *SISAMT* regulam negativamente a tolerância ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e o nocaute gênico promoveu tolerância à doença (Debbarma *et al.* 2023). Outro trabalho interessante visou o nocaute no gene *DMR6*, um regulador negativo da resistência à múltiplas doenças do tomateiro, como as causadas por *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas syringae*, *Phytophthora capsici* e *Pseudoidium neolycopersici* (Thomazella *et al.* 2021). A suscetibilidade do tomateiro à *Clavibacter michiganensis* por meio do nocaute no gene *WAT1* foi reduzida, no entanto, as linhagens mutantes apresentaram defeitos graves no crescimento (Koseoglou *et al.* 2023). O principal obstáculo para a utilização de CRISPR/Cas é introduzir uma mutação deletéria apenas na região alvo sem causar consequências fenotípicas inespecíficas.

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos demonstraram que a construção CRISPR/Cas deste trabalho permitiu a transformação e obtenção de plantas com mutações no gene alvo. A maioria das mutações nas plantas T0 foram do tipo bialélicas, apresentando em sua maioria deleções e substituição de nucleotídeos. Estes resultados são bastante promissores, uma vez que as plantas T1 contendo as mutações poderão ser desafiadas com *Xep* para avaliar a resistência contra a mancha bacteriana do tomateiro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari P, Adhikari TB, Louws FJ, Panthee DR (2020) Advances and challenges in bacterial spot resistance breeding in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). International Journal of Molecular Sciences 21:1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21051734>
- Barak JD, Vancheva T, Lefeuvre P, Jones JB, Timilsina S, Minsavage G V, Vallad GE, Koebnik R (2016) Whole-Genome Sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* Strains Clarify Taxonomy and Reveal a Stepwise Erosion of Type 3 Effectors. Front Plant Sci 7.
- Brasileiro ACM, Carneiro VT de C (2015) Manual de transformação genética de plantas, 2nd edn. Brasília.
- Debbarma J, Saikia B, Singha DL, Das D, Keot AK, Maharana J, Velmurugan N, Arunkumar KP, Reddy PS, Chikkaputtaiah C (2023) CRISPR/Cas9-Mediated Mutation in *XSP10* and *SISAMT* Genes Impart Genetic Tolerance to Fusarium Wilt Disease of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Genes (Basel) 14.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull v.19(1):1.
- Gassmann W, Dahlbeck D, Chesnokova O, Minsavage G V, Jones JB, Staskawicz BJ (2000) Molecular evolution of virulence in natural field strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Journal of bacteriology 182:7053–7059. <https://doi.org/10.1128/JB.182.24.7053-7059.2000>
- Højby T, Zhou H, Mitsiou DJ, Stunnenberg HG (2007) A facelift for the general transcription factor *TFIIA*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression 1769:429–436. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.04.008>
- Huang R, Hui S, Zhang M, Li P, Xiao J, Li X, Yuan M, Wang S (2017) A Conserved Basal Transcription Factor Is Required for the Function of Diverse TAL Effectors in Multiple Plant Hosts. Front Plant Sci 8.
- Hutton SF, Scott JW, Yang W, Sim S-C, Francis DM, Jones JB (2010) Identification of QTL associated with resistance to bacterial spot race T4 in tomato. TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik 121:1275–1287. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1387-5>

- Jiang W, Yang B, Weeks DP (2014) Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing in *Arabidopsis thaliana* and Inheritance of Modified Genes in the T2 and T3 Generations. PLOS ONE 9:e99225.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science (New York, NY) 337:816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Khanal S, Hind SR, Babadoost M (2020) Occurrence of Copper-Resistant *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri* in Illinois Tomato Fields. Plant Health Progress 21:338–344. <https://doi.org/10.1094/PHP-06-20-0048-RS>
- Koseoglou E, Hanika K, Mohd Nadzir MM, Kohlen W, van der Wolf JM, Visser RGF, Bai Y (2023) Inactivation of tomato *WATI* leads to reduced susceptibility to *Clavibacter michiganensis* through downregulation of bacterial virulence factors. Frontiers in Plant Science 14:
- Koseoglou E, van der Wolf JM, Visser RGF, Bai Y (2022) Susceptibility reversed: modified plant susceptibility genes for resistance to bacteria. Trends in Plant Science 27:69–79. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.07.018>
- Li X, Jiang D, Yong K, Zhang D (2007) Varied transcriptional efficiencies of multiple Arabidopsis U6 small nuclear RNA genes. Journal of Integrative Plant Biology 49:222–229
- Liu X, Meng G, Wang M, Qian Z, Zhang Y, Yang W (2021) Tomato *SIPUB24* enhances resistance to *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* race T3. Horticulture research 8:30. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00468-4>
- Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y (2015) A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Molecular plant 8:1274–1284
- Ma X, Zhu Q, Chen Y, Liu Y-G (2016) CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. Molecular plant 9:961–974
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 15:473–497. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

- Pereira RC, Araújo E, Ferreira M, Quezado-Duval AM (2011) Occurrence of *Xanthomonas* species causing bacterial spot in fresh market tomato fields in Brazil. *Acta Horticulturae* 914:61–64. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.914.8>
- Pino LE, Lombardi-Crestana S, Azevedo MS, Scotton DC, Borgo L, Quecini V, Figueira A, Peres LEP (2010) The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. *Plant Methods* 6:23. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-6-23>
- Potnis N, Timilsina S, Strayer A, Shantharaj D, Barak JD, Paret ML, Vallad GE, Jones JB (2015) Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology* 16:907–920. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mpp.12244>
- Thomazella DP de T, Seong K, Mackelprang R, Dahlbeck D, Geng Y, Gill US, Qi T, Pham J, Giuseppe P, Lee CY, Ortega A, Cho M-J, Hutton SF, Staskawicz B (2021) Loss of function of a *DMR6* ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118:. <https://doi.org/10.1073/pnas.2026152118>
- Tian J, Hui S, Shi Y, Yuan M (2019) The key residues of *OsTFIIAγ5/Xa5* protein captured by the arginine-rich TFB domain of TALEs compromising rice susceptibility and bacterial pathogenicity. *Journal of Integrative Agriculture* 18:1178–1188. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62108-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62108-2)
- Yuan M, Ke Y, Huang R, Ma L, Yang Z, Chu Z, Xiao J, Li X, Wang S (2016) A host basal transcription factor is a key component for infection of rice by TALE-carrying bacteria. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.19605>

