

FERNANDA ABREU SANTANA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE SOJA EM RESPOSTA
À INOCULAÇÃO COM NEMATOIDES DE GALHA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S232a
2012
Santana, Fernanda Abreu, 1982-
Análise proteômica de raízes de soja em resposta à
inoculação com nematoides de galha / Fernanda Abreu
Santana. – Viçosa, MG, 2012.
x, 100f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maurilio Alves Moreira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Soja - Melhoramento genético. 2. Soja - Resistência a
doenças e pragas. 3. Proteínas - Identificação.
4. Nematode-das-galhas. 5. Soja. 6. *Glycine max*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento. II. Título.

CDD 22. ed. 633.342

FERNANDA ABREU SANTANA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE SOJA EM RESPOSTA
À INOCULAÇÃO COM NEMATÓIDES DE GALHA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 17 de agosto de 2012.


Everaldo Gonçalves de Barros
(Coorientador)


Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Coorientador)


Luciano Gomes Fietto


Márcia Rodrigues Carvalho Oliveira


Maurilio Alves Moreira
(Orientador)

Ao meu querido marido Alan pelo companheirismo,

À Deus pela proteção e bênçãos,

DEDICO

*“A vitória nos chega por meio
de lutas que travamos dentro de
nós mesmos.”*

Pastorini

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Genética e Melhoramento pela oportunidade da realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

À Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC) pelo apoio inicial na realização deste trabalho, em especial ao pesquisador Dr. Ivan Schuster.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NUBIOMOL) por ter possibilitado a realização deste trabalho e às agências financiadoras (FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos, CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e FAPEMIG - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas) pelo financiamento dos aparelhos e da infraestrutura.

Ao Professor Maurilio Alves Moreira, pela orientação, seriedade, amizade e pelo exemplo de dedicação ao progresso científico da UFV e do país.

Ao Professor Everaldo Gonçalves de Barros pelos ensinamentos, paciência, conselhos, amizade, colaboração e pelo exemplo de comprometimento profissional.

Ao Professor Humberto pelas sugestões, amizade, incentivo, disposição em ajudar e pelo exemplo de competência e simplicidade.

A todos os Professores que ministraram as disciplinas do Programa de Genética e Melhoramento desta instituição, pelos ensinamentos.

Ao professor Luciano Fietto por aceitar o convite em participar da banca de defesa de tese, e também à querida amiga e Professora Márcia Carvalho pelo aceite em ser membro da banca de defesa e pela amizade, conselhos e incentivo.

Ao Laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), pelo uso de sua infraestrutura. Em especial ao Dr. Jonas Perales, Dr. Henk, Dr. Richard, Dr. André, Monique e Vivi pela ajuda e colaboração.

Aos funcionários e amigos do Bioagro: Gláucia, Cássio, Marlene, Fábria, Alessandra, Raquel e Paulo pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao técnico de nível superior Edvaldo e à Nívea do NUBIOMOL (Núcleo de Análise de Biomoléculas) pelo apoio e colaboração.

À Rita e à Edna pela disposição em ajudar na secretária do Programa de Genética e Melhoramento.

Aos amigos do laboratório: Arlindo, Bianca, Bruno, Isabela, Isadora, Josie, Josiane, Klever, Léo, Luiz Cláudio, Maria Fernanda, Marcos, Mateus, Naldo, Rafael, Samila e Pedro pela amizade e agradável convivência. Em especial Lorêta, Newton, Alexandre e Renato, pelos bons momentos e pela amizade.

Aos amigos “Proteômicos” Leandro, Carla e Rose, agradeço o apoio, ensinamentos, amizade, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Aos amigos da Casa 21 Jefferson, Ana Clara, Adriano, Érika, Márcia, Ronnie, Patrícia e Meire pela cooperação, amizade, trocas de informações e pela boa convivência.

Aos amigos de Viçosa que vão deixar saudades: Dani, Alexandra, Talles, Tássio, Luiz, Janaína, Andreia, Renata, Sr. Ed e Clotilde. Obrigada pelos bons momentos vividos. Vocês foram o meu melhor “lazer”.

À querida amiga e vizinha Telma. Obrigada pelos inúmeros favores prestados e pela amizade sincera.

Aos “anjinhos” do CEFA de Teixeiras, em especial, Eunice, Mariinha, Sr. Lilito e Cinira. Obrigada pelo amparo espiritual e por todo o carinho.

À querida amiga Marcia Flores pela amizade, preocupação e carinho.

À minha madrinha Maria Valverde e às minhas “tias” Irene e Lucy, obrigada por terem me educado ainda na infância e incentivarem meus estudos.

Ao meu pai Geraldo, agradeço todo o carinho, apoio e compreensão. A minha irmã Flávia, agradeço o carinho e incentivo.

A meu marido Alan pelo amor, companheirismo, carinho, apoio e pela disposição em ajudar em todos os momentos.

A minha querida July. Obrigada pela doce companhia e por ter me ensinado a ser mais feliz. Nina querida, obrigada por ter tornado nossa família ainda mais feliz.

À sociedade brasileira, pela manutenção da universidade pública, gratuita e de excelência pela qualidade.

A Deus, que sempre me capacita realizar tudo aquilo que acredito ser impossível e nunca me deixa desistir.

Enfim, a todos aqueles que estiveram do meu lado não só nas horas de sucesso e de alegria, mas que se esforçaram em me ajudar quando os problemas se fizeram presentes e os desafios se tornaram grandes demais para uma única pessoa. A todos devo minha gratidão e grande parte da felicidade que conquistei ao ter finalizado este trabalho.

BIOGRAFIA

Fernanda Abreu Santana, filha de Geraldo Magela Santana e Rosângela Abreu Grassano Santana, nasceu na cidade de Raul Soares, Minas Gerais, em 07 de outubro de 1982.

Em abril de 2001, iniciou o curso de graduação em Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, tendo transferido para o curso de Bioquímica no segundo semestre de 2003 e graduando-se em maio de 2006.

Em maio de 2006, iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de dissertação para obtenção do título de *Magister Scientiae*, no dia 26 de fevereiro de 2008.

Em março de 2008, iniciou o curso de doutorado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese no dia 17 de agosto de 2012.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Importância econômica da soja	2
2.2. Fitonematoides na cultura da soja	2
2.3. Mecanismos de defesa de plantas a patógenos.....	4
2.3.1. Interação planta x nematoide.....	6
2.4. Proteômica.....	9
2.4.1. Eletroforese bidimensional.....	10
2.4.2. Espectrometria de massa	11
2.5. Proteômica de plantas.....	13
3. OBJETIVOS	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

CAPÍTULO 1

ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE SOJA EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Meloidogyne javanica*

INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
Material vegetal e inoculação.....	28
Extração de proteínas	28
Quantificação das proteínas.....	29
Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)	29
Focalização isoeletrica (IEF).....	29
Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	30
Captura das imagens e análise da expressão	31
Tripsinização da amostra proteica	31
Espectrometria de massa	33
Identificação de proteínas por espectrometria de massa	33

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
Proteínas diferencialmente expressas em resposta à inoculação com <i>Meloidogyne javanica</i>	45
Ascorbato peroxidase 2	45
Cafeoil-CoA metiltransferase.....	46
Triose fosfato isomerase.....	48
Precursor da glicoproteína de 31 KDa do caule	48
UTP-Glicose-1-Fosfato uridiltransferase	49
Proteína induzida por estresse - SAM22	49
Anexina	50
Flavoproteínas wrbA	51
Lipoxigenase	51
Proteínas relacionadas com a maturação.....	51
Glutamina sintetase beta1	52
Actina	53
CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

CAPÍTULO 2

ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE SOJA EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Meloidogyne incognita*

INTRODUÇÃO.....	62
MATERIAL E MÉTODOS	63
Material vegetal e inoculação.....	63
Extração de proteínas	63
Quantificação das proteínas.....	64
Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)	64
Focalização isoeletrica (IEF).....	64
Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	65
Captura das imagens e análise da expressão	66
Tripsinização da amostra proteica.....	66
Espectrometria de massa	68
Identificação de proteínas por espectrometria de massa	68

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
Proteínas diferencialmente expressas em resposta à inoculação com <i>Meloidogyne incognita</i>	85
S-adenosilmetionina sintase	85
Metionina sintase.....	86
Ascorbato peroxidase 2	86
Glutathiona Transferase 8	87
Isoflavona redutase.....	88
Fosfoglicerato quinase.....	88
Fosfoglicomutase	89
ATP sintase subunidade Alpha	89
6-Fosfogluconato desidrogenase	89
Transcetolase	90
Enolase	90
Aldo ceto redutase.....	90
Aconitato hidratase.....	91
Cafeoil-CoA metiltransferase.....	91
Glutamato desidrogenase 1	91
Precursor da glicoproteína do caule - 31 KDa	92
Proteína relacionada com a maturação	92
Outras Proteínas	93
CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

RESUMO

SANTANA, Fernanda Abreu, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2012. **Análise proteômica de raízes de soja em resposta à inoculação com nematoides de galha.** Orientador: Maurilio Alves Moreira. Coorientadores: Everaldo Gonçalves de Barros e Humberto Josué de Oliveira Ramos.

A expansão da cultura da soja no Brasil vem sendo acompanhada pelo aumento da incidência de doenças e pragas, sendo esses os principais fatores que limitam a obtenção de maiores rendimentos da cultura. Dentre os patógenos que acometem a cultura da soja, destacam-se os nematoides formadores de galhas por estarem presentes em todo o país e causarem sérios prejuízos à cultura. Estudos visando o entendimento da resposta da interação planta x nematoide têm sido realizados, porém, ainda há poucas informações a esse respeito. A análise de proteínas por eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa é uma técnica que tem sido bastante aprimorada e pode ajudar a elucidar aspectos moleculares da interação planta-patógeno. Neste sentido, objetivou-se com este trabalho identificar proteínas diferencialmente expressas em raízes de soja em resposta à inoculação com nematoides de galha (*Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*). Foram avaliadas amostras de raízes de soja, da cultivar resistente Conquista, coletadas 12, 24 e 48 horas após a inoculação tendo como controle raízes de plantas não inoculadas. As proteínas foram extraídas pelo método fenol-SDS e separadas por eletroforese bidimensional. Por meio da análise comparativa dos géis foram detectadas proteínas diferencialmente expressas, que foram posteriormente identificadas por espectrometria de massa (MS/MS). Foram identificadas várias proteínas/enzimas que estão associadas a processos de sinalização celular (anexina), metabolismo de espécies reativas de oxigênio (ascorbato peroxidase 2, glutathione transferase), proteínas envolvidas com a produção de hormônios vegetais como etileno e ácido jasmônico (proteína relacionada à maturação, precursor da glicoproteína de 31kDa do caule), biossíntese de lignina (caffeoyl-CoA metiltransferase), metabolismo de aminoácidos (glutamina sintetase, glutamato desidrogenase, metionina sintase) processo de oxido-redução (flavoproteína WrbA, isoflavona redutase) e metabolismo energético (triose fosfato isomerase, enolase, UGPase, aconitato hidratase, transcetolase, 6 fosfogluconato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, fosfoglicomutase, ATP sintase subunidade alfa). Esses resultados certamente contribuirão para o esclarecimento dos mecanismos de defesa da soja ao nematoide de galha e na identificação de genes candidatos, direcionando o desenvolvimento de plantas resistentes por meio da obtenção de genótipos transgênicos.

ABSTRACT

SANTANA, Fernanda Abreu, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2012. **Proteomic analysis of soybean roots in response to inoculation with root knot nematodes.** Adviser: Maurilio Alves Moreira. Co-advisers: Everaldo Gonçalves de Barros and Humberto Josué de Oliveira Ramos.

The expansion of soybean cultivation in Brazil has been accompanied by increases in occurrence of diseases and pests of this species, with these factors now limiting the obtainment of higher crop yields. Amongst the pathogens that attack soybean root knot nematodes are notable for occurring throughout the country and causing serious crop damage. Studies aiming to improve our understanding of plant-nematode interactions have been carried out but there remains a lack of information in this area. The analysis of proteins by 2D-electrophoresis associated with mass spectrometry is a well established and refined technique that can be used to investigate the molecular aspects of plant-pathogen interactions. The objective of this work was therefore to identify proteins in soybean roots that are differentially expressed in response to inoculation with root knot nematodes (*Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita*). Samples of roots from the resistant “Conquista” variety were evaluated which had been collected 12, 24 and 48 hours after inoculation and roots from non-inoculated plants were used as a control. Proteins were extracted using the phenol-SDS method and separated by 2D electrophoresis. Differentially expressed proteins were then detected by comparative analysis of the gels and identified using mass spectrometry (MS/MS). Various proteins/enzymes associated with cell signalling (annexin), metabolism of reactive oxygen species (ascorbate peroxidase, glutathione transferase), production of the plant hormones ethylene and jasmonic acid (protein related to maturation, the precursor of the 31kDa glycoprotein stem), lignin biosynthesis (Caffeoyl-CoA methyltransferase), amino acid metabolism (glutamine synthase, glutamate dehydrogenase, methionine synthase), redox processes (flavoprotein WrbA, isoflavone reductase) and energy metabolism (triose phosphate isomerase, enolase, UGPase, aconitate hydratase, transketolase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, phosphoglucomutase, ATP synthase alpha subunit). These results will help to clarify the mechanisms of soybean defence against root knot nematodes and identify candidate genes that may be used in the development of transgenic plants with resistance to nematodes.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 40 anos, a soja foi a cultura que mais cresceu entre as grandes culturas produtoras de grãos, em nível mundial e nacional. No Brasil, desde a década de 1970 a área cultivada, produção e produtividade da soja vêm crescendo (Conab, 2012), o que se deve aos esforços dos diversos programas de melhoramento com o desenvolvimento de variedades adaptadas às diferentes regiões do País e também ao desenvolvimento de cultivares resistentes às principais doenças que acometem a cultura da soja (Embrapa, 2010).

As doenças que afetam a soja são responsáveis por prejuízos significativos nas safras, pois limitam o rendimento, a lucratividade e o sucesso da produção (Juliatti et al., 2003). No Brasil, já foram identificadas cerca de 50 doenças relacionadas à cultura da soja, entre fungos, bactérias, vírus e nematoides. Os nematoides causam sérios problemas de redução de rendimento da soja nas principais regiões do mundo onde esta cultura é cultivada (Inomoto et al., 2010).

Dentre as espécies de nematoides com capacidade de parasitar a soja, os nematoides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) são os de maior importância econômica (Silva, 2001), sendo as espécies *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* as mais importantes devido ao fato de apresentarem uma ampla distribuição geográfica e serem polífagas (Asmus, 2001).

O método mais eficaz e econômico do controle de nematoides é por meio da resistência genética. Estudos visando o entendimento da interação patógeno x hospedeiro, em nível molecular, têm sido realizados (Davis et al., 2004; Williamson; Kumar, 2006; Baum et al., 2007), porém, ainda há poucas informações sobre esta interação (Abad; Williamson, 2010), que são necessárias para o entendimento dos mecanismos de desenvolvimento da doença.

A análise proteômica tem sido utilizada para a identificação de proteínas diferencialmente expressas permitindo a identificação de genes envolvidos em processos biológicos importantes em diferentes vias metabólicas. Em relação ao estresse biótico, a análise proteômica possibilita a identificação de proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa de plantas, sendo um importante foco na busca de alternativas para o desenvolvimento de plantas resistentes.

Nesse sentido, objetivou-se com este trabalho identificar proteínas diferencialmente expressas pela soja em resposta à inoculação com *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* utilizando a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância econômica da soja

Os relatos de introdução da soja no Brasil são de 1882, na Bahia. Em 1891, novos genótipos foram avaliados no Estado de São Paulo, e em 1900 no Rio Grande do Sul, onde tiveram mais sucesso. No entanto, apenas na década de 1970 essa cultura adquiriu importância econômica para o País (Embrapa, 2010).

A partir da década de 1980 a região central do Brasil já se destacava em níveis de produtividade. Em 34 anos (1976/77 a 2010/11) a produção da soja passou de 12 milhões para 75 milhões de toneladas. Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja com cerca de 24 milhões de hectares cultivados e com uma produtividade média de 3.115 kg/ha (Conab, 2012), o que tem consolidado a soja como a principal cultura do agronegócio brasileiro desde 2004 (Reetz et al., 2009).

A soja vem sendo cultivada em 16 Estados brasileiros, sendo os principais produtores: Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás, Mato Grosso do Sul, Bahia e Minas Gerais. Esses Estados produziram em 2009/10 aproximadamente 67 milhões de toneladas, o que corresponde a 89,2% da produção brasileira de soja. Dados recentes mostram que a produção brasileira de soja vem crescendo e se difundindo por todo o país e está avançando em regiões antes não cultivadas como as regiões Norte e Nordeste (Conab, 2012).

O desenvolvimento de variedades de soja adaptadas ao cultivo em diferentes regiões do País tem favorecido a expansão da cultura, contudo vários fatores limitam a obtenção de bons rendimentos. Entre esses fatores estão as doenças que impedem que variedades melhoradas expressem seu potencial de rendimento causando perdas e prejuízos nas safras (Yorinori et al., 1993).

2.2. Fitonematoides na cultura da soja

A expansão da cultura da soja vem sendo acompanhada pelo aumento no ataque de pragas e doenças. Aproximadamente 50 doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides já foram identificadas no Brasil (Yorinori, 2002) e mais de 100 doenças já foram listadas mundialmente (Sinclair; Backman, 1989). Esses números continuam aumentando com a expansão da soja para novas áreas sendo cada vez mais preocupantes.

Os fitonematoides constituem um dos principais problemas em nível mundial para o cultivo da soja causando perdas anuais da produção estimadas na ordem de 11% (Barker, 1993). Mais de 100 espécies de nematoides, envolvendo cerca de 50 gêneros, já foram descritas na soja em todo mundo (Rebois; Golden, 1978). Entretanto, o nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe) e os nematoides de galha (*Meloidogyne* spp.) são os de maior importância econômica.

O gênero *Meloidogyne* foi relatado como causador de perdas na cultura da soja de cerca de 10 a 40% em solos arenosos ou médio-arenosos (Inomoto et al., 2010). As espécies *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* são as de maiores importância por causarem severos danos, não somente à cultura da soja, mas a várias culturas no Brasil e no mundo. Estes patógenos radiculares são parasitas obrigatórios de plantas, polígafos, cosmopolitas, ocorrendo em todo o território brasileiro.

Os sintomas apresentados pelas plantas infectadas são presença de galhas nas raízes (Figura 1), deformação e subdesenvolvimento do sistema radicular, redução na eficiência das raízes em absorver e transportar água e nutrientes, menor desenvolvimento da parte aérea, clorose generalizada, redução na produtividade e em determinadas situações a morte das plantas (Tihohod, 2000).



Figura 1. Galhas radiculares causadas por nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.) em soja. Fonte: Dias et al. (2006).

De acordo com Silva (2001) os sintomas variam com a suscetibilidade da cultivar e da densidade populacional dos nematoides. Em lavouras de soja infestadas, os sintomas geralmente ocorrem em reboleiras com plantas pequenas e amareladas, folhas tipo carijó caracterizadas por manchas cloróticas ou necróticas presentes entre as nervuras (Figura 2) (Costamilan, 2000; Ferraz, 2001).

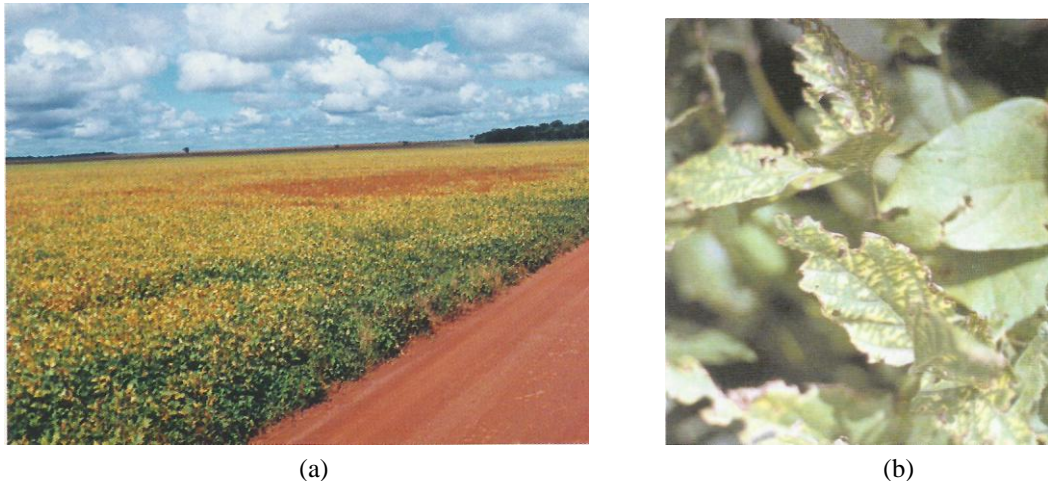


Figura 2. Sintomas causados por nematoide de galhas (*Meloidogyne* spp.) em soja: lavoura (a) e folhas carijós (b). Fonte: Dias et al. (2006).

A ampla distribuição geográfica, polifagia e alta variabilidade fisiológica desses nematoides dificultam o estabelecimento de medidas de controle, especialmente por rotação de culturas devido ao vasto número de espécies hospedeiras (Mendes; Rodriguez, 2000). Dessa forma, o método de controle mais econômico e eficiente em áreas infestadas é a utilização de cultivares resistentes.

2.3. Mecanismos de defesa de plantas a patógenos

Durante a evolução, o contato entre plantas e patógenos permitiu o desenvolvimento de diversos mecanismos de defesa. Esses mecanismos de proteção podem ser constitutivos ou induzidos, e envolvem tanto barreiras físicas, quanto químicas e vias metabólicas específicas. As defesas físicas são barreiras estruturais constitutivas como lignina, espinhos, pêlos, tricomas, etc. Já as defesas químicas induzidas, envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio, metabólitos secundários, peptídeos e proteínas relacionadas à defesa. Geralmente esse tipo de defesa pode ser letal para o patógeno, ou apenas detém o seu desenvolvimento (Miller et al., 2008).

As interações planta-patógeno, de um modo geral, são classificadas em compatíveis (patógeno virulento e hospedeiro suscetível) ou incompatíveis (patógeno avirulento e hospedeiro resistente). Nas interações compatíveis, o sistema de defesa da planta é ativado tardiamente ou não é ativado, garantindo o sucesso do patógeno e condicionando o aparecimento da doença na planta hospedeira. Nas interações incompatíveis, as estratégias de defesa são rápida e eficientemente ativadas conduzindo a resistência, que é manifestada pela inabilidade de o patógeno penetrar, crescer ou se multiplicar na planta (Agrawal, 2007).

Em termos moleculares, a ativação de defesas induzidas depende da combinação de genes específicos (genes de resistência-*R* e avirulência-*Avr*) que desencadeia uma reação de defesa complexa e rápida no sítio de elicitação. A percepção envolve moléculas elicitoras liberadas pelo patógeno, bem como receptores com alto grau de especificidade. A interpretação molecular para este tipo de interação, dita gene-a-gene, prediz que o gene de avirulência (*avr*) do patógeno codifica uma proteína elicitora (*Avr*) capaz de interagir especificamente com um receptor da planta codificado pelo gene de resistência (proteína *R*) correspondente (Flor, 1971; Keen, 1990). Acredita-se que o gene de resistência *R* codifique o receptor, que por sua vez reconhece a molécula indutora gerada direta ou indiretamente pela ação do gene *avr*, ativando os mecanismos de defesa (Keen, 1990).

A maioria dos genes de resistência (Genes *R*) codifica proteínas que possuem um sítio de ligação a nucleotídeos (NBS) e um domínio chamado de região rica em leucina (LRR) (Dangl; Jones, 2001). O domínio LRR é conhecido pela função de ligação e reconhecimento da proteína efetora do patógeno (*Avr*), por outro lado o domínio NBS tem o papel de ligação a nucleotídeos, resultando na iniciação da transdução de sinal que vai levar a ativação dos mecanismos de resistência na célula vegetal (Young; Innes, 2006).

Esta interação, direta ou indireta, entre o elicitor *Avr* do patógeno e o receptor *R* da planta, leva a uma rápida e intensa ativação das vias de transdução de sinais que resultam na resposta de resistência, resposta esta frequentemente associada a uma reação de hipersensibilidade (HR, *Hypersensitivity Response*). A resposta de hipersensibilidade resulta em um acúmulo de tecido morto em volta da região onde o patógeno se encontra, impedindo assim o seu avanço (Moffett et al., 2002).

Vários autores descrevem a HR como uma reação local, acompanhada pela produção ou liberação de formas de espécies reativas de oxigênio (ROS), ácido salicílico

e/ou compostos fenólicos, ou outros compostos envolvidos no caminho da sinalização extracelular (Sasabe et al., 2000).

Outro tipo de mecanismo de defesa ativado após a HR, em plantas, é a resposta sistêmica adquirida (SAR). A SAR caracteriza-se pela indução da resistência em locais da planta distantes do local primário da infecção pelo patógeno. Tem papel crucial para impedir a propagação da doença através da planta. Tanto na reação de hipersensibilidade quanto na resposta sistêmica adquirida, diversos genes que codificam as proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas-PR) são transcritos (Van Loon; Van Strien, 1999). Essas proteínas-PR se acumulam no tecido infectado, bem como nos tecidos não infectados, próximos e/ou distantes do sítio de infecção, sendo fundamentais para o mecanismo de defesa de plantas (Jwa et al., 2006; Miller et al., 2008).

As proteínas-PR são as mais importantes classes de moléculas de defesa da planta e são sintetizadas ou induzidas em resposta a diferentes agentes patogênicos como vírus, bactérias, fungos e nematoides. Podem também ser induzidas em resposta a estresses abióticos, injúrias mecânicas, sendo muitas delas encontradas no espaço intercelular como quitinases, defensinas, osmotinas, inibidores de proteinases, dentre outras. A participação de compostos como o óxido nítrico, etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico, tem sido sugerida como sinalizadores da SAR, e conseqüentemente, também, na produção de proteínas-PR (Arasimowicz; Floryszak-Wieczorek, 2007).

2.3.1. Interação planta x nematoide

Para desenvolver uma relação parasitária com a planta hospedeira os fitonematoides possuem adaptações morfológicas especiais: um estilete que é uma estrutura pontiaguda, capaz de perfurar a parede celular, injetar moléculas dentro da célula e sugar nutrientes citoplasmáticos (Davis et al., 2000; Hussey, 1989); glândulas secretórias associadas ao esôfago conhecidas também como glândulas esofagianas, que produzem secreções liberadas através do estilete nos tecidos do hospedeiro; os anfídeos, que são um par de órgãos sensoriais na região cefálica, que também produzem secreções associadas com a localização e reconhecimento da planta pelo nematoide; além de diversas outras estruturas necessárias para o parasitismo (Davis et al., 2004).

Após a eclosão do juvenil de segundo estágio (J2) do ovo com auxílio do estilete, esse passa a migrar no solo à procura de raízes de plantas que possam hospedá-los. Esses J2 são atraídos pelos seus hospedeiros, e para localizá-los depende da percepção de gradientes

de exsudados emanados das raízes das plantas (Hirsch et al., 2003). A interação destes exsudados com as moléculas presentes nas secreções e estruturas sensoriais dos nematoides ainda é pouco conhecida. Compostos orgânicos e inorgânicos excretados pelas raízes no solo podem influenciar os J2, como o dióxido de carbono, sendo considerado como um dos mais importantes fatores da atração planta-nematoide. Pode-se destacar também a glicoproteína anfídial gp32 de *Meloidogyne* spp. que é muito importante durante o processo de orientação do nematoide no solo (Perry, 1996).

Os nematoides conseguem acesso ao interior dos hospedeiros através da penetração direta, que é aquela que resulta de mecanismos próprios do patógeno, conseguindo vencer as barreiras naturais representadas pela cutícula e epiderme, na parte aérea, e pela periderme, em raízes e ramos lenhosos. A penetração dos J2 depende ainda de fatores físicos do solo, temperatura, umidade local e de sua própria patogenicidade. Toda a penetração e posterior colonização ocorrem graças à liberação de enzimas e toxinas produzidas pelo patógeno (Wallace, 1963).

Durante a fase infectiva, o J2 lança secreções produzidas pelas glândulas subventrais, que estão principalmente relacionadas com a penetração e a migração nas raízes. A parede celular das plantas constitui uma barreira natural contra microorganismos e consiste principalmente de polímeros de carboidratos, tais como celulose, hemicelulose e pectina e, possivelmente, compostos fenólicos. Assim como bactérias e fungos, os nematoides parasitas de plantas possuem sistemas enzimáticos para a degradação da parede celular. Já foram identificadas várias enzimas envolvidas na degradação de parede celular em espécies do gênero *Meloidogyne*. Dentre elas a β -1,4-endoglucanase responsável pela hidrólise da celulose (Ledger et al., 2006; Rosso et al., 1999). Enzimas responsáveis pela degradação da pectina como pectato liases e poligalacturonase também foram identificadas (Doyle; Lambert, 2002; Huang et al., 2005; Jaubert et al., 2002), bem como quitinases (Oka et al., 1997).

Uma vez no interior das raízes, os J2 migram intercelularmente em direção ao meristema e posteriormente mudam de direção e migram, quase que axialmente, para o tecido vascular e iniciam a busca pelas células que darão origem a formação do sítio de alimentação, que é o conjunto de células vegetais diferenciadas que funcionam como drenos de nutrientes do cilindro vascular para o fitonematoide. Após a penetração, geralmente com múltiplas infecções numa mesma raiz, o tecido radicular pode alargar e o

desenvolvimento radicular muitas vezes cessa por um período devido à formação das células gigantes (Davis et al., 2004).

Com o estabelecimento do parasitismo do nematoide, as plantas resistentes acionam o mecanismo de defesa por meio da indução de peroxidase, lipoxigenase, extensina e inibidores de proteinase (Gheysen; Fenoll, 2002), enzimas relacionadas com mecanismos de proteção contra radicais tóxicos (Niebel et al., 1995; Molinari; Miacola, 1997), e metabólitos secundários tais como fitoalexinas (Hanawa et al., 2001; Baldrige et al., 1998). Em plantas resistentes não há formação dos sítios de infecção após os J2 atingirem a região do tecido vascular, desenvolvendo-se necrose próximo à região proximal do nematoide, que morre ou abandona a raiz. Curiosamente neste caso, é que a reação de hipersensibilidade apenas se desenvolve no local onde será formado o sítio de alimentação e não durante a migração do nematoide pela raiz, e isto ocorre aproximadamente 12 horas após a penetração (Williamson, 1998).

Diversos genes de resistência a nematoides (*Nem-R*) foram isolados a partir de diferentes espécies de plantas (Williamson; Kumar, 2006). O primeiro gene de resistência a ser clonado foi o *Hs1pro-1* de *Beta procumbens*, que confere resistência a *Heterodera schactii* (Cai et al., 1997). A proteína codificada por esse gene não tem similaridade com outros genes de resistência em plantas. Entretanto, outros genes *Nem-R* clonados se assemelham com outros genes *R* de plantas em domínio estrutural. Dentre eles podem ser citados: *Mi-1*, *Hero A*, *Gpa2* e *Gro1-4*. Todos eles se enquadram dentro da classe de genes-*R* NBS-LRR. Os genes *Mi-1* e *Hero A* do tomate conferem amplo espectro de resistência a várias espécies de nematoides de galha (Milligan et al., 1998; Vos et al., 1998) e contra vários patótipos de duas espécies de nematoide de cisto da batata (Ernst et al., 2002), respectivamente. Ao contrário, os genes *Gpa2* (Van der Vossen et al., 2000) e *Gro1-4* (Paal et al., 2004) de batata conferem resistência estreita a patótipos de uma espécie de nematoide de cisto.

Genes *Nem-R* também incluem membros da classe de genes-*R* que codificam proteínas com domínios LRR extracelulares, uma região com um domínio transmembrana, e em alguns casos um domínio citoplasmático quinase. Como exemplo, podem ser citados *Rhg1* e *Rhg4*, que condicionam resistência a *Heterodera glycines* em soja (Meksem et al., 2001) e *Hs1-pro* que confere resistência a *Heterodera schactii* em *Beta procumbens* (Williamson; Kumar, 2006). Devido à estrutura destas proteínas, elas são consideradas

receptoras para elicitores extracelulares (Williamson; Kumar, 2006), portanto o reconhecimento de nematoides parasitas de plantas pode ocorrer tanto no espaço intercelular quanto no citosol (Jasmer et al., 2003).

Pouco é sabido sobre como a presença de nematoides específicos é reconhecida pelos genes *Nem-R* (Bent; Mackey, 2007; Jones; Dangl, 2006). Não se sabe ao certo se as proteínas que reconhecem a presença do patógeno o fazem por meio do reconhecimento direto do produto de uma molécula do nematoide ou pelas mudanças na célula hospedeira mediada pelos genes do patógeno (Belkhadir et al., 2004). O reconhecimento da presença dos nematoides resulta em mudanças conformacionais das proteínas que sinalizam a resposta de defesa. A ligação e hidrólise de nucleosídeo trifosfato modulam essa mudança conformacional do produto gênico de *Mi-1* e em outras proteínas *R* (Van Ooijen et al., 2007).

2.4. Proteômica

A rápida e crescente disponibilização de dados genômicos despertou grande interesse científico e a busca pelo conhecimento das funções dos genes e do modo de atuação. Em paralelo a esta disponibilização de dados genômicos foram desenvolvidas técnicas para análise dos transcritos de RNAm (transcriptômica) e análise do conjunto de proteínas expressas (proteômica) (Cánovas et al., 2004).

O termo proteômica começou a ser utilizado em 1995 e pode ser definido pela caracterização em larga escala de todas as proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo (Wilkins et al. 1995) num determinado momento. Atualmente, este conceito está mais abrangente, uma vez que a proteômica é capaz de quantificar, localizar, determinar modificações pós-traducionais e, principalmente, atribuir funções as proteínas identificadas (Cánovas et al., 2004).

O proteoma de um organismo é altamente mutável de acordo com as condições e estímulos a que o organismo é exposto, fato esse, que difere do genoma, cujo conteúdo praticamente não muda com o tempo (Wilkins et al., 1999). Assim, o estudo destas alterações as quais um organismo está exposto é extremamente importante quando se tem a finalidade de compreender o funcionamento molecular de uma organela, célula ou tecido (Ong; Pandey, 2001).

A análise proteômica vem utilizando a eletroforese bidimensional para a separação das proteínas com posterior identificação por espectrometria de massa (Görg et al., 2004) ou a utilização da cromatografia líquida, como método de separação, acoplada ao espectrômetro de massa (Peck, 2005).

2.4.1. Eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida é uma técnica de separação largamente usada para a análise de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas. Esta técnica promove a separação das proteínas em duas dimensões, de acordo com duas características físico-químicas independentes. Desse modo, essa técnica ocorre em duas etapas: numa primeira etapa em que as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) e numa segunda etapa em que a separação ocorre de acordo com sua massa molecular (MW) (O'Farrell, 1975).

Em géis bidimensionais os polipeptídeos aparecem formando manchas (*spots*) após serem corados. Os *spots* gerados, de modo geral, correspondem a uma única espécie de cadeia polipeptídica, e a quantidade de cada espécie pode ser determinada através da revelação do gel com corantes e análise de densitometria (Graves; Haystead, 2002).

Um grande número de proteínas podem ser separadas simultaneamente pela eletroforese bidimensional, sendo possível obter informações sobre o pI, a massa molecular e a abundância relativa, assim como modificações pós-traducionais, já que, geralmente, essas modificações provocam mobilidade eletroforética alterada dessas proteínas (Westermeyer; Naven, 2002). O aparecimento ou desaparecimento de *spots* podem fornecer informações em relação a proteínas estágio-específicas, enquanto a intensidade fornece informações quantitativas a respeito da expressão diferencial dos polipeptídeos (Graves; Haystead, 2002).

As proteínas separadas eletroforéticamente podem ser visualizadas por métodos gerais de coloração (Rocha et al., 2005). A coloração com *Coomassie Brilliant Blue* é o método mais usual, devido à facilidade de uso, baixo custo e por apresentar linearidade entre a intensidade de coloração e a quantidade de proteína. Uma desvantagem é a sua baixa sensibilidade, podendo detectar de 30 a 100 ng de proteína (Patton, 2002), exigindo uma maior quantidade de amostra para visualização das proteínas. Em contrapartida, a grande vantagem desse tipo de coloração é que ela é compatível com a espectrometria de

massa, pois permite que os polipeptídeos sejam retirados das malhas dos géis sem perda de eficiência do processo de digestão triptica (Pink et al., 2010).

2.4.2. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica que determina as massas moleculares de compostos químicos. O espectrômetro de massa é o instrumento analítico capaz de converter moléculas neutras em íons na forma gasosa e separá-los de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), com base no movimento de partículas carregadas em um campo elétrico ou magnético (Westermeyer; Naven, 2002).

Um espectrômetro de massa é composto basicamente de três elementos: (i) uma fonte de ionização que promove a ionização dos peptídeos e é responsável por vaporizá-los e carregá-los eletricamente; (ii) um ou mais analisadores de massa, os quais separam os íons de acordo com suas massas e cargas; (iii) um detector, cuja função é contabilizar e registrar todos os íons que chegam até ele (Graves; Haystead, 2002). Atualmente existem dois tipos principais de fonte de ionização que diferem na forma de emissão do feixe de íons sobre a amostra: a ionização por “eletrospray” (ESI) e a fonte de ionização por dessorção a *laser* auxiliada por matriz (MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*).

Na ionização por MALDI, o *pool* de peptídeos a ser analisado é misturado com uma matriz orgânica que absorve a radiação no comprimento de onda do *laser*. Após a evaporação do solvente, as moléculas da amostra cristalizam-se junto com a matriz. Esses cristais são então bombardeados com um feixe de raio *laser* na faixa de absorção do *laser*. A matriz absorve a energia do *laser* e transfere parte dessa energia para a amostra orgânica, permitindo a vaporização e ionização dos analitos pela transferência de carga dos íons da matriz para a amostra. Com isso, ocorre o lançamento dos íons gerados na amostra para a fase gasosa. A ionização MALDI tem sido muito usada porque permite medições de amostras complexas na presença de sais, sendo de fácil manipulação e apresenta simplicidade dos espectros de massas, pois são detectados somente íons monocarregados (Hillenkamp et al., 1991; Maeda et al., 2003).

Após a geração dos íons, vêm os processos de separação e detecção dos mesmos. O processo de separação é realizado no analisador de massas que como o próprio nome indica, têm como função básica separar os íons formados de acordo com suas relações m/z .

O analisador ToF (*Time-of-Flight*) é um dos analisadores mais comuns devido à facilidade de uso e ao menor custo. Seu nome é bastante sugestivo (tempo de voo), pois os íons são submetidos a um forte campo elétrico que os força a entrar rapidamente num tubo analítico de comprimento conhecido e “voam” numa velocidade proporcional a sua relação massa/carga em direção ao detector. Com isso, ocorre a separação das moléculas segundo a relação da massa do íon com o tempo que o mesmo leva para percorrer o tubo (Mann et al., 2001; Wysocki et al., 2005).

Os dados obtidos pelo analisador são recolhidos pelo terceiro compartimento fundamental de um espectrômetro de massa, o detector, que tem a função de detectar os íons que chegam até ele e amplificar o sinal. Os detectores funcionam pela conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que são proporcionais ao teor do componente da amostra, em função da relação m/z . Estes sinais são transmitidos para um programa computacional, configurando assim o espectro da proteína. O espectro é representado por um gráfico formado pela relação entre a intensidade relativa da corrente elétrica (eixo y) com a relação m/z do componente da amostra (eixo x) (Karas, 1998).

2.4.2.1. Identificação de proteínas por espectrometria de massa

A disponibilidade de sequências genômicas completas e o desenvolvimento de *softwares* especiais possibilitaram o desenvolvimento de novas técnicas de identificação de proteínas. Em 1993, Mann e colaboradores desenvolveram uma técnica chamada impressão digital por mapa de peptídeos ou PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*) para identificar proteínas a partir de dados obtidos por espectrometria de massa (Cottrell, 1994). O princípio desta técnica é baseado no conceito que, se uma proteína é digerida com uma enzima que apresenta uma dada especificidade de sequência, ela gera um conjunto de fragmentos com massas únicas e previsíveis, que podem ser considerados uma espécie de “impressão digital” da proteína (Pappin et al., 1993; Aebersold; Goodlett, 2001; Thiede et al., 2005). Neste procedimento a proteína de interesse é enzimaticamente clivada e a mistura de peptídeos obtida é analisada por espectrometria de massa. Desta forma, os dados obtidos experimentalmente podem ser comparados com massas teóricas obtidas através de uma clivagem *in silico* utilizando-se de sequências presentes nos bancos de dados (Henzel et al., 2003; Thiede et al., 2005).

Outra estratégia para a identificação da proteína consiste em recorrer à aquisição de informações da sequência do peptídeo, utilizando-se de dados da fragmentação dos fragmentos oriundos da clivagem enzimática. Os espectros obtidos são chamados de espectros de fragmentação ou MS/MS. Existem vários algoritmos utilizados para a busca de sequências em bancos de dados com espectros provenientes de análises de MS/MS não processados, como por exemplo, “Mascot”, “Sequest”, “PeptideSearch”, “ProteinProspector” e “Sonar MS/MS”. Uma limitação da busca em banco de dados usando somente os dados de MS e MS/MS é a necessidade de a sequência da proteína estar presente no banco de dados ou a sequência de proteínas bem próximas para uma identificação cruzada por homologia (Mann et al., 2001).

Caso a sequência da proteína analisada não esteja presente no banco de dados ou o organismo estudado possuir poucas informações genômicas, existe outra possibilidade por meio da interpretação do “sequenciamento de novo” envolvendo a análise manual de espectros de MS/MS auxiliada por *softwares* especializados (Shevchenko et al., 2001). Para isso, é necessário espectros de MS/MS de alta qualidade (derivados de peptídeos de alta pureza, com pouco ruído e com a presença do maior número de íons possíveis), bastante experiência do analista e, em geral, bastante tempo. Além disso, em muitos casos, é necessário usar mais de um tipo de protease para se completar ou confirmar resultados (Shevchenko et al., 2001; Habermann et al., 2004).

2.5. Proteômica de plantas

Os estudos proteômicos iniciais em plantas foram realizados em *Arabidopsis* e arroz (Devos; Gale, 2000) e posteriormente se estenderam para diferentes culturas. Os mapas de proteínas vêm sendo gerados a partir da análise proteômica de diversos tecidos e órgãos das plantas, como folhas, raízes, sementes e caules. Grandes esforços também têm sido notados na caracterização dos proteomas de diversas organelas, especialmente cloroplastos e mitocôndrias (Martinoia et al., 2007; Macherel et al., 2007).

Diversos aspectos da biologia das plantas vêm sendo investigados por meio de abordagens proteômicas em genótipos selvagens, mutantes e transgênicos, submetidos a diferentes condições de toxicidade, estresses ambientais, como também em interação com patógenos e pragas (Chen et al., 2006; Miche et al., 2006). Trabalhos comparativos permitem a análise de várias hipóteses sobre a regulação destes mecanismos e produzem

evidências que levam a proteínas candidatas, que podem atuar diretamente na regulação destas respostas. A proteômica de plantas vem assumindo um papel cada vez maior, agregando às metodologias convencionais informações inéditas e diferenciadas sobre a questão biológica estudada, que até então não podiam ser acessadas.