CAPÍTULO 4

SUPEREXPRESSÃO DE UM GENE DE DEFESA *BOCHB4* DE *Brassica oleracea* CONTRA *Xanthomonas* VISANDO RESISTÊNCIA A DOENÇAS DO TOMATEIRO

Superexpressão de um gene de defesa de *Brassica oleracea* contra *Xanthomonas* visando resistência a doenças do tomateiro

RESUMO

De maneira geral, o sistema de imunidade inata das plantas confere resistência específica a um determinado patógeno. No entanto, algumas vias de sinalização de defesa das plantas são ativadas de maneira comum em diferentes interações. As proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas PR) são uma das principais moléculas-chave para a ativação do sistema de defesa das plantas e pode conferir resistência múltipla a doenças. Nessa perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo a superexpressão em tomateiro de um gene de defesa, identificado e validado anteriormente em *Arabidopsis thaliana*, visando a obtenção de resistência contra patógenos do tomateiro. Plantas transgênicas de *Solanum lycopersicum* superexpressando o gene que codifica uma endoquitinase foram obtidas, por meio da transformação estável mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Os resultados revelaram quatro eventos de transformação, sendo que três deles foram desafiados com *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xep*) e com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Observou-se uma redução na severidade da doença causada por *S. sclerotiorum* em dois eventos, demonstrando o potencial das plantas superexpressando endoquitinase para o controle de outros patógenos.

Palavras-chave: Endoquitinase, *Agrobacterium tumefaciens*, Transgenia, Resistência

1. INTRODUÇÃO

Os conhecimentos sobre o comportamento das plantas resistentes e suscetíveis quando desafiadas com patógenos tem colaborado para o desenvolvimento de cultivares resistentes (Gupta *et al.* 2015). Vários estudos mostram que as plantas que possuem a capacidade de reconhecer os efetores dos patógenos, ativam cascatas de sinalização da via do ácido salicílico (AS), levando a produção de Proteínas Relacionadas a Patogênese (Proteínas PR) e a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) (Thomma *et al.* 1998). Em contrapartida, as plantas suscetíveis tendem a ter um aumento de proteínas envolvidas com a síntese de ácido abscísico (ABA), que é antagônico à via do ácido salicílico e devido a isso, a expressão das Proteínas PR em plantas suscetíveis é menor comparado a plantas resistentes (Kim *et al.* 2011).

As Proteínas PR são armas bem conhecidas contra patógenos que têm sido utilizadas para fortalecer a resistência de plantas contra fitopatógenos (Ali *et al.* 2018). As quitinases são um grupo importante de Proteínas PR, encontradas na parede celular, apoplasto e na região extracelular das plantas e possuem a função principal de catalisar a clivagem hidrolítica da ligação β -1,4-glicosídeo da N-acetilglucosamina, o principal monossacarídeo da quitina (Patil *et al.* 2000). As quitinases possuem capacidade de hidrolisar ligações glicosídicas no interior de cadeias de quitina, dessa maneira, podem atuar na inibição do crescimento fúngico, uma vez que a quitina está presente na composição celular dos fungos (Dieryckx *et al.* 2015).

Embora historicamente o efeito das quitinases seja contra fungos e insetos, Guan & Chye (2008) mostraram que as quitinases interagem com carboidratos presentes na parede celular de bactérias e promove a aglutinação de bactérias Gram negativas. Além do efeito direto contra bactérias, a superexpressão de uma Proteína PR pode interagir e desencadear a expressão de outras proteínas relacionadas a defesa (Dong *et al.* 2017). As Proteínas PR podem portanto, desencadear vias de sinalização comuns para a defesa contra múltiplos patógenos (Goellner & Conrath 2008). Dessa forma, a superexpressão de PRs pode proteger as plantas contra o ataque de múltiplos patógenos, pois promove uma resposta de defesa geral (Ali *et al.* 2018).

Em estudos anteriores de proteômica e superexpressão de Proteínas PR, verificou-se que a superexpressão de *BoCHB4* (A0A0D3BPL2) aumentava a resistência de plantas contra *Xanthomonas campestris* (Santos *et al.* 2019). Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito da superexpressão da endoquitinase em tomateiro após o desafio com *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e *S. sclerotiorum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Construção do vetor de superexpressão

O gene *BoCHB4* foi expresso sob o controle do promotor constitutivo e terminador CaMV35S, presentes no vetor pBIN61 (Bendahmane *et al.* 2002), conforme Santos *et al.*, (2019) (**Figura 2**). As construções genéticas contendo o vetor de expressão foram realizadas pela empresa Epoch Life Science (USA) e inseridas em *A. tumefaciens* cepa EH105 por meio da técnica de eletroporação (Brasileiro & Carneiro 2015). As bactérias transformadas foram selecionadas por meio da resistência a antibióticos (canamicina e rifampicina a 100 mg/L⁻¹) conferidas pelo plasmídeo. Para confirmar a transformação, procedeu-se a PCR de colônia da

bactéria com a utilização de primers específicos para o gene *BoCHB4* (Santos *et al.* 2019). O tamanho e a qualidade do produto de amplificação para cada colônia foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) e as colônias transformadas com o vetor denominado pBIN61:*BoCHB4* foram conservadas em glicerol 50% e estocadas a -80 °C para uso posterior.