Em relação à cultura da soja, grande parte dos estudos proteômicos concentra-se na avaliação das respostas de espécies vegetais ao estresse causado por alta temperatura (Ren et al., 2009; Ahsan et al., 2010), baixa temperatura (Cheng et al., 2010), salinidade (Aghaei et al. 2009) e estresse hídrico (Alam et al., 2010b), que são fatores limitantes ao crescimento e ao desenvolvimento normal da planta. Outros estudos como estresses ambientais simulados sobre plantas para a caracterização proteômica incluem metais pesados (Sobkowiak; Deckert, 2006), toxicidade mineral (Duressa et al., 2010; Zhen et al., 2007) e alagamento do solo (Shi et al., 2008; Alam et al., 2010a). Outro tipo de estudo que vem crescendo aos poucos são aqueles relacionados aos estresses de origem biótica, causados por patógenos (Hong-Mei et al., 2009).

A aplicação da proteômica para o estudo das interações planta-patógeno é de grande interesse científico e biotecnológico, pois permite um maior entendimento desse complexo sistema. Contudo apesar da crescente quantidade de dados na literatura descrevendo genes envolvidos no processo dessa interação e mecanismos de defesa, poucos dados se referem as modificações em nível de proteoma associadas a estas interações (Cánovas et al., 2004). Em relação a análise proteômica entre a interação planta-nematoide há um número muito reduzido de trabalhos publicados e geralmente o foco das pesquisas é o estudo dos fatores proteicos produzidos pelo patógeno para estabelecer a infecção na planta hospedeira (Bellafiori, et al., 2008).

Um estudo inicial avaliando a interação entre nematoide e planta foi realizado por Callahan et al., (1997) utilizando eletroforese uni e bidimensional para avaliar extratos de proteínas da raiz de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em resposta à inoculação pelo nematoide de galha (*M. incognita*). Vários polipeptídeos foram diferencialmente expressos em resposta à infecção causada pelo patógeno. Um polipeptídeo com 14 kDa foi abundantemente e diferencialmente expressos na isolinha resistente 8 dias após a inoculação. As sequências de aminoácidos obtidas não revelaram similaridades consideráveis com outras sequências, contudo os autores consideraram que esse novo polipeptídeo possa estar relacionado com uma resistência específica na formação das galhas.

Outra pesquisa avaliando proteínas diferencialmente expressas em cultivares resistentes de algodão e café infectadas com *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne paranaensis*, respectivamente, foi realizada por Franco et al. (2010). Por meio da análise de géis bidimensionais e espectrometria foram identificadas proteínas relacionadas com a patogenicidade como quitinase e quinona redutase, que são proteínas importantes para o mecanismo de defesa (Li et al., 2006; Williamson; Kumar, 2006; Sparla et al., 1999).

Recentemente, Liu et al. (2011) utilizaram a eletroforese bidimensional associada a espectrometria de massa para comparar o proteoma de raízes de soja resistentes/sensíveis inoculadas por nematoide de cisto raça 3. Com esse estudo, os autores identificaram poucas proteínas diferentes entre os proteomas avaliados e afirmaram que as proteínas diferenciais estão envolvidas com o sistema de defesa, metabolismo e produção de energia da planta. As proteínas que se apresentaram mais expressas no genótipo resistente foram inibidor de tripsina p20, precursor de serino proteinase, triose fosfato isomerase e cafeoil coenzima-A-3-O-metiltransferase 2.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a identificação de proteínas diferencialmente expressas pela soja em resposta à inoculação com nematoides de galha (*Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*).

Para alcançar o objetivo proposto, as seguintes etapas foram realizadas:

- 1) Extração de proteínas de raízes de soja do genótipo resistente Conquista previamente inoculadas por *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* em diferentes tempos após inoculação;
- 2) Separação das proteínas das raízes de soja por meio da eletroforese bidimensional;
- 3) Análise comparativa dos géis de plantas inoculadas x plantas não inoculadas para a identificação de proteínas diferencialmente expressas;
- 4) Retirada dos *spots* diferencialmente expressos, tripsinização e análise das proteínas por espectrometria de massa;
- 5) Identificação das proteínas em bancos de dados utilizando *softwares* específicos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P.; WILLIAMSON, V.M. Plant Nematode Interaction: A Sophisticated Dialogue. **Advances in Botanical Research**, v.53, p.148-192, 2010.
- AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chemical Reviews**, v.101, n.2, p.269-296, 2001.
- AGHAEI, K.; EHSANPOUR, A.A.; SHAH, A.H.; KOMATSU, S. Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. **Amino Acids**, v.36, p.91-98, 2009.
- AGRAWAL, A.A. Macroevolution of plant defense strategies. **Trends in Ecology & Evolution**, v.22, p.103-109, 2007.
- AHSAN, N.; DONNART, T.; NOURI, M.Z.; KOMATSU, S. Tissue-specific defense and thermo-adaptive mechanisms of soybean seedlings under heat stress revealed by proteomic approach. **Journal of Proteome Research**, v.9, p.4189-4204, 2010.
- ALAM, I.; LEE, D.G.; KIM, K.H.; PARK, C.H.; SHARMIN, S.A.; LEE, H.; OH, K.W.; YUN, B.W.; LEE, B.H. Proteome analysis of soybean roots under waterlogging stress at an early vegetative stage. **Journal of Biosciences**, v.35, p.49-62, 2010a.
- ALAM, I.; SHARMIN, S.A.; KIM, K.H.; YANG, J.K.; CHOI, M.S.; LEE, B.H. Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. **Plant and Soil**, v.333, p.491-505, 2010b.
- ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress response. **Plant Science**, v.172, p.876-887, 2007.
- ASMUS, G.L. Danos causados à cultura da soja por nematóide do gênero *Meloidogyne* In. FERRAZ, L.C.C.B.; ASMUS, G.L.; CARNEIRO, R.G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J.F.V. **Relações parasito-hospedeiro nas Meloidogynoses da soja**. Londrina: Embrapa, 2001. p.39-62.
- BALDRIDGE, G.D.; O'NEILL, N.R.; SAMAC, D.A. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: defense-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. **Plant Molecular Biology**, v.38, p.999-1010, 1998.
- BARKER, K.R. Resistance/tolerance and related concepts/terminology in Plant Nematology. **Plant Disease**, v.77 p.111-113, 1993.

- BAUM, T.J.; HUSSEY, R.S.; DAVIS, E.L. Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism. **Genetic Engineering**, v.28, p.17-43, 2007.
- BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL, J.L. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion in Plant Biology**, v.7, n.4, p.391-399, 2004.
- BELLAFFIORE, S.; SHEN, Z.; ROSSO, M.N.; ABAD, P.; SHIH, P.; BRIGGS, S.P. Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. **PLoS Pathogens**, v.4, p.1-12, 2008.
- BENT, A.F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Review of Phytopathology**, v.45, p.346-399, 2007.
- CAI, D.; KLEINE M.; KIFLE, S.; HARLOFF, H.J.; SANDAL, N.N.; MARCKER, K.A.; KLEIN-LANKHORST, R.M.; SALENTIEN, E.M.J.; LANGE, W.; STIEKEMA, W.J.; WYSS, U.; GRUNDLER, F.M.W.; JUNG, C. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. **Science**, v.275, p.832-834, 1997.
- CALLAHAN, F.E.; JENKINS, J.N.; CREECH, R.G.; LAWRENCE, G.W. Changes in cotton root proteins correlated with resistance to root knot nematode development. **Journal of Cotton Science**, v.1, p.38-47, 1997.
- CÁNOVAS, F.M.; DUMAS-GAUDOT, E.; RECORBET, G.; JORRIN, J.; MOCK, H.P.; ROSSIGNOL, M. Plant proteome analysis. **Proteomics**, v.4, p.285-298, 2004.
- CHEN, C.W.; YANG, Y.W.; LUR, H.S.; TSAI, Y.G.; CHANG, M.C. A novel function of abscisic acid in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) root growth and development. **Plant & Cell Physiology**, v.47, p.1-13, 2006.
- CHENG, L.; GAO, X.; LI, S.; SHI, M.; JAVEED, H.; JING, X.; YANG, G.; HE, G. Proteomic analysis of soybean [*Glycine max* (L.) Meer.] seeds during imbibition at chilling temperature. **Molecular Breeding**, v.26, p.1-17, 2010.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Central de Informações Agropecuárias**: Safras 2011. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: Março de 2012.
- COSTAMILAN, L.M. Estresse ocasionado por doenças e por nematóides. IN: BONATO, E.R. (ed) **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 254p.
- COTTRELL, J.S. Protein identification by peptide mass fingerprinting. **Peptide Research**, v.7, p.115-124, 1994.

DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection, **Nature**, v.411, p.826-833, 2001.

DAVIS, E.L.; HUSSEY R.S.; BAUM, T.J.; BAKKER, J.; SCHOTS, A.; ROSSO, M.-N.; ABAD, P. Nematode parasitism genes. **Annual Review of Phytopathology**, v.38, p.365-396, 2000.

DAVIS, E.L.; HUSSEY, R.S.; BAUM, T.J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology**, v.20, p.134-141, 2004.

DEVOS, K.M.; GALE, M.D. Genome relationships: The grass model in current research. **Plant Cell**, v.12, n.5, p.637-646, 2000.

DIAS, W.P.; SILVA, J.F.V.; GARCIA, A.; CARNEIRO, G.E.S. Nematóide de importância para a soja no Brasil. In: **Boletim de Pesquisa de Soja 2006**. Rondonópolis: FUNDAÇÃO MT- Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso, p.139-151, 2006.

DOYLE, E.A.; LAMBERT, K.N. Cloning and characterization of an esophagealgland-specific pectate lyase from the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, p.549-556, 2002.

DURESSA, D.; SOLIMAN, K.; CEBER, E. Protein and polyphenol profile changes in soybean roots under aluminum stress. **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, v.2, n.3, p.38-45, 2010.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2011**. Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados : Embrapa Agropecuária Oeste, 2010, 255p.

ERNST, K.; KUMAR, A.; KRISELEIT, D.; KLOOS, D.U.; PHILLIPS, M.S.; GANAL, M.W. The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (Hero) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. **Plant Journal**, v.3, p.127-136, 2002.

FERRAZ, L.C.C.B.; ASMUS, G.L.; CARNEIRO, R.G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J.F.V. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidogynoses da soja**. Londrina: Embrapa, 2001. p.15-38.

FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, v.9, p.275-296, 1971.

FRANCO, O.L.; PEREIRA, J.L.; COSTA, P.H.A.; ROCHA, T.L.; ALBUQUERQUE, E.V.S.; GROSSI-DE-SA, M.F.; CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO, R.G.; MEHTA, A. Methodological evaluation of 2-DE to study root proteomics during nematode infection in

cotton and coffee plants. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v.40, p.52-163, 2010.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p.191-219, 2002.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v.4, p.3665-3685, 2004.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, p.39-63, 2002.

HABERMANN, B.; OEGEMAS, J.; SUNYAEV, S.; SHEVCHENKO, A. The Power and the Limitations of Cross-Species Protein Identification by Mass Spectrometry-driven Sequence Similarity Searches. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 3, p.238-249, 2004.

HANAWA, F.; YAMADA, T.; NAKASHIMA, T. Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Phytochemistry**, v.57, p.223-228, 2001.

HENZEL, W.J.; WATANABE, C.; STULTS, J.T. Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.14, p.931-942, 2003.

HILLENKAMP, F.; KARAS, R.C.; BEAVIS, B.T.C. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Analytical Chemistry**, v.63, p.1193-1203, 1991.

HIRSCH, A.M.; BAUER, W.D.; BIRD, D.M.; CULLIMORE, J.; TYLER, B.; YODER, J.I. Molecular signals and receptors: Controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. **Ecology**, v.84, p. 858- 868, 2003.

HONG-MEI, Q.; CHUN-YAN, L.; DAI-JUN, Z.; XIU-JUN, X.; JIA-LIN, W.; JING, W.; CAI-YUN, S.; PENG, S.; GU-HUA, H.; QING-SHAN, C. Proteome analysis of resistance to phytophthora root rot in soybean. **Acta Agronomica Sinica**, v.35, p.418-423, 2009.

HUANG, G.; DONG, R.; ALLEN, R.; DAVIS, E.L.; BAUM, T.J.; HUSSEY, R.S. Developmental expression and molecular analysis of two *Meloidogyne incognita* pectate lyase genes. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.685-692, 2005.

HUSSEY, R.S. Disease-inducing secretions of plant parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.123-141, 1989.

- INOMOTO, M.M.; ASMUS, G.L.; SILVA, R.A.D. Importância e manejo dos nematóides da soja. **Boletim de Pesquisa de Soja**, n.14, 276-277, 2010.
- JASMER, D.P.; GOVERSE, A.; SMANT, G. Parasitic nematode interactions with mammals and plant. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p.245-270, 2003.
- JAUBERT, S.; LAFFAIRE, J.B.; ABAD, P.; ROSSO, M.N. A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **FEBS Letters**, v.522, p.109-112, 2002.
- JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v.444, p.323-329, 2006.
- JULLIATTI, F.C.; BORGES, E.N.; PASSOS, R.R.; CALDEIRA JÚNIOR, J.C.; BRANDÃO, A.M. Doenças da soja. **Cultivar**, v.47, p.3-14, 2003.
- JWA, N.; AGRAWAL, G.K.; TAMOGAMI, S.; YONEKURA, M.; HAN, O.; IWAHASHI, H.; RAKWAL, R. Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p.261-273, 2006.
- KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10.000 daltons. **Analytical Chemistry**, v.60, n.20, p.2299-2301, 1988.
- KEEN, N.T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, v.24, p.447-463, 1990.
- LEDGER, T.N.; JAUBERT, S.; BOSSELUT, N.; ABAD, P.; ROSSO, M.N. Characterization of a new beta-1,4-endoglucanase gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and evolutionary scheme for phytonematode family 5 glycosyl hydrolases. **Gene**, v.382, p.121-128, 2006.
- LI, H.Y.; YANG, G.D.; SHU, H.R.; YANG, Y.T.; YE, B.X.; NISHIDA, I.; ZHENG C.C. Colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* induces a defense response against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in the grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), which includes transcriptional activation of the class III chitinase gene VCH3. **Plant Cell Physiology**, v.47, p.154-63, 2006.
- LIU, D.; CHEN, L.; DUAN, Y. Differential Proteomic Analysis of the Resistant Soybean Infected by Soybean Cyst Nematode, *Heterodera glycines* Race 3. **Journal of Agricultural Science**, v.3, n.4, p.160-167, 2011.

MACHEREL, D.; BENAMAR, A.; AVELANGE-MACHEREL, M.; TOLLETER, D. Function and stress tolerance of seed mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v.129, p.233-241, 2007.

MAEDA, M.; MORI, H.E.; WADA, C. Proteome analysis using MALDI-TOF MS. **Seikagak**, v.75, n.5, p.401-406, 2003.

MANN, M.; HENDRICKSON, R.C.; PANDEY, A. Analysis of Proteins and Proteomes by Mass Spectrometry. **Annual Review of Biochemistry**, v.70, p.437-473, 2001.

MARTINOIA, E.; MAESHIMA, M.; NEUHAUS, H.E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.1, p.83-102, 2007.

MEKSEM, K.; PANTAZOPOULOS, P.; NJITI, V.N.; HYTEN, L.D.; ARELLI, P.R.; LIGHTFOOT, D.A. 'Forest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the *Rhg1* and *Rhg4* loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v.103, p.710-717, 2001.

MENDES, M.L.; RODRIGUEZ, P.B.N. Reação de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] aos nematóides de galhas *Meloidogyne javanica* e a *M. incognita* Raça 1, 2, 3 e 4. **Nematologia Brasileira**, v.24, n.2, p.211-217, 2000.

MICHE, L.; BATTISTONI, F.; GERNMER, S.; BELGHAZI, M.; REINHOLD-HUREK, B. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.19, n.5, p.502-511, 2006.

MILLER, F.P. After 10.000 years of agriculture, whither agronomy? **Agronomy Journal**, v.100, p.22-34, 2008.

MILLIGAN, S.B.; BODEAU, J.; YAGHOUBI, J.; KALOSHIAN, I.; ZABEL, P.; WILLIAMSON, V.M. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. **Plant Cell**, v.10, p.1307-1319, 1998.

MOFFETT, P.G.; FRANHAM, G.; PEART, J.; BAUCOMBE, D.C. Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death." **EMBO Journal**, v.21, p.4511-4519, 2002.

MOLINARI, S.; MIACOLA, C. Catalase induction in galls produced by *Meloidogyne* - tomato root interactions *in vitro*. **Nematology Mediterranea**, v.25, n.2, p.199-303, 1997.

- NIEBEL, A.; HEUNGENS, K.; BARTHEL, N.; INZÉ, D.; MONTAGU, M.V.; GHEYSEN, G. Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v.3, p.371-378, 1995.
- O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.250, p.4007-4021, 1975.
- OKA, Y.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Are pathogenesis-related proteins induced by *Meloidogyne javanica* or *Heterodera Avenae* invasion? **Journal of Nematology**, v.29, p.501-508, 1997.
- ONG, S.E.; PANDEY, A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. **Biomolecular Engineering**, v.18, n.5, p.195-205, 2001.
- PAAL, J.; HENSELEWSKI, H.; MUTH, J.; MEKSEM, K.; MENENDEZ, C.M.; SALAMINI, F.; BALLVORA, A.; GEBHARDT, C. Molecular cloning of the potato Gro1-4 gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. **Plant Journal**, v.38, p.285-297, 2004.
- PAPPIN D. J.; HOJRUP P.; BLEASBY A.J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. **Current Biology**, v.3, n.6, p.327-332, 1993.
- PATTON, W.F. Detection technologies in proteome analysis. **Journal Chromatography B**, v.771, p.3-31, 2002.
- PECK, S.C. Update on Proteomics in *Arabidopsis*. Where do We Go From Here? **Plant Physiology**, v.138, p.591 - 599, 2005.
- PERRY, R.N. Chemoreception in plant parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.181-199, 1996.
- PINK, M.; VERMA, N.; RETTENMEIER, A.W.; SCHMITZ-SPANKE, S. CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. **Electrophoresis**, v.31, n.4, p.593-598, 2010.
- REBOIS, R.V.; GOLDEN, A.M. Nematodes occurrences in soybean fields in Mississippi and Louisiana. **Plant Disease Reporter**, v.62, p.433-437, 1978.
- REETZ, E.R.; SANTOS, C.; CORRÊA, S.; SILVEIRA, D.D.; CARVALHO, C.D.; REN, S.; BILYEU, K.D.; BEUSELINCK, P.R. Composition, vigor, and proteome of mature soybean seeds developed under high temperature. **Crop science**, v. 49, p.1010-1022, 2009.

REN, S.; BILYEU, K.D.; BEUSELINCK, P.R. Composition, vigor, and proteome of mature soybean seeds developed under high temperature. **Crop Science**, v.49, p.1010-1022, 2009.

ROCHA, T.L.; COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; VASCONCELOS, E.A.R.; COUTINHO, M.V.; PAES, N.S.; SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. **Eletroforese Bidimensional e Análise de Proteomas**. Comunicado Técnico 136. Brasília-DF, 2005.

ROSSO, M.N.; FAVERY, B.; PIOTTE, C.; ARTHAUD, L.; DE BOER, J.M.; HUSSEY, R.S.; BARKER, J.; BAUM, T.J.; ABAD, P. Isolation of a cDNA encoding a beta-1,4-endoglucanase in the rootknot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.585-591, 1999.

SASABE, M.; TAKEUCHI, K.; KAMOUN, S.; ICHINOSE, Y.; GOVERS, F.; TOYODA, K.; SHIRAISHI, T.; YAMADA, T. Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.5005-5013, 2000.

SHEVCHENKO, A.; SUNYAEV, S.; LOBODA, A.; SHEVCHENKO, A.; BORK, P.; ENS, W.; STANDING, K.G. Charting the Proteomes of Organisms with Unsequenced Genomes by MALDI Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and BLAST Homology Searching. **Analytical Chemistry**, v.73, p.1917-1926, 2001.

SHI, F.; YAMAMOTO, R.; SHIMAMURA, S.; HIRAGA, S.; NAKAYAMA, N.; NAKAMURA, T.; YUKAWA, K.; HACHINOHE, M.; MATSUMOTO, H.; KOMATSU, S. Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding. **Phytochemistry**, v.69, p.1295-1303, 2008.

SILVA, J.F.V.; FERRAZ, L.C.C.B.; ARIAS, C.A. Herança da resistência a *Meloidogyne javanica* em soja. **Nematropica**, v.31, n.2, p.211-219, 2001.

SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. **Compendium of soybean disease**. 3 ed. St Paul: APS Press, 1989. 106p.

SOBKOWIAK, R.; DECKERT, J. Proteins induced by cadmium in soybean cells. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.1203-1206, 2006.

SPARLA, F.; TEDESCHI, G.; PUPILLO, P.; TROST, P. Cloning and heterologous expression of NAD(P)H:quinone reductase of *Arabidopsis thaliana*, a functional homologue of animal DT-diaphorase. **FEBS Letters**, v.463, p.382-386, 1999.

THIEDE, B.; WOLFGANG, H.; KRAHA, A.; MATTOWC, J.; SCHMID, M.; SCHMIDT, F.; JUNGBLUT, P. R. Peptide mass Fingerprinting. **Methods**, v.35, p.237-247, 2005.

TIHOHOD, D. **Nematologia Agrícola Aplicada**. 2ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 473p.

VAN DER VOSSSEN, E.A.; VAN DER VOORT, J.N.; KANYUKA, K.; BENDAHMANE, A.; SANDBRINK, H.; BAULCOMBE, D.C.; BAKKER, J.; STIEKEMA, W.J.; KLEIN-LANKHORST, R.M. Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. **Plant Journal**, v.23, p.567-576, 2000.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEM, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-I type proteins. **Physiological Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

VAN- OOIJEN, G.; VAN DEN BURG, H.A.; CORNELISSEN, B.J.C.; TAKKEN, F.L.W. Structure and function of resistance proteins in solanaceous plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.45, p.43-72, 2007.

VOS, P.; SIMONS, G.; JESSE T.; WIJBRANDI, J.; HEINEN L.; HOGERS, R.; FRIJTERS, A.; GROENENDIJK, J.; DIERGAARDE, P.; REIJANSN, M.; FIERENS-ONSTENK, J.; DE BOTH, M.; PELEMAN, J.; LIHARSKA, T.; HONTELEZ, J.; ZABEAU, M. The tomato Mi-1 gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. **Nature Biotechnology**, v.16, p.1365-1369, 1998.

WALLACE, H.R. **The biology of plant parasitic nematodes**. London, Edward Arnold Ltd. 1963.

WESTERMEIER, R.; NAVEN, T. **Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis**. Wiley-VHC. 316 p. 2002.

WILKINS, M.R.; GASTEIGER, E.; GOOLEY, A.A.; HERBERT, B.R.; MOLLOY, M.P.; BINZ, P.A.; OU, K.; SANCHEZ, J.C.; BAIROCH, A.; WILLIAMS, K.L.; HOCHSTRASSER, D.F. High-throughput mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications. **Journal of Molecular Biology**, v.289, p.645-657, 1999.

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D.; HUMPHERY-SMITH, I.; HOCHSTRASSER, D.F.; WILLIAMS, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and now to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v.13, p.19-50, 1995.

WILLIAMSON, V.M.; Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. **Annual Review of Phytopathology**, 36, p.277-293, 1998.

WILLIAMSON, V.M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in Genetics**, v.22, p.396-403, 2006.

WYSOCKI, V.H.; RESINGB, K.A.; ZHANGA, Q.; CHENGA, G. Mass spectrometry of peptides and proteins. **Methods**, v.35, n.3, p.211-22, 2005.

YORINORI, J.T.; CHARCHAR, M.J.D.; NASSER, L.C.B.; HENNING, A.A. Doenças da soja e seu controle. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I.M. (Eds.). **Cultura de soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.535.

YORINORI, J.T. Situação atual das doenças potenciais no cone sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, II, 2002, Foz do Iguaçu. **Anais...** Londrina: Embrapa CNPSoja, 2002. p.171-187.

YOUNG, B.J.; INNES, R.W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nature Immunology**, v.7, p.1243-1249, 2006.

ZHEN, Y.; QI, J.; WANG, S.; SU, J.; XU, G.; ZHANG, M.; MIAO, L.; PENG, X.; TIAN, D.; TIAN, D.; YANG, Y. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. **Physiologia Plantarum**, v.131, p.542-554, 2007.

CAPÍTULO 1

ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE SOJA EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Meloidogyne javanica*

INTRODUÇÃO

A soja é uma cultura mundialmente difundida, sendo o Brasil o segundo maior produtor de grãos, com grandes expectativas de ultrapassar os Estados Unidos, que são atualmente o maior produtor. Essa leguminosa é uma importante fonte de proteína para a alimentação humana e animal, assim como de óleo para consumo humano e biodiesel, o que torna essa cultura um dos principais produtos de exportação e, portanto, de grande valor para a economia brasileira (Roessing; Guedes, 1993; Dall'Agnol, 2006).

Atualmente a soja vem sendo cultivada em 17 estados brasileiros graças ao desenvolvimento de variedades adaptadas às diferentes regiões do País (Conab, 2011). Contudo, uma série de fatores influencia o potencial de rendimento dessa cultura. Dentre esses fatores, as doenças causadas por nematoides de galha geram grandes prejuízos aos sojicultores, sendo a espécie *Meloidogyne javanica* extremamente importante, por ser polífaga e não ser controlada pela rotação de cultura devido ao fato de ser hospedeira de diversas outras culturas.

Estudos relacionados à proteômica permitem analisar de forma global o conjunto de proteínas expressas em uma célula ou tecido sob determinada situação, podendo contribuir para aumentar o conhecimento da complexa interação planta nematoide. Devido a natureza dinâmica do proteoma, seu estudo representa uma forma de encontrar possíveis funções para proteínas envolvidas em processos biológicos importantes em diferentes vias metabólicas permitindo um esclarecimento do funcionamento de uma célula ou tecido a nível molecular.

Considerando a grande importância econômica da soja e as perdas causadas pelo patógeno *Meloidogyne javanica*, associados à necessidade do entendimento da interação nesse patossistema, objetivou-se com o presente trabalho identificar proteínas de soja que sejam diferencialmente expressas em resposta à inoculação com *M. javanica* por meio da eletroforese bidimensional e espectrometria de massa.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e inoculação

A variedade Conquista, resistente ao nematoide de galha *Meloidogyne javanica*, utilizada neste trabalho foi disponibilizada pelo Banco Ativo de Germoplasma de soja da COODETEC (Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola), Cascavel-PR.

Sementes da variedade Conquista (resistente ao nematoide de galha *Meloidogyne javanica*) foram semeadas em tubetes (5 cm de diâmetro e 25 cm de comprimento) contendo duas partes de areia e uma de solo argiloso. Os tubetes foram colocados dentro de baldes contendo areia, e estes foram mergulhados em banho-maria para que a temperatura de 28°C fosse mantida no interior dos mesmos.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições.

Após 10 dias de emergência das plântulas foi realizada a inoculação de uma suspensão de 5000 ovos de *Meloidogyne javanica* por tubete. Após a inoculação, as raízes foram coletadas em quatro intervalos de tempos distintos (12, 24, 48 e 96 horas). Para o controle dos tratamentos, foram coletadas raízes de plantas não inoculadas dos quatro intervalos de tempos mencionados.

No momento da coleta as raízes foram lavadas sob forte jato de água e imediatamente congeladas em nitrogênio. Em seguida, armazenou-se as raízes a -80°C até o momento da extração de proteínas.

Essas etapas foram realizadas na COODETEC sob a orientação/coordenação do Dr. Ivan Schuster.

Extração de proteínas

Utilizou-se o método de extração descrito por Sarma et al. (2008), com algumas modificações. As amostras foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido e o pó obtido foi transferido para tubos Falcon de 50 mL. Após a trituração foram adicionados 8 mL de solução tampão contendo Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, DTT 50mM, PMSF 1 mM e 50µL de inibidor de protease Sigma P9455. Para uma melhor homogeneização das amostras utilizou-se o *Polytron homogenizer* (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY, EUA)

Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 8000xg por 20 min a 4°C e o sobrenadante coletado. Adicionou-se 5 mL de fenol tamponado pH 8,0 e os tubos foram mantidos sob agitação por uma hora à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma nova centrifugação e a fração aquosa superior foi coletada em um novo tubo para reextrair as proteínas que pudessem ter ficado na fase aquosa. Agitou-se por 20 min à temperatura ambiente e centrifugou-se novamente. As porções fenólicas foram juntadas e adicionaram-se 7 mL de Tris HCl 100 mM pH 8,0 / DTT 10 mM. A mistura foi agitada por 10 min e centrifugadas. Descartou-se a fração aquosa superior e adicionaram-se a porção fenólica inferior 25 mL de solução 0,1 M de acetato de amônia em metanol gelado / DTT 10 mM. Deixou-se a -80°C *overnight* para precipitação das proteínas. As amostras foram centrifugadas e o *pellet* foi lavado duas vezes com 10 mL de solução 0,1 M de acetato de amônia metanólico, duas vezes com 10 mL de acetona 80% e duas vezes com 10 mL de etanol 90%. Durante as lavagens foram feitas agitações em Vortex com posterior centrifugação a 8000xg por 15 min.

O *pellet* final foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e deixado secar a temperatura ambiente. As proteínas foram solubilizadas em tampão de solubilização contendo ureia 7 M, tiourea 2 M e CHAPS 4% e depois sonicadas em banho de gelo numa potência 10%, em sonicador da marca *UltraSonic Processor* (Modelo GE 50). As proteínas extraídas foram armazenadas em *freezer* -20°C.

Quantificação das proteínas

A concentração proteica foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) e utilizou-se albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão.

Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Focalização isoeétrica (IEF)

Foram utilizadas tiras de 13 cm com intervalo linear de pH 4,0 a 7,0 para a realização da focalização isoeétrica. Inicialmente, as tiras foram reidratadas durante um período de 14 h a 20 h em aparato de reidratação IPGBOX (GE Healthcare). Foram aplicados 250 µL de solução contendo 500µg de proteínas, tampão IPG 2% e solução *Destreak* (GE Healthcare)

A focalização isoeétrica foi realizada no equipamento IPGphor III (GE Healthcare) sob temperatura controlada de 20°C de acordo com as seguintes etapas: 1) 200 Vxh em passo

único por 14 horas; 2) 500 Vxh em passo único de 500 volts; 3) 800 Vxh em gradiente até 1.000 volts; 4) 11.300 Vxh em gradiente até 8000 volts; 5) 12.000 Vxh em passo único de 8.000 volts. A amperagem máxima foi de 50 μ A/tira.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a análise da segunda dimensão, as tiras foram previamente equilibradas após a IEF em 10 mL de solução de equilíbrio (tris 75 mM pH 8,8, ureia 6M, glicerol 30%, SDS 2% e azul de bromofenol 0,002%) sob agitação por 30 min. Foram realizadas duas etapas de equilíbrio com a finalidade de reduzir e alquilar as proteínas. À primeira etapa, foi adicionado 1% de DTT ao tampão de equilíbrio e, na segunda etapa, adicionou-se 2,5% de iodoacetamida.

A segunda dimensão da eletroforese foi efetuada em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970), em gel de separação na concentração de 12,5% de poliacrilamida, em cuba tipo DaltSix (GE Healthcare). As tiras previamente equilibradas foram colocadas no topo do gel de poliacrilamida na presença de SDS e seladas com solução de agarose. Como marcadores de massa molecular foram utilizadas as proteínas: fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidras carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

A corrida foi realizada em uma etapa inicial de 10 mA/gel por 60 min e, em seguida, a 40 mA/gel até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. A temperatura foi mantida a 8°C por meio de refrigeração com circulador termostático.

Terminada a corrida, os géis 2-D foram colocados em solução de fixação contendo ácido acético a 10% (v/v) e etanol a 40% (v/v) *overnight*, e corados por 48 horas com solução contendo sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v), *Coomassie blue* G-250 0,08% (v/v) e etanol 20% (v/v) (Neuhoff et al., 1985). Após essa etapa, os géis foram lavados com solução de ácido acético 1% (v/v) até a eliminação completa do corante excedente.

Captura das imagens e análise da expressão

As imagens dos géis foram digitalizadas usando o *Image Scanner III* (GE Healthcare) no modo de escaneamento transparente, resolução de 300 dpi, filtro de cor vermelho e com fórmula de calibração atualizada. As imagens foram calibradas com o *software Labscan* (GE Healthcare). As análises comparativas das imagens digitais foram efetuadas utilizando o *software Image Master 2D Platinum* (GE-Healthcare).

Através desse *software* foi feita a detecção automática dos pontos proteicos seguidas de correções manuais quando necessário. As correções foram realizadas com a finalidade de eliminar *spots* falso positivos, inserir *spots* falso negativos, efetuar correções quanto à delimitação das regiões dos *spots* e correção de *matches*.

Foi estimado o número total de *spots*, os pontos isoelétricos e massas moleculares, assim como seus níveis de expressão. Este último parâmetro foi mensurado pelo programa através da avaliação do volume (densidade ótica e área) dos *spots* contidos no gel.

A comparação foi feita entre géis de plantas não inoculadas e de plantas inoculadas para cada tempo de inoculação, considerando três repetições biológicas para cada tratamento. Foram considerados diferencialmente expressos, *spots* que apresentaram uma variação de sobreposição de medidas acima de 1,45 e ANOVA com valor de p menor que 0,05.

Para os *spots* diferencialmente expressos foi calculada uma porcentagem de seu volume e a comparação desses valores indicou a diferença de expressão entre os tratamentos.

Tripsinização da amostra proteica

A tripsinização foi realizada segundo o protocolo de Shevchenko et al. (2006), com algumas modificações. Os *spots* correspondentes às proteínas diferencialmente expressas foram retirados dos géis com auxílio de uma ponteira de 1000µL, estéril, com a ponta cortada. Para remoção dos corantes, os pedaços de gel contendo as proteínas foram lavados duas vezes com solução de acetonitrila 50% / bicarbonato de amônio 25 mM e outra lavagem com solução de metanol 50% / bicarbonato de amônio 25 mM sendo que a primeira foi *overnight* e as demais por 1 h no dia seguinte. As lavagens foram realizadas à temperatura ambiente a 750 rpm no aparelho *Thermomixer digital Comfort* (Eppendorf).

A seguir, a solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila por 5 min duas vezes e secos em *Speed Vac Concentrator Plus (Eppendorf)* por 15 min. As proteínas foram, então, reduzidas com DTT a 25 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min a 56 °C, em *Thermomixer*, a 500 rpm. Após esta etapa, as proteínas foram alquiladas com iodoacetamida a 75 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min, à temperatura ambiente, na ausência de luz, e incubadas em *Thermomixer* a 500 rpm. Sequencialmente, os pedaços de gel foram, por duas vezes, lavados em bicarbonato de amônio a 100 mM por 10 min, desidratados em acetonitrila por 5 min e após uma etapa adicional de desidratação, secos em *Speed Vac* por 15 min.

Para a etapa de digestão enzimática os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (25 ng/μL) em solução de bicarbonato de amônio 40 mM / acetonitrila 10%. A tripsina utilizada foi a *Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade, Promega V5280*. Foram aplicados 20 μL de solução de clivagem de forma a cobrir os pedaços de gel e as amostras permaneceram em banho de gelo durante 45 min para que a enzima pudesse penetrar no gel sem que se iniciasse a digestão. Após este período, 50 μL da solução de bicarbonato de amônio 40 mM / acetonitrila 10% foram adicionados a cada amostra. As amostras foram, então, incubadas a 37 °C por 16 h sob agitação a 500 rpm.

Após a digestão, os pedaços de gel foram submetidos a banho ultrassom por 10 min, agitados a 1500 rpm por 2 min e toda a solução do tubo foi removida para um novo tubo. Com a finalidade de recuperar o maior número de fragmentos trípticos, a cada pedaço de gel restante foram adicionados 40 μL da solução de ácido fórmico 5% / acetonitrila 50% e 40 μL da solução de ácido fórmico 5% / metanol 60%, em duas etapas sequenciais. As amostras foram submetidas a agitação a 1500 rpm por 2 min, incubados por 15 min em repouso a temperatura ambiente, 10 min no banho ultrassom e novamente submetidas a agitação a 1500 rpm por 2 min. Em cada passo toda a solução foi removida e juntada à solução do tubo novo.

Após essas etapas toda a solução foi totalmente evaporada em *Speed Vac* e os tubos contendo os peptídeos trípticos foram ressuspensos em 5 μL de solução contendo acetonitrila 60% / TFA 0,1% . As amostras que apresentaram uma grande quantidade de sal foram dessalinizadas em coluna de hidrofobicidade C18 (*Zip Tip*) da marca *Eppendorf* seguindo as recomendações do fabricante.

Espectrometria de massa

A identificação de proteínas foi realizada utilizando um espectrômetro de massa do tipo AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (*Applied Biosystem*) disponibilizado pelo Núcleo de Proteoma do Laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ).

Alíquotas de 0,3 µL de cada amostra contendo os peptídeos trípticos foram aplicadas sobre uma placa de aço, juntamente com a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxil-cinamico (Sigma), numa proporção 1:1. Após a cristalização a placa foi inserida no espectrômetro e a análise iniciada. Para a ionização dos peptídeos utilizou-se a técnica de MALDI e o método de detecção do tipo TOF/TOF. O equipamento foi operado no modo positivo e com o refletor ativado. Após a obtenção das massas dos fragmentos tripticos, os quinze peptídeos mais intensos foram automaticamente selecionados e submetidos à análise por MS/MS. Para a fragmentação dos peptídeos usou-se o método do decaimento pós-fonte (*post-source decay*).

Identificação de proteínas por espectrometria de massa

A identificação das proteínas foi realizada por meio dos dados de MS/MS *ion search* confrontando-os com sequências obtidas das proteínas presentes nos bancos de dados com auxílio do *software* Mascot versão 2.2.07 (Matrix Science, 2012). As pesquisas foram realizadas nos bancos de dados públicos do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e *Phytzome*. Nesse último banco se encontram as sequências obtidas pelo sequenciamento do genoma da soja (*Glycine max*) (Phytzome, 2012).

Os parâmetros utilizados para a busca das proteínas foram: peptídeos com até dois sítios de clivagem perdidos; erro de 0,1 Da para identificação de peptídeos; como modificações variáveis escolheu-se carbamidometilação dos resíduos de cisteína, oxidação dos resíduos de metionina e deaminação dos resíduos de asparagina e glutamina.

Após a identificação das proteínas foi realizada a validação das mesmas pelo *software* Scaffold (Proteome Software).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram detectados 36 *spots* diferencialmente expressos nos géis bidimensionais de raiz de soja do genótipo Conquista pela inoculação com *M. javanica* nos diferentes tempos avaliados 12, 24, 48 e 96 h após a inoculação (h.a.i.). Destes, 21 puderam ser identificados por MS/MS. No tempo 12 h.a.i. foram encontrados 11 *spots*, sendo que seis deles foram identificados. No tempo 24 h.a.i. foram detectados 15 *spots* diferencialmente expressos, sendo que 10 deles foram identificados. Cinco *spots* foram detectados 48 h.a.i. e quatro foram identificados. No tempo 96 h.a.i. foram identificados cinco *spots* e apenas um foi identificado.

Os 21 *spots* identificados corresponderam a 12 proteínas diferencialmente expressas (Tabela 1), uma vez que foram detectados alguns *spots* em posições correspondentes dos géis em tempos diferentes de inoculação, além de terem sido encontradas isoformas de uma mesma proteína representada por mais de um *spot* num mesmo gel.

A identificação das proteínas foi realizada pelo auxílio do *software* Mascot que apresentou valores de escores significativamente acima do limite mínimo de confiabilidade (dados não mostrados) e foram confirmadas pelo *software* Scaffold com pelo menos 98% de probabilidade, indicando alta confiabilidade na identificação das proteínas.

Na Tabela 1 estão apresentadas as proteínas diferencialmente expressas em resposta à inoculação com *Meloidogyne javanica*, com o seu respectivo match ID (que é o número de identificação da proteína disponibilizado pelo *software* Image Master III), tempo de inoculação em que a proteína foi identificada, médias da % de volume de *spots* de plantas inoculadas e não inoculadas associadas ao desvio padrão, e os níveis de expressão de cada proteína.

Tabela 1. Nível de expressão relativa das proteínas baseada na média da % de volume das plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI).

Proteína	Match ID	Tempo (h.a.i.)	Média da % de volume ± DP		Nível de expressão
			I	NI	
Ascorbato peroxidase 2	68	12	0,3525 ± 0,0273	0,1813 ± 0,0250	+ 1,94
Cafeoil-CoA metiltransferase	91	12	0,4149 ± 0,0480	0,1838 ± 0,0398	+ 2,29
Cafeoil-CoA metiltransferase	90	24	0,2341 ± 0,0091	0,4215 ± 0,0623	- 1,80
Triose fosfato isomerase	60	12	0,4642 ± 0,0541	0,2729 ± 0,0588	+ 1,71
Triose fosfato isomerase	75	24	0,0859 ± 0,0074	0,1992 ± 0,0455	- 2,32
Precursor da glicoproteína do caule 31 kDa	79	12	0,4943 ± 0,0646	0,2125 ± 0,0416	+ 2,32
Precursor da glicoproteína do caule 31 kDa	83	24	0,1775 ± 0,0605	0,0606 ± 0,0179	+ 2,93
UTP-glicose-1-fosfato uridiltransferase	301	12	0,2614 ± 0,0439	0,1241 ± 0,0224	+ 2,11
Proteína induzida por estresse - SAM22	16	12	0,2997 ± 0,0417	0,1483 ± 0,0320	+ 2,02
Anexina	404	24	0,1056 ± 0,0267	ND	NA
Flavoproteína wrbA	64	24	0,6593 ± 0,0948	0,3332 ± 0,0192	+ 1,98
Lipoxigenase	297	24	0,0808 ± 0,0035	0,3189 ± 0,0844	- 3,95
Proteína relacionada a maturação	83	24	0,1775 ± 0,0605	0,0572 ± 0,0122	+ 3,1
Glutamina sintetase beta1	220	48	0,2535 ± 0,0021	0,4085 ± 0,0099	-1,61
Glutamina sintetase beta1	221	48	0,4835 ± 0,0136	0,8328 ± 0,0906	- 1,72
Glutamina sintetase beta1	222	48	0,3499 ± 0,0391	0,6683 ± 0,0693	- 1,91
Actina	188	24	0,3361 ± 0,04127	0,1953 ± 0,0094	+ 1,72
Actina	189	24	0,3342 ± 0,0463	0,1911 ± 0,0055	+ 1,75
Actina	190	24	0,2773 ± 0,0352	0,13674 ± 0,0168	+ 2,00
Actina	224	48	0,1226 ± 0,0211	0,2450 ± 0,0258	- 2,00
Actina	484	96	0,1239 ± 0,0097	0,2370 ± 0,0107	- 1,91

Os sinais (+) e (-) indicam aumento e diminuição na expressão da proteína em resposta à inoculação de *Meloidogyne javanica*, respectivamente.
DP = desvio padrão, ND = não detectado, NA = não aplicável.

Nas Figuras 1, 2, 3 e 4 são mostradas imagens dos géis referentes aos tempos 12, 24, 48 e 96 h.a.i., respectivamente. Também estão mostrados os respectivos géis controles de plantas não inoculadas. Os *spots* evidenciados foram analisados por MS/MS e estão identificados pelo Match ID.

Na Tabela 2 são mostradas as proteínas diferencialmente expressas em resposta à inoculação com *Meloidogyne javanica*.