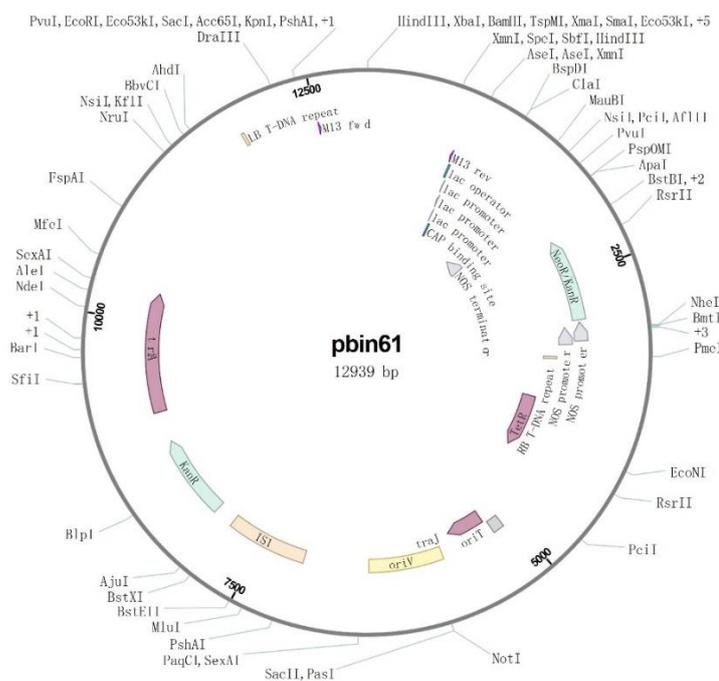


Figura 1. Mapa do vetor pBIN61 contendo os cassetes para superexpressão do gene *BoCHB4* em plantas de tomateiro.

2.2 Preparação de *Agrobacterium tumefaciens*

O preparo da *Agrobacterium tumefaciens* contendo o plasmídeo de superexpressão para a co-cultura foi realizada inicialmente por meio de plaqueamento de 80 µL da bactéria de estoque em placas contendo o meio de cultura LB sólido com 50 mg/L⁻¹ de rifampicina e 100 mg L⁻¹ de Canamicina. A cultura bacteriana crescida após a incubação das placas por 48 h a 28°C foi coletada e ressuspensa em meio de cultura composto por sais MS e vitamina na concentração total, acrescido de 30 g/L⁻¹ de sacarose. A concentração bacteriana foi ajustada para 10⁸ UFC/mL⁻¹ (densidade óptica a 600 nm [OD₆₀₀] = 0,3) e 100 µM de acetoseringona foi adicionado. Após 10 min de descanso, o meio de co-cultura foi utilizado no item a seguir para a transformação dos explantes.

2.3 Regeneração de explantes de Micro-Tom transformados

As sementes de tomate cultivar Micro-Tom foram desinfestadas em etanol 70% por 1 min, seguido de hipoclorito de sódio a 2,7% e cinco lavagens em água MiliQ destilada e autoclavada. Posteriormente, as sementes foram secas em papel filtro esterilizado e colocadas para germinar em meio de cultura MS com metade da concentração de sais e vitaminas B5, acrescido de 15 g/L⁻¹ de sacarose e 6 g/L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e 30 sementes foram colocadas em frascos contendo 35 mL de meio. As culturas foram seladas com plástico filme e incubadas a 25°C por 4 dias no escuro, seguido de 3 dias sob fotoperíodo de 16 horas.

Os explantes foram obtidos por meio da divisão transversal de cotilédones com as pontas distal e proximal removidas. Os explantes permaneceram sob agitação por 15 minutos em meio de co-cultura líquido. Após isso, os explantes foram retirados e o excesso de líquido foi removido em papel filtro esterilizado. Os explantes foram transferidos com a face abaxial para baixo para placas contendo 30 mL de meio de co-cultura sólido, composto por sais MS e vitamina B5 na concentração total, acrescido de 30 g/L⁻¹ de sacarose, 200 mg/L⁻¹ de PVP, 200mg/L⁻¹ de MES, 400 mg/L⁻¹ de cisteína, 5 µM de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,1 µM de AIA, 100 µM de acetoseringona e 6 g/L⁻¹ de ágar com pH 5,7.

A indução de gemas foi realizada em placas contendo 30 mL de meio de seleção, composto por sais MS e vitamina na concentração total, acrescido de 30 g/L⁻¹ de sacarose, 200 mg/L⁻¹ de PVP, 200mg/L⁻¹ de MES, 400 mg/L⁻¹ de cisteína, 5 µM de BAP, 0,1 µM de AIA, 5 µM de zeatina, 200 mg/L⁻¹ de cefotaxima, 100 mg/L⁻¹ de timentin, 50 mg/L⁻¹ de canamicina e 6 g/L⁻¹ de Phytigel, com pH 5,8. Os explantes foram transferidos três vezes a cada dez dias para novas placas contendo meio de seleção. Após esse período, as brotações das gemas foram transferidas para frascos contendo 30 mL de sais MS e vitamina B5 na concentração total, acrescido de 30 g/L⁻¹ de sacarose, 200 mg/L⁻¹ de cefotaxima, 100 mg/L⁻¹ de timentin, 50 mg/L⁻¹ de canamicina e 6 g/L⁻¹ de Phytigel com pH 5,8 para alongamento da parte aérea e enraizamento.

2.4 Aclimação e obtenção das gerações de plantas transgênicas

As plantas T0 com bom desenvolvimento radicular foram retiradas cuidadosamente do meio de cultura, lavadas em água corrente e transferidas para vasos de 500 mL contendo substrato orgânico (Carolina Soil) e vermiculita na proporção de 1:1. Para evitar o estresse das plantas foi empregado câmara úmida com cobertura plástica por três dias, após isso, foi realizada a retirada gradual do plástico para submeter as plantas nas condições naturais de crescimento. A obtenção da geração T1 foi por meio da autofecundação das plantas, que produziram frutos aos 80 dias após a aclimação e extração das sementes, que foram lavadas para retirada da mucilagem e secas por cinco dias à temperatura ambiente.