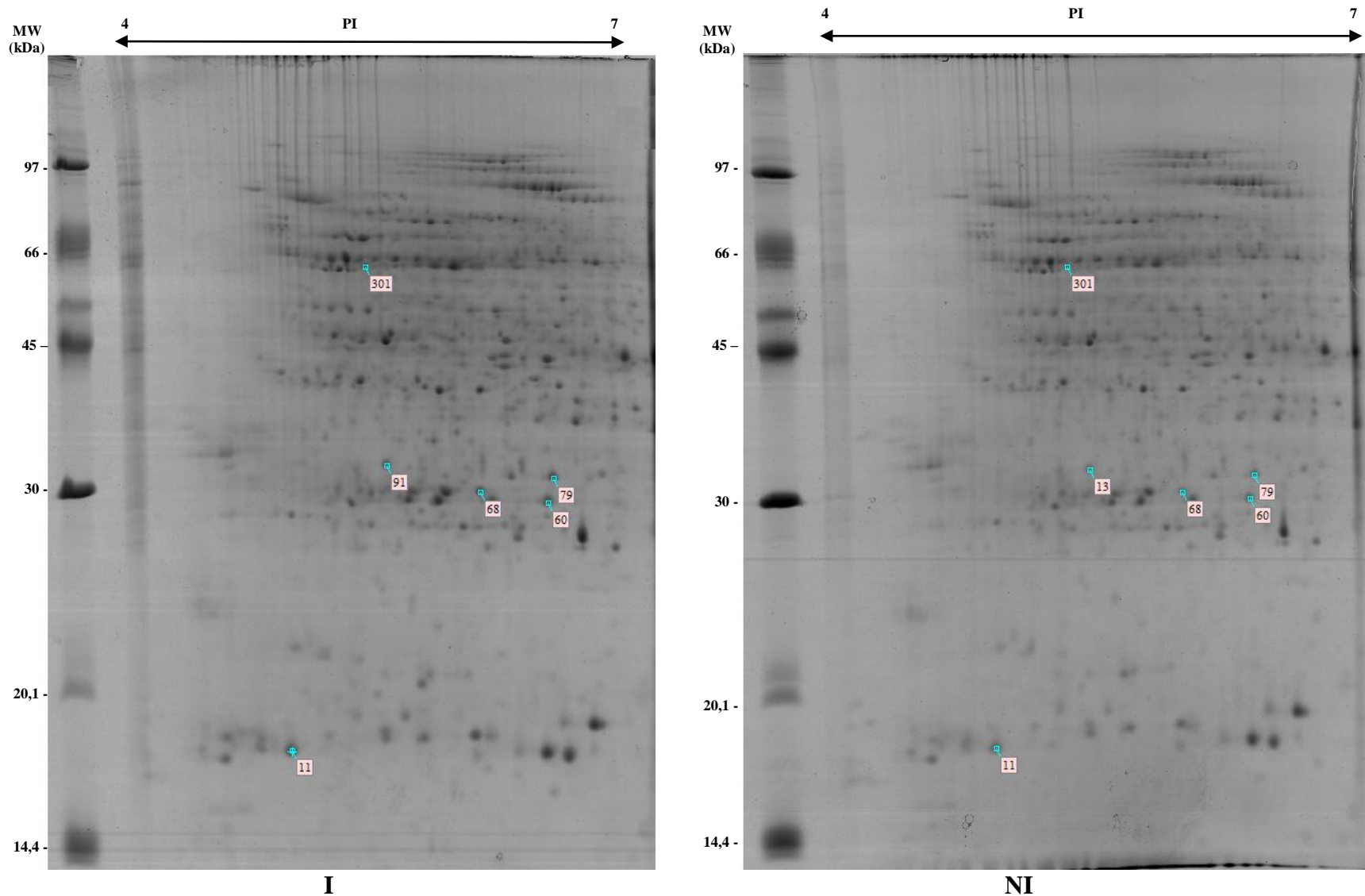


Figura 1: Perfil de proteínas de raízes de soja em resposta à inoculação por *Meloidogyne javanica* após 12 horas de inoculação obtidos por eletroforese bidimensional de plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI). Cerca de 500 µg de proteínas foram usados para análise 2-DE com tiras IPG de 13 cm (pH 4-7). Os géis foram visualizados com *Coomassie brilliant blue*. Os spots evidenciados diferencialmente expressos estão identificados pelo número Match ID. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

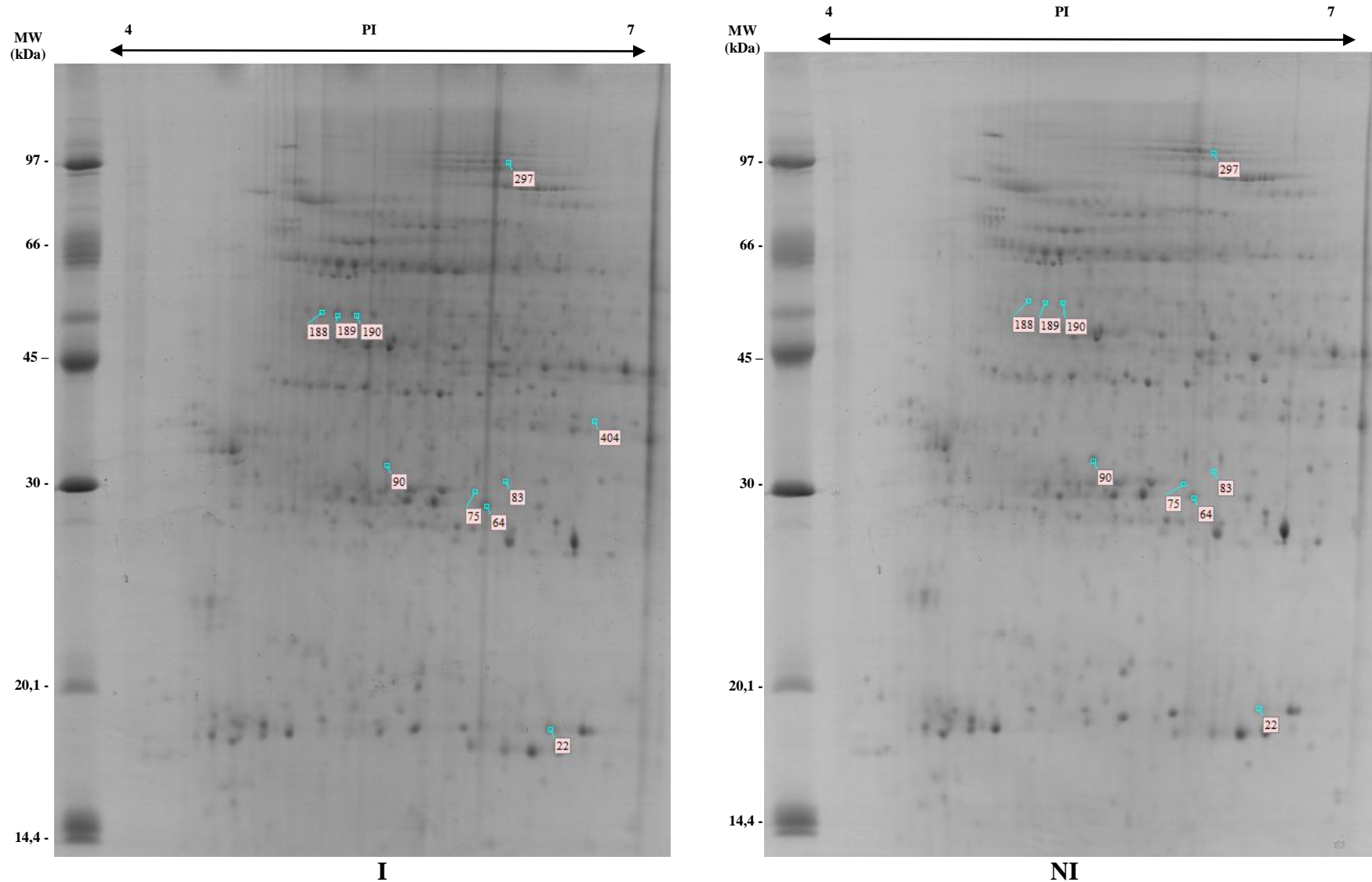


Figura 2: Perfil de proteínas de raízes de soja em resposta à inoculação por *Meloidogyne javanica* após 24 horas de inoculação obtidos por eletroforese bidimensional de plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI). Cerca de 500 µg de proteínas foram usados para análise 2-DE com tiras IPG de 13 cm (pH 4-7). Os géis foram visualizados com *Coomassie brilliant blue*. Os spots evidenciados diferencialmente expressos estão identificados pelo número Match ID. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

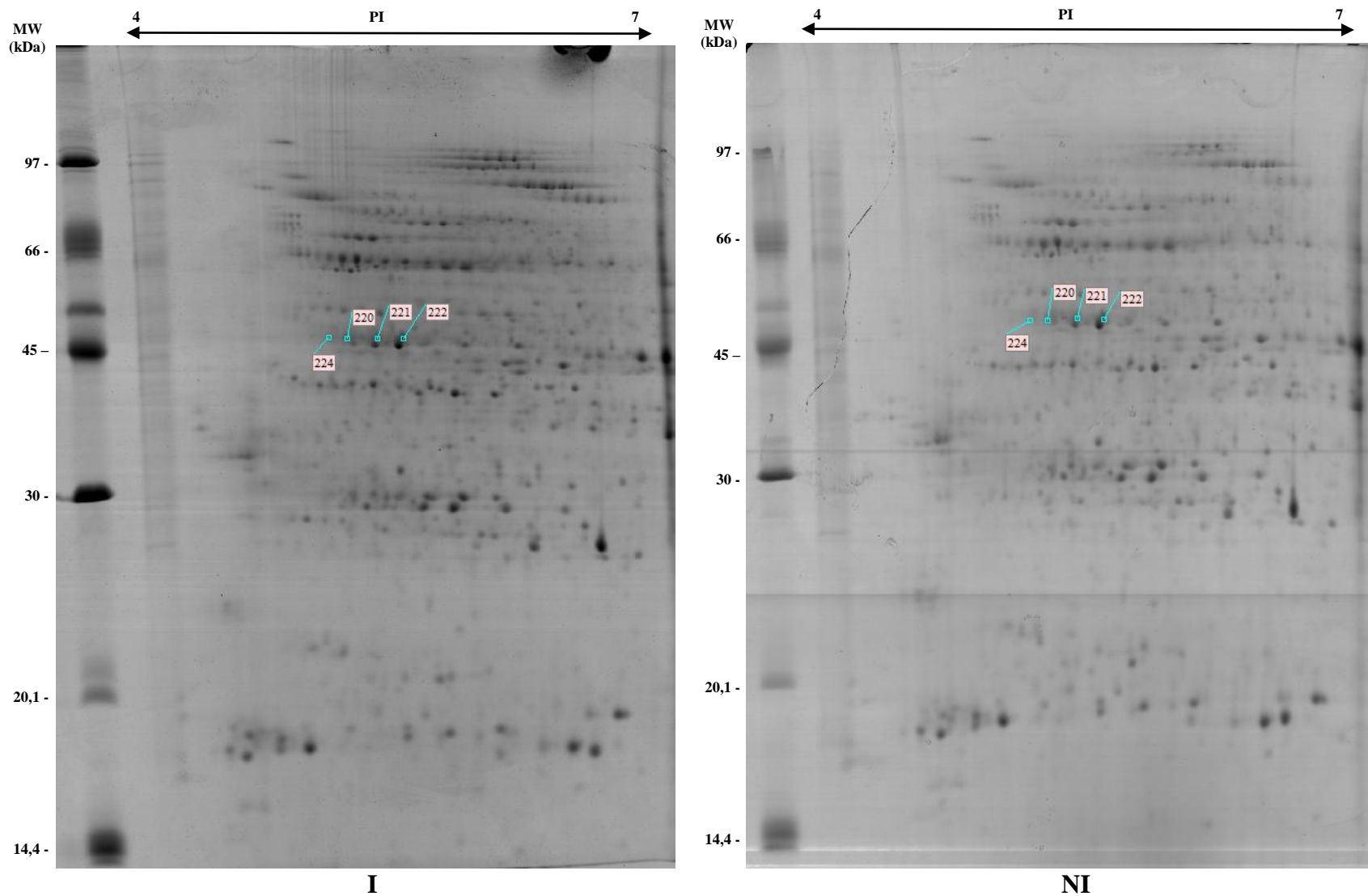


Figura 3: Perfil de proteínas de raízes de soja em resposta à inoculação por *Meloidogyne javanica* após 48 horas de inoculação obtidos por eletroforese bidimensional de plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI). Cerca de 500 µg de proteínas foram usados para análise 2-DE com tiras IPG de 13 cm (pH 4-7). Os géis foram visualizados com *Coomassie brilliant blue*. Os spots evidenciados diferencialmente expressos estão identificados pelo número Match ID. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

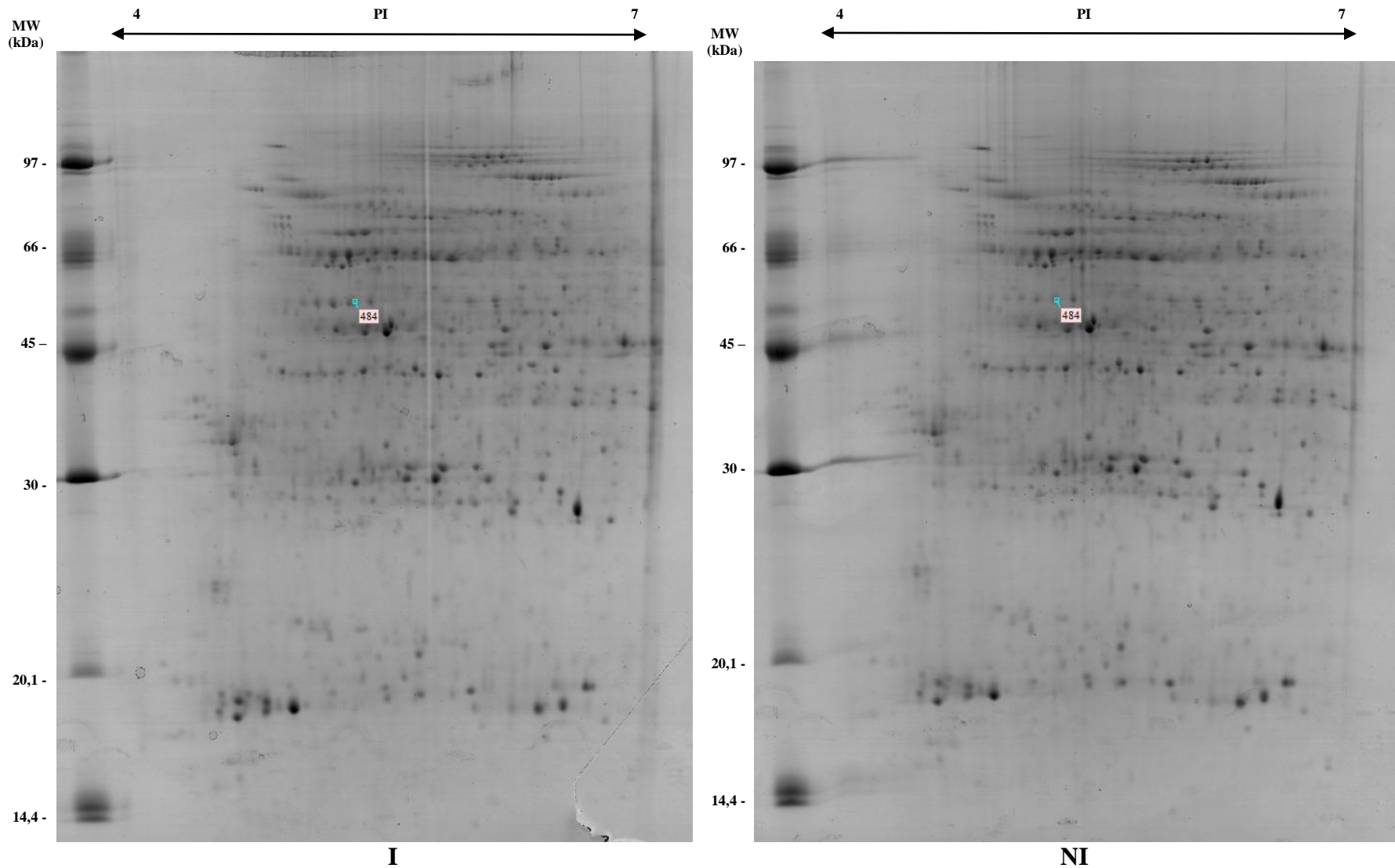


Figura 4: Perfil de proteínas de raízes de soja em resposta à inoculação por *Meloidogyne javanica* após 96 horas de inoculação obtidos por eletroforese bidimensional de plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI). Cerca de 500 µg de proteínas foram usados para análise 2-DE com tiras IPG de 13 cm (pH 4-7). Os géis foram visualizados com *Coomassie brilliant blue*. Os spots evidenciados diferencialmente expressos estão identificados pelo número Match ID. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

Tabela 2. Proteínas diferencialmente expressas em raízes de soja em resposta à inoculação com *Meloidogyne javanica* identificadas por espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF.

Proteína ¹	Match ID/ Tempo	Espécie	Acesso (GI) ²	E value	PI / MW		Cobertura ³ (%)	Peptídeos identificados
					Experimental	Teórico		
Ascorbato peroxidase 2	68/12h	<i>Glycine max</i>	351726325	5 e ⁻¹⁵⁵	5,92 / 30.111	5,65 / 27.109	20	ALLSDPVRPLVEK HPSELAHGANNGLDIAVR YASDEDAFFADYAEAHQK
Cafeoil-CoA metiltransferase*	91/12h	<i>Glycine max</i>	356521520	4 e ⁻¹⁷⁸	5,37 / 32.319	5,46 / 28.053	23	ENYELGLPVIK SLLQSDALYQYILETSVYPR VGGVIGYDNTLWNGSVVAPPDAPLR VGGVIGYDNTLWnGSVVAPPDAPLRK
Cafeoil-CoA metiltransferase*	90/24h	<i>Glycine max</i>	356521519	4 e ⁻¹⁷⁸	5,64 / 41.575	5,55 / 27.981	35	DFVLELNK ENYELGLPVIK NHGSYDFIFVDADKDNLYLNYHK SLLQSDALYQYILETSVYPR VGGVIGYDNTLWNGSVVAPPDAPLR
Triose fosfato isomerase*	60/ 12h	<i>Glycine max</i>	77540216	5 e ⁻¹³⁰	6,3 / 31.170	6,66 / 24.143	16	FFVGGNWK VATPAQAQEVHADLR VATPAQAqEVHADLRK WVHDNVSAEVAASVR
Triose fosfato isomerase*	75/24h	<i>Glycine max</i>	77540216	5 e ⁻¹³⁰	5,96 / 29.747	6,66 / 24.143	24	FFVGGNWK KFFVGGNWK qLLNESNEFVGDK VAYALQQGLK VIAcIGETLEQR WVHDNVSAEVAASVR
Precursor da glicoproteína do caule 31 kDa*	79/12h	<i>Glycine max</i>	359806656	1 e ⁻¹⁷⁷	6,35 / 31170	6,72 / 29.262	28	AGFHTWEQLIK DYInGEQFR IVGIIGDQWSDLLGDHR LPNPmYYIE TIPEEcVEPTKDYInGEQFR TVNQQAFFYASER

Proteína ¹	Match ID/ Tempo	Espécie	Acesso (GI) ²	E value	PI / MW		Cobertura ³ (%)	Peptídeos identificados
					Experimental	Teórico		
Precursor da glicoproteína do caule 31 kDa*	83/24h	<i>Glycine max</i>	359806656	1 e ⁻¹⁷⁷	6,14 / 30.708	6,72/29.262	20	IVGIIGDQWSDLLGDHR TIPEEcVEPTKDYInGEQFR TVNQQAFFYASER
UTP-glicose-1-fosfato uridiltransferase	301/12h	<i>Glycine max</i>	356539785	0.0	5,24 / 61.105	5,32 / 51.927	28	ANPENPSIELGPEFK ATSDLLLVQSDLYTLQDGLVIR LVVDDFLPFPSK NSNIEHTFNQSQYPR SIPSIVELDSLK VAGDVWFGAGVILK VLQLETAAGAAIR VQLLEIAQVPDEHVSEFK YLSGEAQHVEWSK
Proteína induzida por estresse - SAM22	16/24h	<i>Glycine max</i>	351724557	5 e ⁻⁹⁸	4,90 / 17.940	4,93 / 16.747	21	AVEAYLLANPHYN GIFTFEDETTSPVAPATLYK
Anexina	404/24	<i>Medicago truncatula</i>	357489617	0.0	6,64 / 37.138	6,48 / 35.901	28	ADPKDEFSLLLR AFSGWGTNEELIVSILAHR AYNDDDFIR LILPLVSSYR LVHLWTLDSAER SSEQLFAAR VPqPLPPVADDcEQLR VPQPLPPVADDcEqLRK
Flavoproteína wrbA	64/24	<i>Glycine max</i>	356554929	2 e ⁻¹⁴⁵	6,03 / 28.878	6,43 / 21.685	20	AFFDATGGLWR GGSPYGAGTYAGDGSR VYIVYYSTYGHVEK
Lipoxigenase	297/24	<i>Glycine max</i>	126411	0.0	6,15 / 99.058	5,78 / 96.757	5	HASDEIYLGER LFILDYQDAFIPYLTR
Proteína relacionada a maturação	83/24h	<i>Glycine max</i>	351724283	1 e ⁻⁹⁰	6,40 / 18.592	6,29 / 21.495	40	ATtLESIESIDEQNK HWTYTIDGK LAEEVDPPYGYIEYLHK LHQGEDWHHNETVK WFNLFATQLHHVQNLTR

Proteína ¹	Match ID/ Tempo	Espécie	Acesso (GI) ²	E value	PI / MW		Cobertura ³ (%)	Peptídeos identificados
					Experimental	Teórico		
Glutamina sintetase beta 1*	220/48h	<i>Glycine max</i>	10946357	0.0	5,20 / 47.532	5,48 / 38.967	4	HKEHIAAYGEGNER GnNILVIcDAYTPAGEPIPTNKR HETADINTFLWGVANR
Glutamina sintetase beta 1*	221/48h	<i>Glycine max</i>	10946357	0.0	5,51 / 47.701	5,48 / 38.967	4	EHIAAYGEGNER GnNILVIcDAYTPAGEPIPTNKR HKEHIAAYGEGNER
Glutamina sintetase beta 1*	222/48h	<i>Glycine max</i>	10946357	0.0	5.36 / 47.912	5,48 / 38.967	15	GnNILVIcDAYTPAGEPIPTNKR HETADINTFLWGVANR HKEHIAAYGEGNER
Actina*	188/24h	<i>Glycine max</i>	3565690		5,2 / 53.259	5,23/41.808	23	AEYDESGPSIVHR IWHHTFYNELR LSYIALDYEQELETAR TTGIVLDSDGDVSHTPVIYEGYALPHAILR VAPEEHPVLLTEAPLNPK
Actina*	189/24h	<i>Glycine max</i>	3565690	0.0	5,08 / 53.745	5,23/41.808	15	AEYDESGPSIVHR IWHHTFYNELR LSYIALDYEQELETAR VAPEEHPVLLTEAPLNPK
Actina*	190/24h	<i>Glycine max</i>	3565690	0.0	5,16 / 53.359	5,23/41.808	12	IWHHTFYNELR LSYIALDYEQELETAR VAPEEHPVLLTEAPLNPK
Actina*	224/48h	<i>Glycine max</i>	35656901	0,0	5,10 / 47.698	5,23/41.808	12	IWHHTFYNELR SYELPDGQVITIGSER VAPEEHPVLLTEAPLNPK
Actina*	484/96h	<i>Glycine max</i>	35656901	0,0	4,99 / 47.704	5,23 / 41.808	15	AEYDESGPSIVHR IWHHTFYNELR LSYIALDYEQELETAR VAPEEHPVLLTEAPLNPK

1 Todas as proteínas tiveram uma confirmação de pelo menos 98% de certeza no *software* Scaffold (Proteome Software, Inc., Portland, OR).