Para a seleção das plantas transformadas, foi realizada a extração de DNA conforme Doyle & Doyle (1987) de folíolos das plantas, seguido da amplificação das regiões genômicas do gene *BoCHB4* por meio de PCR convencional e sequenciamento Sanger para confirmação da inserção do transgene no genoma da planta utilizando ao pares de primers específicos (F- ATGACCAGTTTGCTACTTTACTCA e R- TTAACAAGTGAGGTTTTCTCCAGG) resultando em 818 pares de base. As condições das reações de PCR foram: 95 °C por 3 min; 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 58 °C por 30s e 72 °C por 1 min; finalizando com extensão final a 72 °C por 5 min. Os eletroferogramas obtidos do sequenciamento foram analisados e editados com a ferramenta DNA Dragon (www.sequentix.de). Em seguida, foi realizado a comparação com sequência depositadas pela ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências obtidas foram alinhadas juntamente com a sequência do gene *BoCHB4* utilizando a ferramenta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). O modo de cultivo e seleção das plantas transformadas de três eventos (EV 1, EV 2 e EV 3) foi repetido para a obtenção das gerações T2.

2.5 Avaliação fenotípica das plantas transgênicas quanto a resistência a *X. euvesicatoria* pv. *perforans* e a *Sclerotinia sclerotiorum*

Plantas T2 de cada um dos eventos (EV 1, EV 2 e EV 3) e plantas não transformadas (*wild type*) foram cultivadas em casa de vegetação para a avaliação da resistência das plantas transgênicas a *Xep* e *S. sclerotiorum*. A cepa *Xep* raça T3 identificada molecularmente por Araújo *et al.* (2017) foi inoculada em plantas com 35 dias de idade por meio da aspersão do inóculo de *Xep* a uma concentração de 10^8 UFC/mL⁻¹ (densidade ótica a 600 nm [OD 600] = 0,3). Após isso, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 h para garantir a infecção.

O experimento foi repetido três vezes, nos meses de novembro/dezembro de 2023 e fevereiro/março de 2024. A inoculação de *S. sclerotiorum* (CMES 1795) obtido da Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agropecuária e previamente identificado foi realizada em plantas de 35 dias de idade durante o mês de janeiro de 2024. Um disco micelial com tamanho de 3 mm de diâmetro obtido a partir do crescimento fúngico em BDA por cinco dias foi fixado em cinco folhas. As plantas foram mantidas em câmara úmida por meio do emprego de cobertura plástica por 24 horas. As folhas de cada tratamento foram fotografadas 24 horas após a inoculação (hai), quando o crescimento micelial atingiu a borda foliar. Os dados das avaliações foram submetidos à análise não paramétrica e o teste Student Newman Keuls ($P \leq 0,05$) foi aplicado utilizando o software SigmaPlot 15.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de domesticação do tomateiro resultou em baixa diversidade genética, devido as seleções intensivas para adequação ao cultivo comercial (Blanca *et al.* 2015). Isso sujeitou a cultura do tomateiro a incidência de inúmeras doenças, tornando-se necessário o uso de vários agrotóxicos para o controle. Medidas que visam o controle simultâneo de diferentes doenças poderiam tornar o cultivo menos laborioso e oneroso. No entanto, o controle de diferentes fitopatógenos com uma única medida de controle não tem sido fácil de se alcançar (Singh *et al.* 2017), uma vez que os produtos fitossanitários podem ter modos de ação específicos sobre determinado fitopatógeno (Corkley *et al.* 2022). Além disso, fontes de resistência baseada nos genes R para controle de múltiplos patógenos são raras, devido a variabilidade genética dos fitopatógenos, que apresentam diferentes maneiras para atacar o hospedeiro utilizando efetores (Wiesner-Hanks & Nelson 2016). Dessa maneira, a busca por outras fontes genéticas para resistência múltipla pode ser uma opção viável, além de apresentar vantagens econômicas e sustentáveis. Nesse sentido, este estudo objetivou a superexpressão em tomateiro de um gene de *Brassica oleracea* que codifica uma endoquitinase visando a obtenção de resistência a múltiplos patógenos. O gene *BoCHB4* foi identificado com abundância aumentada em um estudo do proteoma de plantas de repolho resistentes a *Xanthomonas* e foi posteriormente validado em *Arabidopsis thaliana*, resultando em maior tolerância contra o patógeno (Santos *et al.* 2019).

Neste estudo, os experimentos de superexpressão utilizando transformação estável mediada por *A. tumefaciens* permitiram a regeneração de plantas de tomateiro cv. Micro-Tom com desenvolvimento da parte aérea, radicular, flores, frutos e sementes semelhantes a plantas não transformadas (**Figura 1 a-h**). Um total de 18 plantas regeneradas foram obtidas, e 4 destes eventos demonstraram a presença do transgene *BoCHB4* (**Figura 1 i**). A comparação das sequências dos quatro eventos transgênicos por meio do alinhamento revelou similaridade de 100 % com a sequência do gene *BoCHB4* de *Brassica oleracea*, demonstrando a integração do transgene no genoma das plantas de tomateiro (**Figura Suplementar 1**).

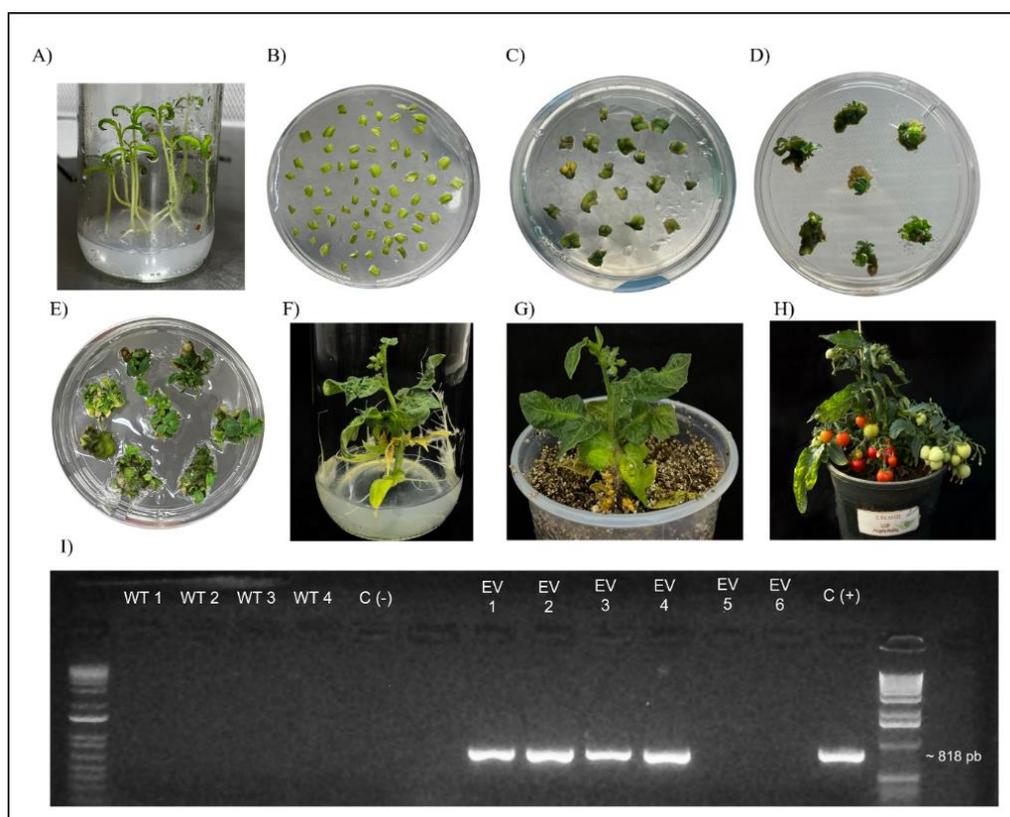


Figura 2. Etapas da regeneração de plantas de tomateiro transformadas. A) Plântulas em meio de germinação; B) Explantes em co-cultura sólida. C, D e E) Explantes em meio de seleção ao 15, 30 e 40 dias após a co-cultura, respectivamente; F) Planta em meio de enraizamento; G) Planta em processo de aclimação; H) Planta aclimatada com produção de frutos I) Produtos de amplificação em eletroforese em gel de agarose 1,5 %.

Os sintomas nas plantas inoculadas com *Xep* não puderam ser avaliados, devido a não ocorrência dos sintomas da doença nas plantas durante a realização dos experimentos. Por outro lado, o experimento de resistência das plantas transgênicas contra *S. sclerotiorum* demonstrou uma maior capacidade das plantas de suportar o crescimento inicial do fungo (**Figura 2 a**). Em

24 hai as plantas *wild type* apresentaram maiores índices de severidade em relação aos EV 1 e EV 2, enquanto o EV 3 não demonstrou diferença estatística ($P \leq 0,05$) (Figura 2 b).

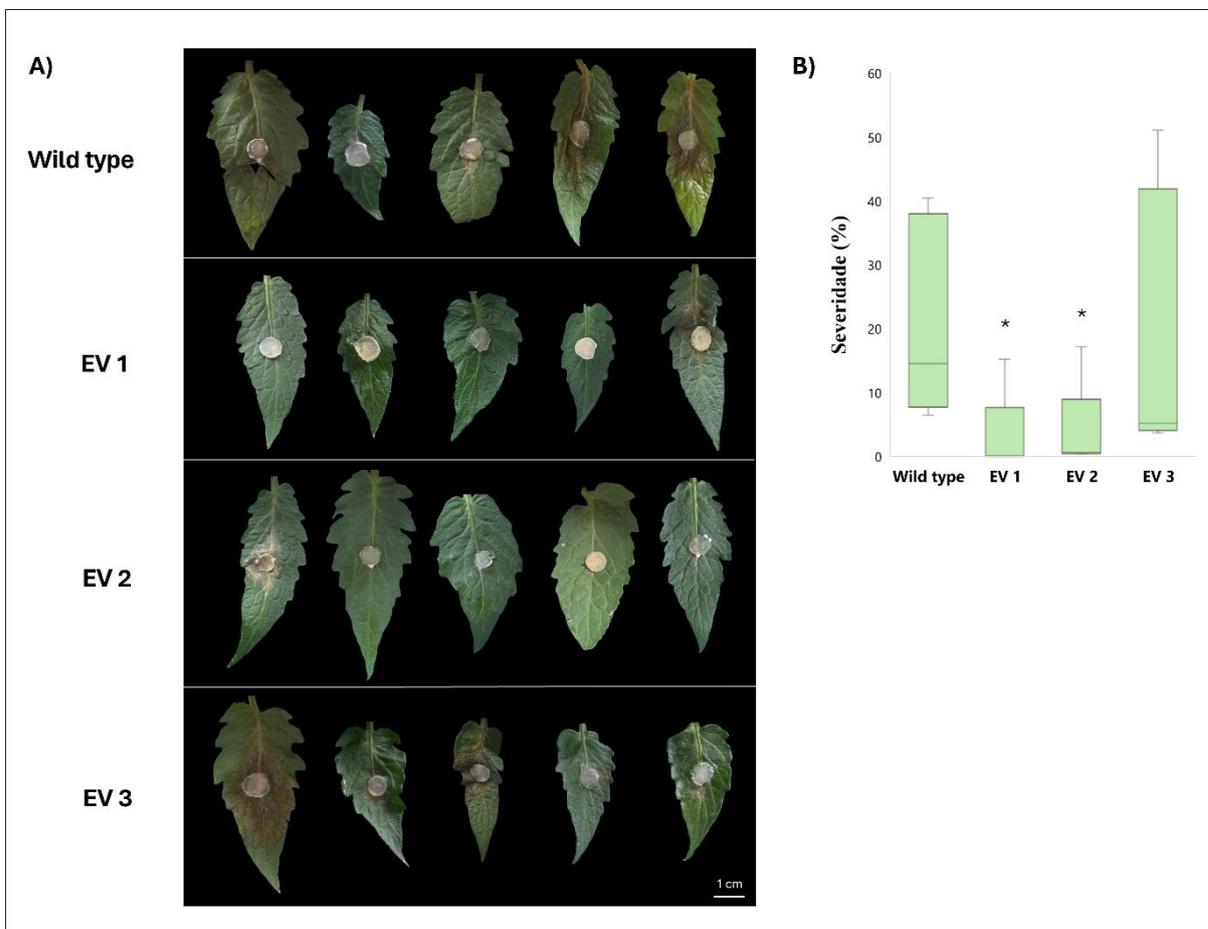


Figura 3. Avaliação da resistência das plantas transgênicas a *S. sclerotiorum*. A) Sintomas induzidos por *S. sclerotiorum* em 24 hai; B) Percentual de severidade da doença em 24 hai.