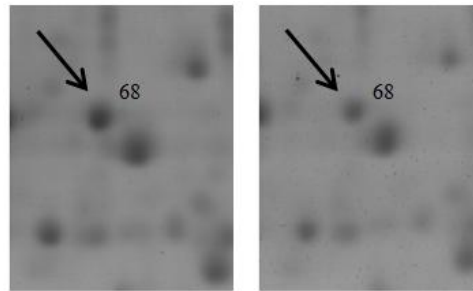
2 GenInfo Identifier (GI) - número de acesso ao no GenBank – NCBI.

3 Porcentagem obtida no *software* Scaffold (Proteome Software, Inc., Portland, OR).

* Indicação da presença de diferentes tipos de isoformas.

Na Figura 5 estão evidenciadas as imagens ampliadas dos *spots* referentes às proteínas diferencialmente expressas em resposta à inoculação com *Meloidogyne javanica*.

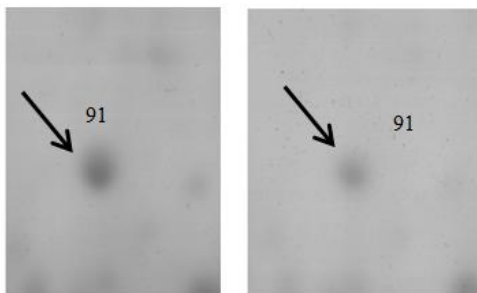
A - Ascorbato Peroxidase 2



I (12 h.a.i.)

NI

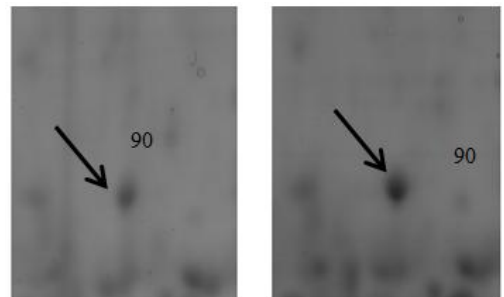
B - Cafeoil-CoA metiltransferase



I (12 h.a.i.)

NI

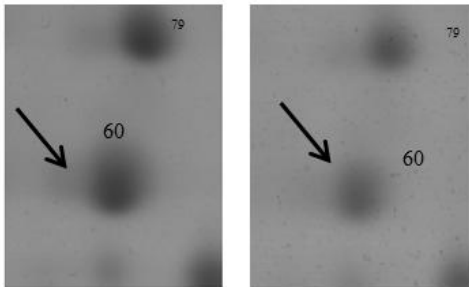
B - Cafeoil-CoA metiltransferase



I (24 h.a.i.)

NI

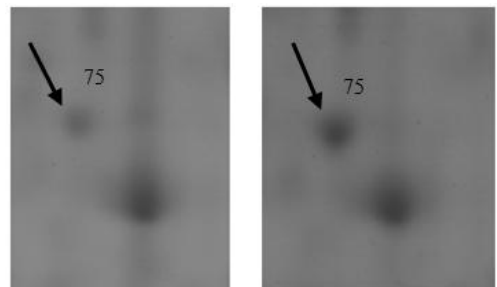
C- Triose fosfato isomerase



I (12 h.a.i.)

NI

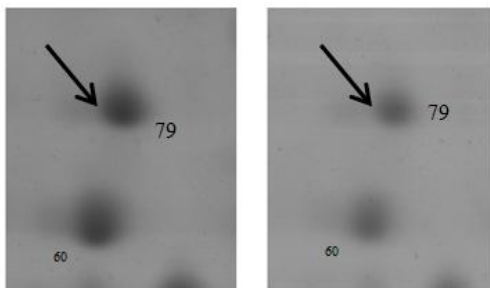
C- Triose fosfato isomerase



I (24 h.a.i.)

NI

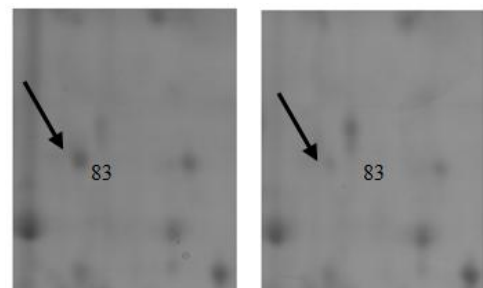
D - Precursor da glicoproteína do caule de 31 kDa



I (12 h.a.i.)

NI

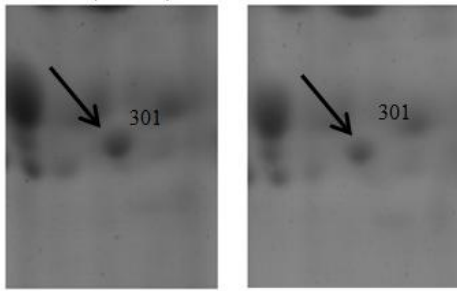
D - Precursor da glicoproteína do caule de 31 kDa



I (24 h.a.i.)

NI

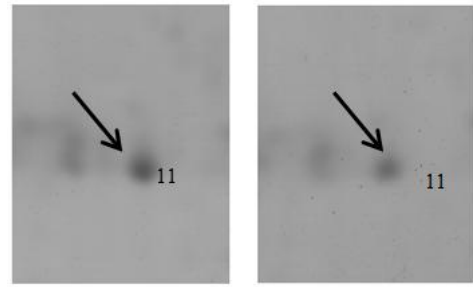
E - UTP-glicose-1-fosfato uridiltransferase



I (12 h.a.i.)

NI

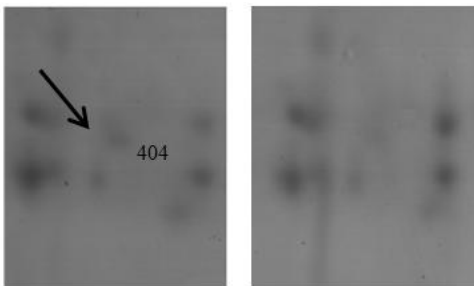
F - Proteína induzida por estresse - SAM22



I (24 h.a.i.)

NI

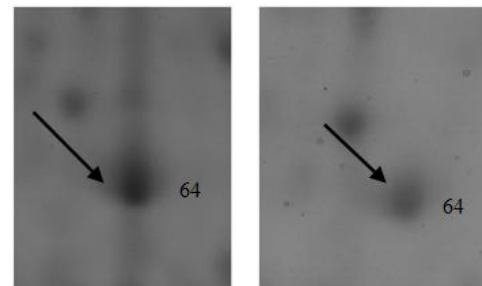
G - Anexina



I (24 h.a.i.)

NI

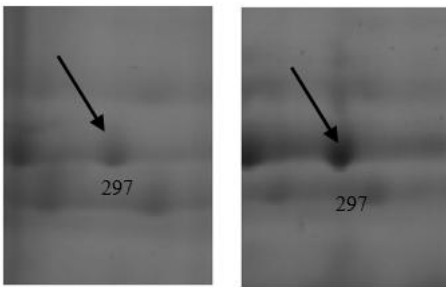
H - Flavoproteína wrbA



I (24 h.a.i.)

NI

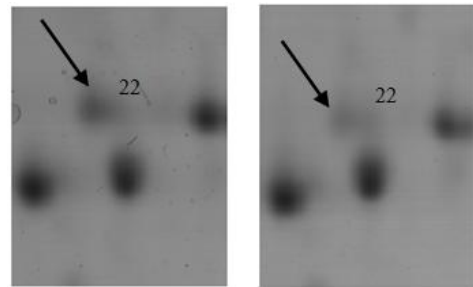
I - Lipoxigenase



I (24 h.a.i.)

NI

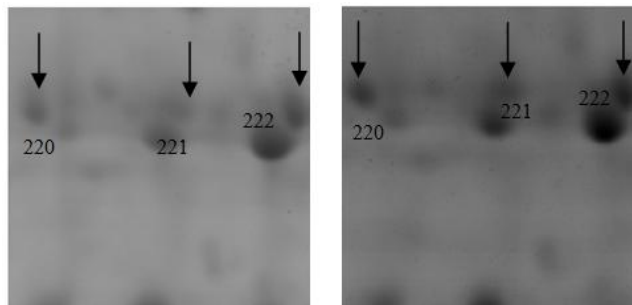
J - Proteína Relacionada à Maturação



I (24 h.a.i.)

NI

K - Glutamina sintetase GS beta1



I (48 h.a.i.)

NI

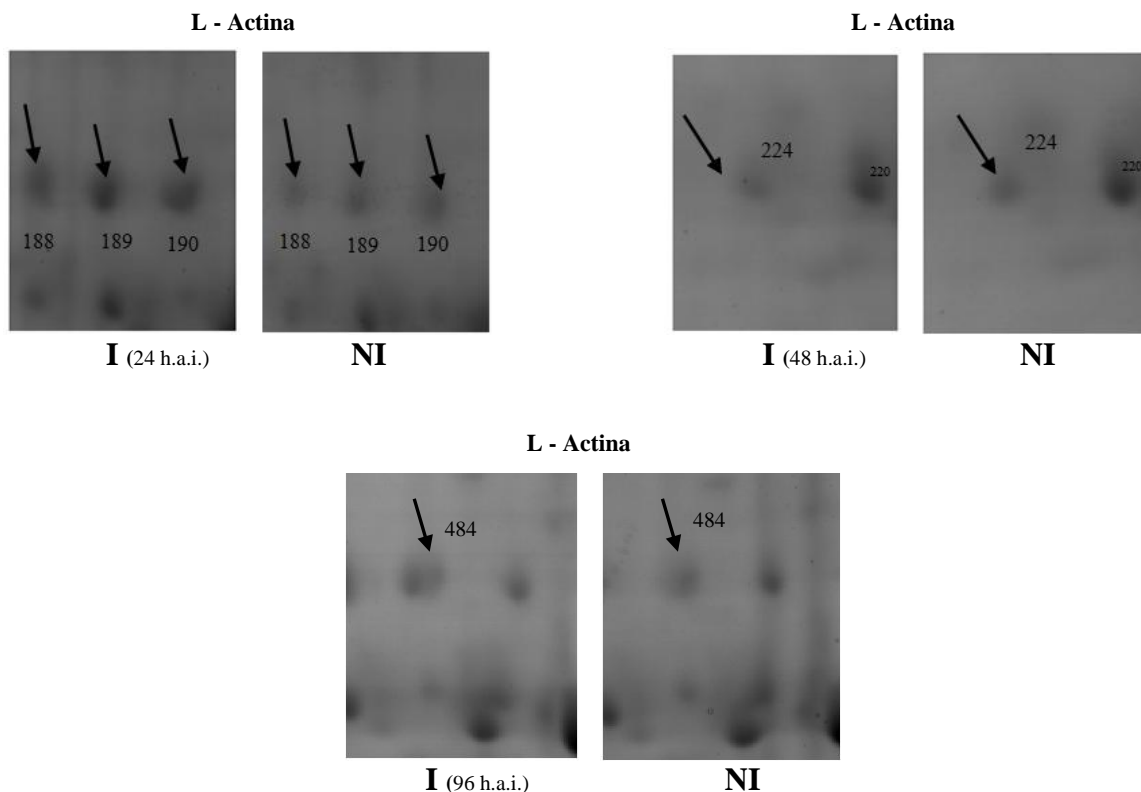


Figura 5. *Spots* diferencialmente expressos no genótipo Conquista inoculado (I) com *Meloidogyne javanica* em comparação com o não inoculado (NI). **A**, Ascorbato peroxidase 2; **B**, Cafeoil-CoA metiltransferase; **C**, Triose fosfato isomerase; **D**, Precursor da glicoproteína do caule de 31 kDa; **E**, UTP-glicose-1-fosfato uridiltransferase; **F**, Proteína induzida por estresse - SAM22; **G**, Anexina; **H**, Flavoproteína wrbA; **I**, Lipoxigenase; **J**, Proteína relacionada a maturação; **K**, Glutamina sintetase GS beta1; **L**, Actina.

Proteínas diferencialmente expressas em resposta à inoculação com *Meloidogyne javanica*

Ascorbato peroxidase 2

A ascorbato peroxidase (APx) foi diferencialmente expressa 12 h.a.i., tendo um aumento de expressão nas plantas inoculadas com o patógeno quando comparadas com plantas controles não inoculadas (Tabela 1 e Figura 5A). Esta enzima engloba uma família de isoenzimas de peroxidases com diferentes características e é uma das principais enzimas do sistema de detoxificação de espécies reativas de oxigênio nas plantas, catalisando a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água, usando o ascorbato como doador de elétrons (Guzzo; Harakava, 2007). Elas são responsáveis pela remoção dessa espécie reativa de oxigênio em locais inacessíveis à catalase, como nos cloroplastos (Polle 2001).

As isoenzimas APx são distribuídas em quatro compartimentos celulares distintos e são classificadas de acordo com a localização subcelular em citosólicas (APx1 e APx2), peroxissomais (APx3 e APx4), mitocondriais (APx5 e APx6) e cloroplastídicas (APx7 e APx8).

Na sinalização para respostas de defesa da planta ao patógeno, o H_2O_2 é o candidato mais atrativo dentre as espécies reativas de oxigênio, por causa da sua vida relativamente longa e alta permeabilidade através das membranas. Por não possuir elétron pareado, ele pode atravessar as membranas biológicas mais rapidamente que as espécies O_2^- . Desse modo, após o reconhecimento do patógeno seguido da explosão oxidativa e seus intermediários reativos, ocorre indução de genes de defesa e morte celular, onde o H_2O_2 age como um sinalizador para indução de genes de proteção celular nas células vizinhas restringindo o desenvolvimento da lesão em função da resposta de hipersensibilidade (HR), que é, então, acompanhada pelo desenvolvimento de uma resistência sistêmica adquirida (SAR) (Resende et al., 2003). Dessa forma, a APx está envolvida nos mecanismos de proteção da célula vegetal contra os danos provocados pelo estresse oxidativo, minimizando os efeitos tóxicos desses compostos.

Já é bem documentado que as peroxidases tem a sua expressão aumentada durante a interação planta-patógeno (Do et al., 2003). Em trabalhos que utilizaram a proteômica para investigar proteínas envolvidas em mecanismos de defesa em soja, foram encontrados resultados semelhantes por Zhang et al. (2011) e por Fan et al. (2012) em que plantas desafiadas com *Phytophthora sojae* e lagartas *Prodenia litura*, respectivamente.

O aumento da atividade de APx também foi verificada em resposta a estresses ambientais como salinidade, frio, intoxicação por metais, seca, calor, ozônio e alta intensidade luminosa em diferente culturas (Yoshimura et al., 2000; Mittova et al., 2004; Sharma; Dubey, 2004), indicando que as diferentes isoenzimas desempenham papel importante na detoxificação de espécies reativas de oxigênio produzidas em diferentes condições de estresses.

Cafeoil-CoA metiltransferase

A enzima Cafeoil-CoA metiltransferase (CCoOMT) foi mais expressa nas plantas inoculadas 12 h.a.i e menos expressa 24 h.a.i. em comparação com plantas controles não inoculadas (Tabela 1 e Figura 5B). Esta enzima está envolvida na biossíntese de lignina,

catalisando a metilação dos ésteres cafeoil CoA e 5-hidroxiferuloil CoA a feruloil CoA e sinapoil CoA respectivamente (Figura 6) que são reações intermediárias no processo da biossíntese da lignina (Ferrer et al., 2005).

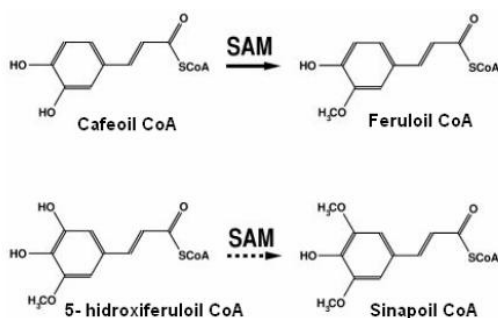


Figura 6. Reações catalisadas pela CCoOMT, tendo como substratos os tioésteres cafeoil e 5-hidroxiferuloil CoA. A seta pontilhada enfatiza a possível seletividade de substrato. SAM (S-adenosil L metionina) é o doador do grupo metil em ambos os casos (Ferrer et al., 2005).

Esta enzima está diretamente relacionada com a função de defesa das plantas, sendo que seus produtos (feruloil CoA e sinapoil CoA) são utilizados no enrijecimento da parede celular. Em relações patógeno-hospedeiro incompatíveis, cafeoil-CoA metiltransferase é induzida poucas horas após a inoculação do patógeno causando reação de hipersensibilidade e morte celular programada. Busam et al. (1997) observaram que entre 12 a 15 horas após a exposição de suspensão de cultura de células de *Vitis vinifera* L. em meio fúngico encontrou-se a atividade máxima dessa enzima. No presente trabalho foi observado um aumento de expressão apenas no primeiro tempo avaliado (12 h.a.i). Em estudo de Liu et al. (2011) sobre a interação entre soja e o nematoide *Heterodera glycines* foi observado que essa enzima foi induzida. Os autores utilizaram a proteômica diferencial para identificação das proteínas e afirmam que a cafeoil-CoA-metiltransferase esteja relacionada com a resistência ao nematoide de cisto da soja.

No segundo tempo avaliado (24 h.a.i) verificou-se a diminuição da expressão dessa enzima, sugerindo uma redução da lignificação da parede celular que podem ser explicadas em função de diversos fatores. Sabe-se que a lignificação representa um mecanismo de defesa que implica em grande investimento de fotoassimilados, que por sua vez, não apresentam retorno ao metabolismo para serem reutilizados em outros processos, como acontece com outros compostos de defesa da planta, como fenóis, quinonas, enzimas hidrolíticas, etc., considerados menos dispendiosos para as plantas (Coley et al., 1985). Outro aspecto é o fato de uma unidade de lignina ser extremamente complexa e demandar uma grande atividade metabólica para sua síntese, sendo necessário um grande número de

enzimas responsáveis por diferentes passos metabólicos o que significa demanda por nitrogênio e aminoácidos (Amthor, 2003).

A redução da expressão dessa enzima foi observada em estudo proteômico de soja quando a água foi retirada por dois dias no estágio de plântulas (Toorchi et al., 2009) e pela presença de salinidade (Sobhanian et al., 2010).

Triose fosfato isomerase

Em relação a expressão da proteína triose fosfato isomerase houve um aumento de expressão 12 h.a.i. e uma diminuição 24 h.a.i. nas plantas inoculadas em relação aos controles (Tabelas 1 e Figura 5C). Essa enzima pertence à classe das isomerases e subclasse das oxidoreduases intramoleculares (Knowles, 1991). Apresenta-se em sua forma ativa como homodímero, sendo responsável pela conversão reversível de diidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato. Esta reação está envolvida no processo de biossíntese de carboidratos, participando de vários processos metabólicos incluindo glicólise, gliconeogênese e ciclo de Calvin (Chen; Thelen, 2010). Essa enzima também está envolvida em respostas relacionadas a estresses e sua alteração foi relatada em condições de estresse biótico e abiótico (Campo et al., 2008; Yan et al., 2005; Riccardi et al., 1998; Morris; Djordjevic, 2001). A regulação da triose fosfato isomerase pode ser essencial para ativação de vias produtoras de energia.

Precursor da glicoproteína de 31 KDa do caule

Nesse trabalho, foi evidenciado o aumento da expressão do precursor da glicoproteína de 31 KDa do caule em plantas inoculadas 12 e 24 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5D). Essa proteína também é conhecida como proteína de reserva vegetativa (*vegetative storage protein* - VSP). Em folhas jovens de soja, antes do florescimento, estas proteínas perfazem um total de 15% das proteínas solúveis da folha e são consideradas reserva temporária de nitrogênio para a planta. Durante a formação da semente estas proteínas são degradadas para suprir a semente com o nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento (Wittenbach, 1983; Staswick, 1994). Em geral, elas são sujeitas a regulação por açúcares, luz, fosfato, nitrogênio, ferimento, auxinas e jasmonatos (Mason; Mullet, 1990; Mason et al., 1992; Berger et al., 1995).

Em relação a interação planta patógeno, a ativação das proteínas de armazenamento vegetativo pode ser correlacionada com o aumento dos níveis de ácido jasmônico e metil jasmonato em função do ataque de patógenos ou após algum ferimento (Benedetti et al., 1995; Devoto; Turner, 2005). O ácido jasmônico é um hormônio vegetal produzido cuja via sintética se inicia a partir do ácido linolênico. Em plantas, o ácido jasmônico tem como função inibir a divisão celular, inibir o crescimento da raiz e induzir a senescência foliar. Outra função é um aumento na expressão de alguns genes relacionados a estresses abióticos como seca e salinidade (Gong et al., 2001) e também responsáveis pela ativação das defesas das plantas contra diversos patógenos (Cortês, 2000), principalmente em patógenos biotróficos obrigatórios (Pozo et al. 2005). Desta forma, essa proteína sendo mais expressa implica em maior produção de ácido jasmônico e ativação de mecanismos de defesa.