Vários estudos indicam a importância do acúmulo de quitinases vegetais para o sistema de defesa contra patógenos (Collinge *et al.* 1993). Os resultados deste estudo contribuem para essas evidências, demonstrando a menor severidade das plantas transgênicas desafiadas com *S. sclerotiorum*. O retardo do crescimento do patógeno pode estar relacionado com a atividade da endoquitinase no remodelamento da parede celular fúngica, devido a capacidade de hidrolisar ligações glicosídicas na cadeia da quitina. O maior acúmulo de endoquitinases pode levar a ativação das vias do ácido salicílico, que por sua vez, levam a resistência sistêmica adquirida (SAR). Além disso, Dong *et al.* (2017) demonstram que a superexpressão de genes codificadores para uma Proteína PR pode desencadear ou interagir com outras proteínas relacionadas a defesa, como por exemplo a catalase e peroxidase, que atuam na defesa da planta contra patógenos. A expressão gênica de vários genes que codificam para as Proteínas PR será

posteriormente analisada nas plantas transgênicas deste estudo, para demonstrar um possível sinergismo entre estas proteínas.

Plantas transgênicas são comercializadas desde 1994, principalmente para conferir tolerância a herbicidas e resistência a insetos. No entanto, há muitas críticas em relação a transgenia, devido aos efeitos causados pelo transgene, que pode ser acompanhada de inserções, deleções e/ou rearranjos adicionais, podendo dar origem a características indesejáveis às plantas. Esses efeitos podem alterar os padrões de expressão de outros genes, especialmente aqueles relacionados a defesa (Schnell *et al.* 2015). Essa pode ser uma explicação para a alta severidade do mofo branco no evento EV 3, que não diferiu estatisticamente das plantas *wild type*. Além disso, a expressão do transgene nas plantas avaliadas no EV3 pode não ter sido suficiente para retardar a doença. Dessa forma, a comparação molecular entre as linhagens transgênicas e não transformada, bem como o fenótipo deve ser analisado para evitar tais efeitos. Outros experimentos com mais réplicas biológicas serão necessários para confirmar se essa estratégia de fato leva à redução da severidade de *S. sclerotiorum* nas plantas transgênicas. Além disso, as plantas transgênicas poderão ser desafiadas contra outros patógenos, como por exemplo outras espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana e de *Ralstonia solanacearum*. Caso ocorra o controle de *R. solanacearum*, as plantas transgênicas superexpressando o gene *BoCHB4* poderão ser utilizadas como porta-enxerto, minimizando assim as resistências relacionadas ao cultivo de transgenes.

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados deste trabalho deram o primeiro passo para um projeto visando a piramidação de genes de defesa para aumentar a resistência do tomateiro a múltiplos patógenos. A superexpressão do gene *BoCHB4* foi obtida e os resultados de controle da *S. sclerotiorum* são bastante promissores. Foram alcançados menores índices de severidade da doença causada por *S. sclerotiorum* em dois eventos transgênicos. Os estudos serão continuados para a busca de maiores evidências no controle de outros patógenos de tomateiro, bem como na demonstração molecular da ativação de vias de defesa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali S, Ganai BA, Kamili AN, Bhat AA, Mir ZA, Bhat JA, Tyagi A, Islam ST, Mushtaq M, Yadav P, Rawat S, Grover A (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol Res* 212–213:29–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>

Araújo ER, Costa JR, Ferreira MAS V, Quezado-Duval AM (2017) Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. *Plant Pathol* 66:159–168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppa.12543>

Bendahmane A, Farnham G, Moffett P, Baulcombe DC (2002) Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site–leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. *Plant J* 32:195–204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01413.x>

Blanca J, Montero-Pau J, Sauvage C, Bauchet G, Illa E, Díez MJ, Francis D, Causse M, Van der Knaap E, Cañizares J (2015) Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics* 16:1–19

Brasileiro ACM, Carneiro VT de C (2015) Manual de transformação genética de plantas, 2nd edn. Brasília.

Collinge D., Kragh K., Mikkelsen J., Nielsen K., Rasmussen U, Vad K (1993) Plant chitinases. *Plant J* 3:31–40

Corkley I, Fraaije B, Hawkins N (2022) Fungicide resistance management: Maximizing the effective life of plant protection products. *Plant Pathol* 71:150–169. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ppa.13467>

Dieryckx C, Gaudin V, Dupuy J-W, Bonneu M, Girard V, Job D (2015) Beyond plant defense: insights on the potential of salicylic and methylsalicylic acid to contain growth of the phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Front Plant Sci* 6.

Dong X, Zhao Y, Ran X, Guo L, Zhao D-G (2017) Overexpression of a New Chitinase Gene *EuCHIT2* Enhances Resistance to *Erysiphe cichoracearum* DC in Tobacco Plants. *Int J Mol Sci* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18112361>

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf

tissue. *Phytochem Bull* v.19(1):11.

Goellner K, Conrath U (2008) Priming: It's all the world to induced disease resistance. *Eur J Plant Pathol* 121:233–242. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9251-4>

Guan Y, Chye ML (2008) A *Brassica juncea* chitinase with two-chitin binding domains show anti-microbial properties against phytopathogens and Gram-negative bacteria. *Plant Signal Behav* 3:1103–1105. <https://doi.org/10.4161/psb.3.12.7006>

Gupta R, Lee SE, Agrawal GK, Rakwal R, Park S, Wang Y, Kim ST (2015) Understanding the plant-pathogen interactions in the context of proteomics-generated apoplastic proteins inventory. *Front Plant Sci* 6.

Kim T-H, Hauser F, Ha T, Xue S, Böhmer M, Nishimura N, Munemasa S, Hubbard K, Peine N, Lee B, Lee S, Robert N, Parker JE, Schroeder JI (2011) Chemical Genetics Reveals Negative Regulation of Abscisic Acid Signaling by a Plant Immune Response Pathway. *Curr Biol* 21:990–997. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.045>

Patil RS, Ghormade V, Deshpande M V (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol* 26:473–483. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00134-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00134-4)

Santos C, Nogueira FCS, Domont GB, Fontes W, Prado GS, Habibi P, Santos VO, Oliveira-Neto OB, Grossi-de-Sá MF, Jorrín-Novo J V., Franco OL, Mehta A (2019) Proteomic analysis and functional validation of a *Brassica oleracea* endochitinase involved in resistance to *Xanthomonas campestris*. *Front Plant Sci* 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00414>

Schnell J, Steele M, Bean J, Neuspiel M, Girard C, Dormann N, Pearson C, Savoie A, Bourbonnière L, Macdonald P (2015) A comparative analysis of insertional effects in genetically engineered plants: considerations for pre-market assessments. *Transgenic Res* 24:1–17. <https://doi.org/10.1007/s11248-014-9843-7>

Singh VK, Singh AK, Kumar A (2017) Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. *3 Biotech* 7:255. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0896-1>

Thomma BP, Eggermont K, Penninckx IA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BP, Broekaert WF (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15107–15111. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.15107>

Wiesner-Hanks T, Nelson R (2016) Multiple Disease Resistance in Plants. *Annu Rev Phytopathol* 54:229–252. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100037>

6. ANEXOS

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Event04 ..... 8
BoCHB4-like CTTTGTCTCTCTATAAACGCGAACCTAATGTAACCTCTATCTACTCCACACACACAC 68
Event01 ..... 8
Event02 ..... 8
Event03 ..... 8

Event04 ..... 8
BoCHB4-like AGAAAAACACGGTGAAGTGGCTAAGACACATCCGAAATGACGAGTTTGTACTT 120
Event01 ..... 8
Event02 ..... 8
Event03 ..... 8

Event04 .....-CGGTGGCTCTCAGA 19
BoCHB4-like TACTCAACTCTTTCTCTGCTGATCTAACGGTTTCCAAACGGCTCTCAGA 180
Event01 .....-CTCTCAGA 11
Event02 .....-CGGTGGCTCTCAGA 19
Event03 .....-CGGTGGCTCTCAGA 19
*****

Event04 GGGCTGGCTCTGGCTTATGCTGACAGTGGTGTACTGTGGAAACACCGAGCGGT 79
BoCHB4-like GGGCTGGCTCTGGCTTATGCTGACAGTGGTGTACTGTGGAAACACCGAGCGGT 248
Event01 GGGCTGGCTCTGGCTTATGCTGACAGTGGTGTACTGTGGAAACACCGAGCGGT 71
Event02 GGGCTGGCTCTGGCTTATGCTGACAGTGGTGTACTGTGGAAACACCGAGCGGT 79
Event03 GGGCTGGCTCTGGCTTATGCTGACAGTGGTGTACTGTGGAAACACCGAGCGGT 79
*****

Event04 ACTGGGGGAGGATGCAAGAAGGACCTTGCAGAACAGCGGTCCCGAGATCCA 139
BoCHB4-like ACTGGGGGAGGATGCAAGAAGGACCTTGCAGAACAGCGGTCCCGAGATCCA 380
Event01 ACTGGGGGAGGATGCAAGAAGGACCTTGCAGAACAGCGGTCCCGAGATCCA 131
Event02 ACTGGGGGAGGATGCAAGAAGGACCTTGCAGAACAGCGGTCCCGAGATCCA 139
Event03 ACTGGGGGAGGATGCAAGAAGGACCTTGCAGAACAGCGGTCCCGAGATCCA 139
*****

Event04 TTTCACTTGAAGAACTGTGACACCTGAGTTCTTAACTCTATACTAAGCAAGCA 199
BoCHB4-like TTTCACTTGAAGAACTGTGACACCTGAGTTCTTAACTCTATACTAAGCAAGCA 360
Event01 TTTCACTTGAAGAACTGTGACACCTGAGTTCTTAACTCTATACTAAGCAAGCA 191
Event02 TTTCACTTGAAGAACTGTGACACCTGAGTTCTTAACTCTATACTAAGCAAGCA 199
Event03 TTTCACTTGAAGAACTGTGACACCTGAGTTCTTAACTCTATACTAAGCAAGCA 199
*****

Event04 AGAGTAACCTCCCGGCAAGGATTTCTACTGGGAAACCTTATGGTGGAGTGG 259
BoCHB4-like AGAGTAACCTCCCGGCAAGGATTTCTACTGGGAAACCTTATGGTGGAGTGG 420
Event01 AGAGTAACCTCCCGGCAAGGATTTCTACTGGGAAACCTTATGGTGGAGTGG 251
Event02 AGAGTAACCTCCCGGCAAGGATTTCTACTGGGAAACCTTATGGTGGAGTGG 259
Event03 AGAGTAACCTCCCGGCAAGGATTTCTACTGGGAAACCTTATGGTGGAGTGG 259
*****

Event04 CCTATCGAGCTTGGTGGCTTCCATCTCCAAAGTGAATGCTGCTTCTTGTCA 319
BoCHB4-like CCTATCGAGCTTGGTGGCTTCCATCTCCAAAGTGAATGCTGCTTCTTGTCA 460
Event01 CCTATCGAGCTTGGTGGCTTCCATCTCCAAAGTGAATGCTGCTTCTTGTCA 311
Event02 CCTATCGAGCTTGGTGGCTTCCATCTCCAAAGTGAATGCTGCTTCTTGTCA 319
Event03 CCTATCGAGCTTGGTGGCTTCCATCTCCAAAGTGAATGCTGCTTCTTGTCA 319
*****