UTP-Glicose-1-Fosfato uridiltransferase

Essa enzima apresentou maior expressão 12 h.a.i em plantas inoculadas (Tabela 1 e Figura 5E). O nome mais usual dessa enzima é UGPase, mas também é conhecida como UDP-glicose pirofosforilase ou Glicose-1-Fosfato uridiltransferase. Ela catalisa a interconversão de α -D-Glicose1-fosfato em UDP-Glicose que é um composto chave na biossíntese de polissacarídeos. Em plantas, a UGPase existe na forma de monômeros de aproximadamente 50 KDa (Nakano et al., 1989) e apresenta-se predominantemente como proteína citosólica solúvel (Kleczowski, 1994).

A ampla distribuição desta enzima na natureza deve-se ao seu papel na síntese de numerosos compostos que requerem a UDP-glicose. A UGPase atua em diferentes vias metabólicas que envolvem a biogênese da parede celular. Os substratos utilizados para a síntese dos polissacarídeos da parede celular em plantas apresentam fortes indícios de que seja o açúcar UDP-glicose o principal substrato (Delmer; Haigler, 2002). Sendo comum o reforço da parede celular em função do processo de defesa de plantas a patógeno, é plausível o aumento da expressão dessa enzima.

Proteína induzida por estresse - SAM22

A proteína induzida por estresse - SAM22 foi mais expressa nas plantas inoculadas 24 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5F). Essa proteína é codificada pelo gene Gly m 4 e é relacionada a patogênese. Ela já foi identificada como alérgeno em 1992 após o surgimento

de similaridade de quase 50% da sequência aminoacídica com o alergeno Bet v 1, o qual é responsável por mais de 95% das doenças alérgicas na Europa e na América do Norte. Essa proteína se acumula predominantemente nas raízes de plântulas de soja, mas também está presente em altos níveis em raízes e folhas em senescência de plantas jovens. O acúmulo dessa proteína pode ser induzido por ferimentos, elicitores fúngicos, ou pela exposição do meio a ácido salicílico, peróxido de hidrogênio ou de fosfato de sódio (Crowell et al., 1992).

Vários trabalhos relacionados a interação entre soja e nematoide de cisto relataram a importância dessa proteína (Alkharouf et al., 2004; Kran et al., 2004, Klink; Matthews, 2009). Dessa forma, pode-se afirmar que essa proteína também é importante na interação entre a soja e o nematoide de galha *M. Javanica*.

Anexina

Essa proteína foi evidenciada apenas nas plantas inoculadas 24 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5G). Anexinas fazem parte de uma família multigênica que se ligam à membrana e são dependentes de cálcio. Estão presentes principalmente no citoplasma ou em membranas intracelulares (Kovács et al., 1998). As anexinas apresentam numerosas funções e participam de vários processos celulares essenciais, tais como tráfego da membrana, transporte de íon, sinalização mitótica, reorganização do citoesqueleto e replicação do DNA (Clark; Roux, 1995). Evidências experimentais sugerem que as anexinas estejam envolvidas em resposta a estresse oxidativo, agindo como peroxidases. Segundo Gorecka et al. (2005) estas proteínas eliminam H_2O_2 protegendo as células de estresse oxidativo e apoptose atuando como uma enzima antioxidante.

A anexina é importante para a integridade da membrana celular e sinalização celular, atuando, especialmente, em condições de estresse osmótico e salino, mantendo a integridade celular (Cantero et al., 2006; Gerke; Moss, 2001). Neste trabalho, ficou evidenciado que a anexina é importante no processo de defesa da soja em resposta a presença do patógeno, uma vez que ele esteve presente apenas em géis de plantas inoculadas.

Flavoproteínas wrbA

Flavoproteínas wrbA se apresentaram mais expressas 24 h.a.i. em plantas inoculadas (Tabela 1 e Figura 5H). Essa classe de proteínas formam uma nova família multimérica de proteínas semelhantes à flavodoxinas, que estão amplamente distribuídas em organismos vivos como bactérias, fungos e em plantas superiores (Grandori; Carey, 1994; Patridge; Ferry, 2006).

Estas proteínas foram identificadas como sendo tetraméricas com atividade oxidoreductase, realizando transporte de dois elétrons do NADH para quinonas utilizando como cofator a flavina mononucleótido (FMN) (Patridge; Ferry, 2006). Os membros da família WrbA participam no processo de proteção das células contra o estresse oxidativo, já que o ambiente intramitocondrial é altamente redutor, e vários componentes respiratórios, incluindo as flavoproteínas, são capazes de transferir elétrons para o oxigênio (Cadenas, 1995; Li et al., 1995). Uma vez que os mecanismos de interações planta-patógeno envolvem estresse oxidativo, o aumento na expressão dessa proteína nas plantas inoculadas é justificado. Liu et al. (2012) identificaram que essa proteína é mais expressa em gramíneas sob estresse salino.

Lipoxigenase

Foi evidenciado uma diminuição de 2,98 vezes nas plantas inoculadas 24 h.a.i. da enzima lipoxigenase quando comparada com o controle (Tabela 1 e Figura 5I). Essa enzima está envolvida diretamente na síntese de ácido jasmônico, sendo o nível de lipoxigenase regulado pelo ácido jasmônico e metil jasmonato (Bell; Mullet, 1991). Em plantas superiores as lipoxigenases metabolizam preferencialmente o ácido linoléico e linolênico. Uma das funções fisiológicas das lipoxigenases em plantas está relacionada com a síntese de inibidores de proteases em resposta a ferimentos causados por pragas e patógenos nos mecanismos bioquímicos de defesa da planta. A atividade de lipoxigenases aumenta durante interações incompatíveis em vários sistemas planta-patógeno (Rosahl, 1995). Contudo no presente estudo, houve uma diminuição dessa enzima.

Proteínas relacionadas com a maturação

Proteínas relacionadas com a maturação (*ripening related protein*) foram mais expressas 24 h.a.i. nas plantas inoculadas (Tabela 1 e Figura 5J). Essas proteínas estão

envolvidas nos processos de amadurecimento e maturação (Frenkel et al., 1968) e correlação entre os seus níveis e os de etileno foram relatadas por Kevany et al. (2007). Etileno leva o amadurecimento dos frutos mais precocemente em função da indução de proteínas relacionadas com essa via metabólica. Uma possível explicação para o aumento da expressão dessa proteína pode ser devido a um aumento na concentração de etileno sob a presença do patógeno. Resultados semelhantes foram encontrados por Curto et al. (2006) e por Die et al. (2007) em resposta a interação planta-parasita.

Glutamina sintetase beta1

Nos géis 2D analisados 48 h.a.i. a enzima glutamina sintetase (GS) beta1 teve sua expressão reduzida nas plantas inoculadas identificada em três *spots* diferenciadas (Tabelas 1 e Figura 5K), indicando serem isoformas dessa mesma proteína.

A GS é uma enzima crucial em plantas superiores envolvidas na assimilação de nitrogênio inorgânico (amônia) em forma orgânica (glutamina). Existem diferentes isoformas expressas em órgãos e em estágios de desenvolvimento específicos (Cren; Hirel, 1999; Ireland; Lea, 1999). Duas diferentes classes de GS foram encontradas em diferentes compartimentos subcelulares de angiospermas, sendo a classe GS1 encontrada no citosol e a GS2 no cloroplasto (Gómez-Maldonado et al., 2004).

GS2 é a isoforma predominante encontrado em células fotossintéticas do mesófilo foliar, onde desempenha um papel importante na assimilação de amônio derivado da redução de nitrato e da fotorrespiração e é codificada por um único gene nuclear. Ao contrário, a GS1 citosólica é a isoforma predominante em raízes e em tecidos não fotossintéticos e é codificada por uma família de genes cujos membros são expressos diferencialmente durante o desenvolvimento ou em resposta a diferentes estímulos externos, dando origem a um número variável de isoformas de GS1 como GS1a e GS1b (Lam et al., 1996; Ireland; Lea, 1999).

A redução no teor desta enzima sugere uma menor capacidade de assimilar amônio. Pageau et al. (2006) investigaram a expressão de GS em resposta aos hormônios etileno, ácido abscísico e jasmônico. Foi observado que esses hormônios promoviam expressão diferencial de dois tipos de GS, chamadas GS1 e GS2. Ora uma isoforma era expressa, ora outra, ora as duas eram expressas ou reprimidas. Portanto, a diminuição da GS pode ser atribuída à presença de hormônios reguladores da expressão dessa enzima.

Actina

Verificou-se aumento de expressão dessa proteína nas plantas inoculadas 24 h.a.i. e diminuição 48 e 96 h.a.i. Foram identificados cinco *spots* diferencialmente expressos sendo três nos géis no tempo 24 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5L), indicando serem isoformas dessa proteína.

As actinas vegetais são normalmente divididas em duas classes: as vegetativas, que são fortemente expressas em todos os órgãos vegetativos e tipos celulares e as reprodutoras, que são expressas predominantemente no pólen maduro, no óvulo e, em alguns casos, no embrião. Ambas as classes de actinas mostram diferentes padrões de expressão temporais e espaciais (Kandasamy et al., 2004). Essas proteínas participam em um grande número de processos celulares nas células vegetais na conversão de reações químicas em forças mecânicas como a reorganização do citoplasma vegetal em resposta a uma variedade de estímulos internos (Vantard; Blanchoin, 2002). Estudos recentes em plantas revelaram que hormônios como auxina e ABA, e sinalizadores como Ca^{2+} e cAMP disparam cascatas sinalizadoras usando a actina como um efetor.

CONCLUSÕES

1. A técnica utilizada mostrou-se eficaz para a identificação de proteínas diferencialmente expressas permitindo a verificação de alterações metabólicas em raízes de soja em resposta à infecção por *Meloidogyne javanica*.
2. Foram encontrados 36 *spots* diferencialmente expressos em raízes de soja, sendo 21 identificadas por espectrometria de massa, o que levou a identificação de 12 proteínas.
3. A resposta do hospedeiro ao processo infeccioso ocorreu principalmente nos primeiros tempos avaliados (12 e 24 h.a.i.).
4. A partir da análise do proteoma diferencial de raízes de soja inoculadas pelo nematoide de galha *M. javanica* foi possível a identificação de proteínas envolvidas no processo de defesa (ascorbato peroxidase, lipoxigenase e proteína induzida por estresse - SAM22); proteínas envolvidas com a produção de hormônios vegetais como etileno e ácido jasmônico (proteína relacionada à maturação, precursor da glicoproteína de 31kDa do caule); biossíntese de lignina (Cafeoil-CoA metiltransferase); metabolismo de aminoácidos (glutamina sintetase); metabolismo energético (triose fosfato isomerase e UTP-glicose-1-fosfato uridiltransferase); sinalização celular (anexina); processo de oxido-redução (Flavoproteína wrbA) e proteínas estruturais (actina).
5. Este estudo aprofundou os conhecimentos dos mecanismos de defesa da soja em relação ao nematoide de galha *M. javanica* do ponto de vista fisiológico, bioquímico e genético, e pode auxiliar o desenvolvimento de cultivares resistentes a esse patógeno, bem como fornecer proteínas/genes candidatos de interesse para a pesquisa de genótipos transgênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKHAROUF, N.; KHAN, R.; MATTHEWS, B. Analysis of expressed sequence tags from roots of resistant soybean infected by the soybean cyst nematode. **Genome**, v.47, n.2, p.380-388, 2004

AMTHOR, J.S. Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis. **Annals of Botany**, v.91, p.673-695, 2003.

BELL, E.; MULLET, J.E. Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. **Plant Physiology**, v.103, p.1133-1137, 1991.

BENEDETTI, C.E.; XIE, D.X.; TURNER, J.G. Coi1-dependent expression of an *Arabidopsis* vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v.109, p.567-572, 1995.

BERGER, S.; BELL, E.; SADKA, A.; MULLET, J.E. *Arabidopsis thaliana* Atvsp is homologous to soybean VspA and VspB, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. **Plant Molecular Biology**, v.27, p.933-942, 1995.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BUSAM, G.K.T.; JUNGHANNS, R.E.; KNEUSEL, H.H.; KASSEMAYER, U.; MATERN Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. **Plant Physiology**, v.115, n.3, p.1039-1048, 1997

CADENAS, E. Antioxidant and prooxidant functions of DT-diaphorase in quinine metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v.49, p.127-140, 1995.

CAMPO, S.; MANRIQUE, S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; SAN SEGUNDO, B. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. **Plant Biotechnology Journal**, v.6, n.9, p.585-608, 2008.

CANTERO, A.; BARTHAKUR, S.; BUSHART, T.J.; CHOU, S.; MORGAN, R.O.; FERNANDEZ, M.P.; CLARK, G.B.; ROUX, S.J. Expression profiling of the *Arabidopsis* annexin gene family during germination, de-etiolation and abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p.13-24, 2006.

CHEN, M.; THELEN, J.J. The plastid isoform of triose phosphate isomerase is required for the postgerminative transition from heterotrophic to autotrophic growth in *Arabidopsis*. **The Plant Cell Online**, v.22, n.1, p.77-90, 2010

CLARK, G.B.; ROUX, S.J. Annexins in plant cells. **Plant Physiology**, v.109, p.1133-1139, 1995.

COLEY, P.D.; BRYANT, J.P.; CHAPIN, F.S. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, v.230, p.895-899, 1985.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Central de Informações Agropecuárias**: Safras 2011. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: Março de 2012.

CORTÊS, H.P. 2000. Introdução aos hormônios Vegetais; EMBRAPA, p.131-157.

CREN, M.; HIREL, B. Glutamine synthetase in higher plants. Regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. **Plant Cell Physiol**, v.40, p.1187-1193, 1999.

CROWELL, D.N.; JOHN, N.E.; RUSSEL, D.; AMASINO, R.M. Characterization of a stress induced, developmentally regulated gene family from soybean. **Plant molecular Biology**, v.18, n.3, p.459-66, 1992.

CURTO, M.; CAMAFEITA, E.; LOPEZ, J.A.; MALDONADO, A.M.; RUBIALES, D.; JORRÍN, V. A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). **Proteomics**, v.6, p.163-174, 2006.

DALL'AGNOL, A. **Perspectivas da Soja Brasileira - Embrapa Soja 2006**. Disponível em: <[http://www.portaldoagronegocio.com.br/ index.php?p= texto &idT=831](http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p= texto &idT=831)>. Acesso em: 05 dez. 2006.

DELMER, D.P.; HAIGLER, C.H. The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants. **Metabolic Engineering**, v.4, p.22-28, 2002.

DEVOTO, A.; TURNER, J.G. Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. **Physiologia Plantarum**, v.123, p.161-172, 2005.

DIE, J.V.; DITA, M.A.; KRAJINSKI, F.; GONZÁLEZ-VERDEJO, C.I.; RUBIALES, D.; MORENO, M.T.; ROMÁN, B. Identification by suppression subtractive hybridization and expression analysis of *Medicago truncatula* putative defense genes in response to *Orobanche crenata* parasitization. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v.70, p.49-59, 2007.

DO, H.M.; HONG, J.K.; JUNG, H.W.; KIM, S.H.; HAM, J.H.; HWANG, B.K. Expression of peroxidase like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.16, p.196-205, 2003.

FAN, R.; WANG, H.; WANG, Y.; YU, D. Proteomic analysis of soybean defense response induced by cotton worm (*prodenia litura*, fabricius) feeding. **Proteome Science**, v.10, p.16, 2012.

FERRER, J.L.; ZUBIETA, C.; DIXON, R. A.; NOEL, J.P. Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. **Plant Physiology**, v.137, p.1009-1017, 2005.

FRENKEL, C.; KLEIN, I.; DILLEY, D.R. Protein synthesis in relation to ripening of pome fruits. **Plant Physiology**, v.13, p.1146-1153, 1968.

GERKE, V.; MOSS, S.E. Annexins: from structure to function. **Physiological Reviews**, v.82, n.2, p.331-371, 2001.

GÓMEZ-MALDONADO, J.; CÁNOVAS, F.M.; AVILA, C. Molecular analysis of the 5'-upstream region of a gibberellin-inducible cytosolic glutamine synthetase gene (*GS1b*) expressed in pine vascular tissue. **Planta**, v.218, n.6, p.1036-1045, 2004.

GONG, Z.; KOIWA, H.; CUSHMAN, M.A.; RAY, A.; BUFFORD, D.; KORE-EDA, S.; MATSUMOTO, T.K.; ZHU, J.; CUSHMAN, J.C.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (sos) mutants. **Plant Physiology**, v.126, p.363-375, 2001.

GORECKA, K.M.; KONOPKA-POSTUPOLSKA, D.; HENNIG, J.; BUCHET, R.; PIKULA, S. Peroxidase activity of annexin 1 from *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.336, p.868-875, 2005.

GRANDORI, R.; CAREY, J. Six new candidate members of the alpha/beta twisted open-sheet family detected by sequence similarity to flavodoxin. **Protein Science**, v.3, p.185-2193, 1994.

GUZZO, S.D.; HARAKAVA, R. Mecanismos envolvidos na resistência induzida em plantas a doenças: sinalização e expressão de genes de defesa. In: RODRIGUES, F.A.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa, MG, cap. 12, p.281- 301, 2007.

IRELAND, R.J.; LEA, P.J. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. In: Singh BK (ed) Plant amino acids. **Biochemistry and biotechnology**. Dekker, New York, p. 49-109. 1999

- KANDASAMY, M.K.; DEAL, R.D.; MCKINNEY, E.C.; MEAGHER, R.B. Plant actin-related proteins. **TRENDS in Plant Science**, v.9, n.4, 196-202, 2004.
- KEVANY, B.M.; TIEMAN D.M.; TAYLOR, M.G.; CIN, V.D.; KLEE, H.J. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. **Plant Journal**, v.51, p.458-467, 2007.
- KHAN, R.; ALKHAROUF, N.; BEARD, H.S.; MACDONALD, M.; CHOUIKHA, I.; MEYER, S.; GREFENSTETTE, J.; KNAP, H.; MATTHEWS, B.F. Resistance mechanisms in soybean: gene expression profile at an early stage of soybean cyst nematode invasion. **Journal of Nematology**, v.36, p. 241-248, 2004.
- KLECZKOWSKI, L.A. Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants. **Phytochemistry**, v.37, n.6, p.1507-1515, 1994
- KLINK, V.P.; MATTHEWS, B.F. Emerging Approaches to Broaden Resistance of Soybean to Soybean Cyst Nematode as Supported by Gene Expression Studies. **Plant Physiology**, v.151, n.3, p.1017-1022, 2009.
- KNOWLES, J.R. Enzyme catalysis: not different, just better. **Nature** v.350, p.121-124, 1991.
- KOVÁCS, I.; AYAYDIN, F.; OBERSCHALL, A. Immunolocalization of a novel annexin like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa. **The Plant Journal**, v.15, p.185-197, 1998.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAM, H.M.; KOSCHIGANO, K.T.; OLIVEIRA, I.C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G.M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.47, p.569-593, 1996.
- LI, R.; BIANCHET, M.A.; TALALAY, P.; AMZEL, L.M. The three-dimensional structure of NAD(P)H:quinone reductase, a flavoprotein involved in cancer chemoprotection and chemotherapy: Mechanism of the two-electron reduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.8846-8850, 1995.
- LIU, D.; CHEN, L.; DUAN, Y. Differential Proteomic Analysis of the Resistant Soybean Infected by Soybean Cyst Nematode, *Heterodera glycines* Race 3. **Journal of Agricultural Science**, v.3, n.4, p.160-167, 2011.

LIU, Y.; DU, H.; HE, X.; HUANG, B.; WANG, Z. Identification of differentially expressed salt-responsive proteins in roots of two perennial grass species contrasting in salinity tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v.169, p.117-126, 2012.

MASON, H.S.; DEWALD, D.B.; CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyl jasmonate and soluble sugars. **Plant Physiology**, v.98, n.3, p.859-867, 1992.

MASON, H.S.; MULLET, J.E. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. **Plant Cell**, v.2, n.6, p.569-79, 1990.

MATRIX SCIENCE. Disponível em: <<http://www.matrixscience.com/>>. Acesso em: 08 Jun. 2012.

MITTOVA, V.; THEODOULOU, F.L.; KIDDLE, G.; VOLOKITA, M.; TAL, M.; FOYER, C. H.; GUY, M. Comparison of mitochondrial ascorbate peroxidase in the cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*, and its wild, salt - tolerant relative, *L. pennellii* - a role for matrix isoforms in protection against oxidative damage. **Plant Cell and Environment**, v.27, p.237-250, 2004.

MORRIS, A.C.; DJORDJEVIC, M.A. Proteome analysis of cultivar-specific interactions between *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and subterranean clover cultivar Woogenellup. **Electrophoresis**, v.22, p.586-598, 2001.

NAKANO, K.; OMURA, Y.; TAGAYA, M.; FUKUI, T. UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: purification and characterization. **The Journal of Biochemistry**, v.106, n.3, p.528-532, 1989.

NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic Analysis. **Electrophoresis**, v.6, p.427-448, 1985.

PAGEAU, K.; CREN, M.R.; GAUDRY, J.F.M.; DAUBRESSE, C.M. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.3, p.547-557, 2006.

PATRIDGE, E.V.; FERRY, J.G. WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H:quinone oxidoreductase. **Journal of Bacteriology**, v.188, p.3498-3506, 2006.