Event04 TGCTCAGGAAGCGGGTTCATGTGCCACATTTGAGGAAGTGTATGAGCAGCA 379
BoCHB4-like TGCTCAGGAAGCGGGTTCATGTGCCACATTTGAGGAAGTGTATGAGCAGCA 540
Event01 TGCTCAGGAAGCGGGTTCATGTGCCACATTTGAGGAAGTGTATGAGCAGCA 371
Event02 TGCTCAGGAAGCGGGTTCATGTGCCACATTTGAGGAAGTGTATGAGCAGCA 379
Event03 TGCTCAGGAAGCGGGTTCATGTGCCACATTTGAGGAAGTGTATGAGCAGCA 379
*****

Event04 CADTGGAGAACTGTGACACCAACCAACAGAGTCCCATGTGTACAGGAAAGG 439
BoCHB4-like CADTGGAGAACTGTGACACCAACCAACAGAGTCCCATGTGTACAGGAAAGG 600
Event01 CADTGGAGAACTGTGACACCAACCAACAGAGTCCCATGTGTACAGGAAAGG 431
Event02 CADTGGAGAACTGTGACACCAACCAACAGAGTCCCATGTGTACAGGAAAGG 439
Event03 CADTGGAGAACTGTGACACCAACCAACAGAGTCCCATGTGTACAGGAAAGG 439
*****

Event04 ACTATGGTGGTGGTGGATCAGCTCTCTGGAACTAACACTATGCTTGTGGAG 499
BoCHB4-like ACTATGGTGGTGGTGGATCAGCTCTCTGGAACTAACACTATGCTTGTGGAG 640
Event01 ACTATGGTGGTGGTGGATCAGCTCTCTGGAACTAACACTATGCTTGTGGAG 491
Event02 ACTATGGTGGTGGTGGATCAGCTCTCTGGAACTAACACTATGCTTGTGGAG 499
Event03 ACTATGGTGGTGGTGGATCAGCTCTCTGGAACTAACACTATGCTTGTGGAG 499
*****

Event04 ACCTGAACGAGGAGACTTATGGTCTACACAGAGAGTGGCTCAAAACAGGTT 559
BoCHB4-like ACCTGAACGAGGAGACTTATGGTCTACACAGAGAGTGGCTCAAAACAGGTT 720
Event01 ACCTGAACGAGGAGACTTATGGTCTACACAGAGAGTGGCTCAAAACAGGTT 551
Event02 ACCTGAACGAGGAGACTTATGGTCTACACAGAGAGTGGCTCAAAACAGGTT 559
Event03 ACCTGAACGAGGAGACTTATGGTCTACACAGAGAGTGGCTCAAAACAGGTT 559
*****

Event04 CCTCAAGGCTCTTCTGTGACTGGACACGAAATGCTGGAGCTTAAATCGGG 619
BoCHB4-like CCTCAAGGCTCTTCTGTGACTGGACACGAAATGCTGGAGCTTAAATCGGG 780
Event01 CCTCAAGGCTCTTCTGTGACTGGACACGAAATGCTGGAGCTTAAATCGGG 611
Event02 CCTCAAGGCTCTTCTGTGACTGGACACGAAATGCTGGAGCTTAAATCGGG 619
Event03 CCTCAAGGCTCTTCTGTGACTGGACACGAAATGCTGGAGCTTAAATCGGG 619
*****

Event04 TTGGGGACCATCAGGGCTGTGAATAGTGGGAGTGTAGCGGAGGATTTACAG 679
BoCHB4-like TTGGGGACCATCAGGGCTGTGAATAGTGGGAGTGTAGCGGAGGATTTACAG 840
Event01 TTGGGGACCATCAGGGCTGTGAATAGTGGGAGTGTAGCGGAGGATTTACAG 671
Event02 TTGGGGACCATCAGGGCTGTGAATAGTGGGAGTGTAGCGGAGGATTTACAG 679
Event03 TTGGGGACCATCAGGGCTGTGAATAGTGGGAGTGTAGCGGAGGATTTACAG 679
*****

Event04 AAGTGCACACAGGGTTAGTACTTCCAGACTATTGTGGCAAGCTTGGAGTCA 739
BoCHB4-like AAGTGCACACAGGGTTAGTACTTCCAGACTATTGTGGCAAGCTTGGAGTCA 900
Event01 AAGTGCACACAGGGTTAGTACTTCCAGACTATTGTGGCAAGCTTGGAGTCA 731
Event02 AAGTGCACACAGGGTTAGTACTTCCAGACTATTGTGGCAAGCTTGGAGTCA 739
Event03 AAGTGCACACAGGGTTAGTACTTCCAGACTATTGTGGCAAGCTTGGAGTCA 739
*****

Event04 GAGAACT ..... 747
BoCHB4-like GAGAAACCTCACTGTTAAGTTTCTCTATGATCTGAACAGCAATGTTGGCA 960
Event01 ..... 731
Event02 G ..... 740
Event03 GAGAA ..... 745

Event04 ..... 747
BoCHB4-like ATACCAATAAGACACCACAGAGAAAGTATCTACTAGTATAGTAAATGTT 1020
Event01 ..... 731
Event02 ..... 740
Event03 ..... 745

Event04 ..... 747
BoCHB4-like AATGATATCATGAGGATTTCCATTTATGCTAGTCAATTTGATTTTATG 1873
Event01 ..... 731
Event02 ..... 740
Event03 ..... 745

```

Figura Suplementar 1. Alinhamento das sequências dos eventos de transformação com a sequência do gene *BoCHB4*.

1. CONCLUSÕES GERAIS

- Vários potenciais genes S são induzidos em tomateiro durante a interação com *Xep*;
- Os potenciais genes S identificados são candidatos interessantes para estudos futuros visando confirmar o seu papel na suscetibilidade do tomateiro a *Xep*;
- O silenciamento do gene *SITFIIA γ* levou à redução dos sintomas causados por *Xep* em tomateiro;
- As linhagens apresentando edição no gene *SITFIIA γ* não apresentaram efeitos pleiotrópicos negativos;
- A superexpressão do gene *BoCHB4* em tomateiro conferiu resistência a *S. sclerotiorum*.