- PHYTOZOME. Disponível em: <<http://www.phytozome.com/>>. Acesso em: 08 Jun. 2012.
- POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, v.126, p.445-462, 2001.
- POZO, M.J.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Jasmonates-Signals in plant-microbe interactions. **Journal Plant Growth Regulation**, v.23, p.211-222, 2005.
- RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. Reactive oxygen species on plant defense responses to pathogens. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, 2003.
- RICCARDI, F.; GAZEAU, P.; DE, VIENNE D.; ZIVY, M. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. **Plant Physiology**, v.117, p.1253-1263, 1998.
- ROESSING, A.C.; GUEDES, L.C.A. Aspectos econômicos do complexo soja: sua participação na economia brasileira e evolução na região central. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I.M. (Eds.). **A cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. p.1-69.
- ROSAHL, S. Lipoxygenases in plants: their role in development and stress response. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.50, p.123-138, 1996.
- SARMA, A.D.; OEHRLE, N.W.; EMERICH, D.W. Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v.379, p.192-195, 2008.
- SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Ascorbato peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. **Plant Science**, v.167, p.541-550, 2004.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature**, v.1, n.6, p.2856-2860, 2006.
- SOBHANIAN, H.; RAZAVIZADEH, R.; NANJO, Y.; EHSANPOUR, A.A.; RASTGAR JAZII, F.; MOTAMED, N.; KOMATSU, S. Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. **Proteome Science**, v.8, p.19-33, 2010.
- STASWICK, P.E. Storage proteins of vegetative plant tissues. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.45, p.303-322, 1994.

TOORCHI, M.; YUKAWA, K.; NOURI, M.Z.; KOMATSU, S. Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. **Peptides**, v.30, p.2108-2117, 2009.

VANTARD, M.; BLANCHOIN, L. Actin polymerization processes in plant cells. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, 502-506, 2002.

WITTENBACH, V.A. Purification and characterization of a soybean leaf storage glycoprotein. **Plant Physiology**, v.73, p.125-129, 1983.

YAN, S.; TANG, Z.; SU, W. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. **Proteomics**, v.5, n.1, p.235-244, 2005.

YOSHIMURA, K.; YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. **Plant Physiology**, v.123, p.223-233, 2000.

ZHANG, Y.M.; ZHAO, JIN, M.; XIANG, Y.; BIAN, X.C.; ZUO, Q.M.; SHEN, Q.; GAI, J.Y.; XING, H. Proteomics study of changes in soybean lines resistant and sensitive to *Phytophthora sojae*. **Proteome Science**, v. 9, p.52-, 2011.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE SOJA EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Meloidogyne incognita*

INTRODUÇÃO

A soja é considerada a cultura de maior importância econômica no mundo. Sua produção é mais concentrada nos Estados Unidos que é o maior produtor mundial e no Brasil, que ocupa a segunda posição. Essa leguminosa é uma importante fonte de proteína para alimentação animal e humana, assim como de óleo para consumo humano e produção de biodiesel (Roessing; Guedes, 1993; Dall'Agnol, 2006).

Atualmente a soja é cultivada de norte a sul do País (Conab, 2011), sendo que sua expansão vem sendo acompanhada pelo aumento do número de pragas e doenças. Entre as doenças destacam-se os nematoides formadores de galhas que causam grandes perdas aos sojicultores (Yorinori, 2002). Em especial o nematoide *Meloidogyne incognita* vem sendo considerado um grande problema devido a sua polifagia e a dificuldade de controle por meio de rotação de cultura, uma vez que um grande número de espécies de plantas são hospedeiras desse nematoide.

O conhecimento adquirido por meio do genoma e do proteoma das espécies pode fornecer subsídios na busca de alternativas para o controle de pragas e doenças. Proteínas diferencialmente expressas em situações de estresse biótico permitem identificar os genes envolvidos em suas sínteses, podendo trazer novas perspectivas para o melhor entendimento da interação entre o patógeno e a planta hospedeira.

Utilizando técnicas de separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2D-SDS-PAGE) e de identificação por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight*), objetivou-se com o presente trabalho identificar proteínas de soja diferencialmente expressas em resposta à inoculação com *Meloidogyne incognita*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e inoculação

A variedade Conquista, resistente ao nematoide de galha *Meloidogyne incognita*, utilizada neste trabalho foi disponibilizada pelo Banco Ativo de Germoplasma de soja da COODETEC (Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola), Cascavel-PR.

Sementes da variedade Conquista (resistente ao nematoide de galha *Meloidogyne incognita*) foram semeadas em tubetes (5 cm de diâmetro e 25 cm de comprimento) contendo duas partes de areia e uma de solo argiloso. Os tubetes foram colocados dentro de baldes contendo areia, e estes foram mergulhados em banho-maria para que a temperatura de 28°C fosse mantida no interior dos mesmos.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições.

Após 10 dias de emergência das plântulas foi realizada a inoculação de uma suspensão de 5000 ovos de *Meloidogyne incognita* por tubete. Após a inoculação, as raízes foram coletadas em quatro intervalos de tempos distintos (12, 24, 48 e 96 horas). Para o controle dos tratamentos, foram coletadas raízes de plantas não inoculadas dos quatro intervalos de tempos mencionados.

No momento da coleta as raízes foram lavadas sob forte jato de água e imediatamente congeladas em nitrogênio. Em seguida, armazenou-se as raízes a -80°C até o momento da extração de proteínas.

Essas etapas foram realizadas na COODETEC sob a orientação/coordenação do Dr. Ivan Schuster.

Extração de proteínas

Utilizou-se o método de extração descrito por Sarma et al. (2008), com algumas modificações. As amostras foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido e o pó obtido foi transferido para tubos Falcon de 50 mL. Após a trituração foram adicionados 8 mL de solução tampão contendo Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, DTT 50mM, PMSF 1 mM e 50µL de inibidor de protease Sigma P9455. Para uma melhor homogeneização das amostras utilizou-se o *Polytron homogenizer* (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY, EUA)

Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 8000xg por 20 min. a 4°C e o sobrenadante coletado. Adicionou-se 5 mL de fenol tamponado pH 8,0 e os tubos foram mantidos sob agitação por uma hora à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma nova centrifugação e a fração aquosa superior foi coletada em um novo tubo para reextrair as proteínas que pudessem ter ficado na fase aquosa. Agitou-se por 20 min. à temperatura ambiente e centrifugou-se novamente. As porções fenólicas foram juntadas e adicionaram-se 7 mL de Tris HCl 100 mM pH 8,0 / DTT 10 mM. A mistura foi agitada por 10 min. e centrifugadas. Descartou-se a fração aquosa superior e adicionaram-se a porção fenólica inferior 25 mL de solução 0,1 M de acetato de amônia em metanol gelado / DTT 10 mM. Deixou-se a -80°C *overnight* para precipitação das proteínas. As amostras foram centrifugadas e o *pellet* foi lavado duas vezes com 10 mL de solução 0,1 M de acetato de amônia metanólico, duas vezes com 10 mL de acetona 80% e duas vezes com 10 mL de etanol 90%. Durante as lavagens foram feitas agitações em Vortex com posterior centrifugação a 8000xg por 15 min.

O *pellet* final foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e deixado secar à temperatura ambiente. As proteínas foram solubilizadas em tampão de solubilização contendo ureia 7 M, tiourea 2 M e CHAPS 4% e depois sonicadas em banho de gelo numa potência 10%, em sonicador da marca *UltraSonic Processor* (Modelo GE 50). As proteínas extraídas foram armazenadas em *freezer* -20°C.

Quantificação das proteínas

A concentração proteica foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) e utilizou-se albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão.

Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Focalização isoeletrica (IEF)

Foram utilizadas tiras de 18 cm com intervalo linear de pH 4,0 a 7,0 para a realização da focalização isoeletrica. Inicialmente, as tiras foram reidratadas e durante um período de 14 h a 20 h em aparato de reidratação IPGBOX (GE Healthcare). Foram aplicados 340 µL de solução contendo 900µg de proteínas, tampão IPG 2% e solução *Destreak* (GE Healthcare).

A focalização isoeétrica foi realizada no equipamento IPGphor III (GE Healthcare) sob temperatura controlada de 20°C de acordo com as seguintes etapas: 1) 200 Vxh em passo único por 14 horas; 2) 500 Vxh em passo único de 500 volts; 3) 800 Vxh em gradiente até 1000 volts; 4) 16.500 Vxh em gradiente até 10.000 volts; 5) 18.000 Vxh em passo único de 10.000 volts. A amperagem máxima foi de 75µA/tira.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a análise da segunda dimensão, as tiras foram previamente equilibradas após a IEF em 10 mL de solução de equilíbrio (tris 75 mM pH 8,8, ureia 6M, glicerol 30%, SDS 2% e azul de bromofenol 0,002%) sob agitação por 30 min. Foram realizadas duas etapas de equilíbrio com a finalidade de reduzir e alquilar as proteínas. À primeira etapa, foi adicionado 1% de DTT ao tampão de equilíbrio e, na segunda etapa, adicionou-se 2,5% de iodoacetamida.

A segunda dimensão da eletroforese foi efetuada em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970), em gel de separação na concentração de 12,5% de poliacrilamida, em cuba tipo DaltSix (GE Healthcare). As tiras previamente equilibradas foram colocadas no topo do gel de poliacrilamida na presença de SDS e seladas com solução de agarose. Como marcadores de massa molecular foram utilizadas as proteínas: fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

A corrida foi realizada em uma etapa inicial de 10 mA/gel por 60 min e, em seguida, a 40 mA/gel até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. A temperatura foi mantida a 8°C por meio de refrigeração com circulador termostático.

Terminada a corrida, os géis 2-D foram colocados em solução de fixação contendo ácido acético a 10% (v/v) e etanol a 40% (v/v) *overnight*, e corados por 48 horas com solução contendo sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v), *Coomassie blue* G-250 0,08% (v/v) e etanol 20% (v/v) (Neuhoff et al., 1985). Após essa etapa, os géis foram lavados com solução de ácido acético 1% (v/v) até a eliminação completa do corante excedente.

Captura das imagens e análise da expressão

As imagens dos géis foram digitalizadas usando o *Image Scanner III* (GE Healthcare) no modo de escaneamento transparente, resolução de 300 dpi, filtro de cor vermelho e com fórmula de calibração atualizada. As imagens foram calibradas com o *software Labscan* (GE Healthcare). As análises comparativas das imagens digitais foram efetuadas utilizando o *software Image Master 2D Platinum* (GE-Healthcare).

Através desse *software* foi feita a detecção automática dos pontos proteicos seguidas de correções manuais quando necessário. As correções foram realizadas com a finalidade de eliminar *spots* falso positivos, inserir *spots* falso negativos, efetuar correções quanto a delimitação das regiões dos *spots* e correção de *matches*.

Foi estimado o número total de *spots*, os pontos isoelétricos e massas moleculares, assim como seus níveis de expressão. Este último parâmetro foi mensurado pelo programa através da avaliação do volume (densidade ótica e área) dos *spots* contidos no gel.

A comparação foi feita entre géis de plantas não inoculadas e de plantas inoculadas para cada tempo de inoculação, considerando três repetições biológicas para cada tratamento. Foram considerados diferencialmente expressos, *spots* que apresentaram uma variação de sobreposição de medidas acima de 1,45 e ANOVA com valor de p menor que 0,05.

Para os *spots* diferencialmente expressos foi calculada uma porcentagem de seu volume e a comparação desses valores indicou a diferença de expressão entre os tratamentos.

Tripsinização da amostra proteica

A tripsinização foi realizada segundo o protocolo de Shevchenko et al. (2006), com algumas modificações. Os *spots* correspondentes às proteínas diferencialmente expressas foram retirados dos géis com auxílio de uma ponteira de 1000µL, estéril, com a ponta cortada. Para remoção dos corantes, os pedaços de gel contendo as proteínas foram lavados duas vezes com solução de acetonitrila 50% / bicarbonato de amônio 25 mM e outra lavagem com solução de metanol 50% / bicarbonato de amônio 25 mM sendo que a primeira foi *overnight* e as demais por 1 h no dia seguinte. As lavagens foram realizadas à temperatura ambiente a 750 rpm no aparelho *Thermomixer digital Comfort* (Eppendorf).

A seguir, a solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila por 5 min duas vezes e secos em *Speed Vac Concentrator Plus (Eppendorf)* por 15 min. As proteínas foram, então, reduzidas com DTT a 25 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min a 56 °C, em *Thermomixer*, a 500 rpm. Após esta etapa, as proteínas foram alquiladas com iodoacetamida a 75 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min, à temperatura ambiente, na ausência de luz, e incubadas em *Thermomixer* a 500 rpm. Sequencialmente, os pedaços de gel foram, por duas vezes, lavados em bicarbonato de amônio a 100 mM por 10 min, desidratados em acetonitrila por 5 min e após uma etapa adicional de desidratação, secos em *Speed Vac* por 15 min.

Para a etapa de digestão enzimática os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (25 ng/μL) em solução de bicarbonato de amônio 40 mM / acetonitrila 10%. A tripsina utilizada foi a *Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade, Promega V5280*. Foram aplicados 20 μL de solução de clivagem de forma a cobrir os pedaços de gel e as amostras permaneceram em banho de gelo durante 45 min para que a enzima pudesse penetrar no gel sem que se iniciasse a digestão. Após este período, 50 μL da solução de bicarbonato de amônio 40 mM / acetonitrila 10% foram adicionados a cada amostra. As amostras foram, então, incubadas a 37 °C por 16 h sob agitação a 500 rpm.

Após a digestão, os pedaços de gel foram submetidos a banho ultrassom por 10 min, agitados a 1500 rpm por 2 min e toda a solução do tubo foi removida para um novo tubo. Com a finalidade de recuperar o maior número de fragmentos trípticos, a cada pedaço de gel restante foram adicionados 40 μL da solução de ácido fórmico 5% / acetonitrila 50% e 40 μL da solução de ácido fórmico 5% / metanol 60%, em duas etapas sequenciais. As amostras foram submetidas a agitação a 1500 rpm por 2 min, incubados por 15 min em repouso a temperatura ambiente, 10 min no banho ultrassom e novamente submetidas a agitação a 1500 rpm por 2 min. Em cada passo toda a solução foi removida e juntada à solução do tubo novo.

Após essas etapas toda a solução foi totalmente evaporada em *Speed Vac* e os tubos contendo os peptídeos trípticos foram ressuspensos em 5 μL de solução contendo acetonitrila 60% / TFA 0,1% . As amostras que apresentaram uma grande quantidade de sal foram dessalinizadas em coluna de hidrofobicidade C18 (*Zip Tip*) da marca *Eppendorf* seguindo as recomendações do fabricante.

Espectrometria de massa

A identificação de proteínas foi realizada utilizando um espectrômetro de massa do tipo AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (*Applied Biosystem*) disponibilizado pelo Núcleo de Proteoma do Laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ).

Alíquotas de 0,3 µL de cada amostra contendo os peptídeos trípticos foram aplicadas sobre uma placa de aço, juntamente com a matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma), numa proporção 1:1. Após a cristalização a placa foi inserida no espectrômetro e a análise iniciada. Para a ionização dos peptídeos utilizou-se a técnica de MALDI e o método de detecção do tipo TOF/TOF. O equipamento foi operado no modo positivo e com o refletor ativado. Após a obtenção das massas dos fragmentos tripticos, os quinze peptídeos mais intensos foram automaticamente selecionados e submetidos à análise por MS/MS. Para a fragmentação dos peptídeos usou-se o método do decaimento pós-fonte (*post-source decay*).

Identificação de proteínas por espectrometria de massa

A identificação das proteínas foi realizada por meio dos dados de MS/MS *ion search* confrontando-os com sequências obtidas das proteínas presentes nos bancos de dados com auxílio do *software* Mascot versão 2.2.07 (Matrix Science, 2012). As pesquisas foram realizadas nos bancos de dados públicos do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e *Phytzome*. Nesse último banco se encontram as sequências obtidas pelo sequenciamento do genoma da soja (*Glycine max*) (Phytzome, 2012).

Os parâmetros utilizados para a busca das proteínas foram: peptídeos com até dois sítios de clivagem perdidos; erro de 0,1 Da para identificação de peptídeos; como modificações variáveis escolheu-se carbamidometilação dos resíduos de cisteína, oxidação dos resíduos de metionina e deaminação dos resíduos de asparagina e glutamina.

Após a identificação das proteínas, realizou-se a validação das mesmas pelo *software* Scaffold (Proteome Software).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise das imagens dos géis bidimensionais de raízes de soja de plantas inoculadas e não inoculadas com *Meloidogyne incognita* foram detectados um total de 45 *spots* diferencialmente expressos nos diferentes tempos avaliados 12, 24, 48 e 96 horas após a inoculação (h.a.i.). Destes, 35 puderam ser identificados por MS/MS. No tempo 12 h.a.i. foram encontrados 18 *spots*, sendo que todos foram identificados. Foram detectados 16 *spots* diferencialmente expressos no tempo 24 h.a.i., sendo que 12 foram identificados. Seis *spots* foram detectadas 48 h.a.i. e quatro foram identificados. No tempo 96 h.a.i. foram identificados 5 *spots* e nenhum foi identificado.

Os 35 *spots* identificados corresponderam a 17 proteínas diferencialmente expressas (Tabela 1), uma vez que alguns *spots* presentes em posições correspondentes dos géis foram detectados em tempos diferentes de inoculação e também foram encontradas isoformas de uma mesma proteína representada por mais de um *spot* num mesmo gel.

A identificação das proteínas foi realizada pelo auxílio do *software* Mascot que apresentou valores de escores significativamente acima do limite mínimo de confiabilidade (dados não mostrados) e foram confirmadas pelo *software* Scaffold com pelo menos 98% de probabilidade indicando alta confiabilidade na identificação das proteínas.

Na Tabela 1 estão apresentadas as proteínas diferencialmente expressas em resposta à inoculação com *Meloidogyne incognita*, com o seu respectivo match ID (que é o número de identificação da proteína disponibilizado pelo *software* Image Master III), tempo de inoculação em que a proteína foi identificada, médias da % de volume de *spots* de plantas inoculadas e não inoculadas associadas ao desvio padrão, e os níveis de expressão de cada proteína.

Tabela 1. Nível de expressão relativa das proteínas baseada na média da % de volume das plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI).

Proteína	Match ID	Tempo (h.a.i.)	Média da % de volume \pm DP		Nível de expressão
			I	NI	
S-adenosilmetionina sintase	662	12	0,1799 \pm 0,0014	ND	NA
S-adenosilmetionina sintase	666	12	0,0826 \pm 0,0227	ND	NA
Metionina sintase	450	12	0,1974 \pm 0,0364	0,0804 \pm 0,0035	+ 2,45
Ascorbato Peroxidase 2	100	12	0,6253 \pm 0,0136	0,4081 \pm 0,0022	+ 1,53
Glutaciona transferase-8	630	12	0,1447 \pm 0,0478	0,1507 \pm 0,0278	NA
Isoflavona redutase	202	12	0,1416 \pm 0,0098	0,0722 \pm 0,0079	+ 1,96
Isoflavona redutase	641	24	0,0888 \pm 0,0166	ND	NA
Isoflavona redutase	1028	24	0,0466 \pm 0,0041	ND	NA
Isoflavona redutase	131	48	0,7545 \pm 0,0902	0,3723 \pm 0,0037	+ 2,03
Fosfoglicerato quinase	238	12	0,1902 \pm 0,0329	0,0840 \pm 0,01087	+ 2,26
Fosfoglicerato quinase	240	12	0,2785 \pm 0,0100	0,1308 \pm 0,0127	+ 2,13
Fosfoglicerato quinase	324	24	0,1714 \pm 0,0179	0,0868 \pm 0,0053	+ 1,97
Fosfoglicerato quinase	495	48	0,0854 \pm 0,0107	ND	NA
Fosfoglicomutase	393	12	0,0536 \pm 0,0160	0,0262 \pm 0,001	+ 2,05
Fosfoglicomutase	400	12	0,0809 \pm 0,0035	0,0409 \pm 0,0061	+ 1,98
ATP sintase subunidade alfa	422	24	0,1576 \pm 0,0108	0,0747 \pm 0,0055	+ 2,11
6-Fosfoglucontato desidrogenase	285	12	0,0993 \pm 0,0307	0,0393 \pm 0,0111	+ 2,52
Transcetolase	411	12	0,1682 \pm 0,0112	0,1024 \pm 0,0064	+ 1,64
Enolase	315	12	0,6854 \pm 0,0284	0,4044 \pm 0,0250	+ 1,69
Aldo-ceto redutase	457	12	0,2134 \pm 0,0437	0,0940 \pm 0,0248	+ 2,27
Aldo-ceto redutase	800	24	0,1920 \pm 0,0458	0,0569 \pm 0,01049	+ 3,3
Aconitato hidratase	448	12	0,2003 \pm 0,0205	0,0987 \pm 0,0234	+ 2,03
Cafeoil-CoA metiltransferase	78	48	0,5863 \pm 0,0164	0,3014 \pm 0,0153	+ 1,95
Glutamato desidrogenase 1	339	24	0,0405 \pm 0,0013	0,0757 \pm 0,0026	- 1,87
Glutamato desidrogenase 1	201	48	0,0452 \pm 0,0060	0,0929 \pm 0,0061	- 2,05
Precursor glicoproteína do caule -31 kDa	117	12	0,1115 \pm 0,0125	0,0469 \pm 0,0039	+ 2,38
Proteína relacionada com a maturação	18	12	2,4862 \pm 0,1157	1,3258 \pm 0,0702	+ 1,88
Proteína relacionada com a maturação	20	24	0,3677 \pm 0,0279	0,2039 \pm 0,0043	+ 1,80
Proteína relacionada com a maturação	808	24	0,1706 \pm 0,0569	ND	NA

Os sinais (+) e (-) indicam aumento e diminuição na expressão da proteína em resposta à inoculação de *Meloidogyne incognita*, respectivamente.

DP = desvio padrão, ND = não detectado, NA = não aplicável.

Nas Figuras 1, 2, 3 e 4 são mostradas imagens dos géis referentes aos tempos 12, 24, 48 e 96 horas após a inoculação (h.a.i.), respectivamente. Também estão mostrados os respectivos géis controles de plantas não inoculadas. Os *spots* evidenciados foram detectados por MS/MS e estão identificados pelo Match ID.

Na Tabela 2 são mostradas as proteínas diferencialmente expressas em resposta à inoculação com *Meloidogyne incognita*.

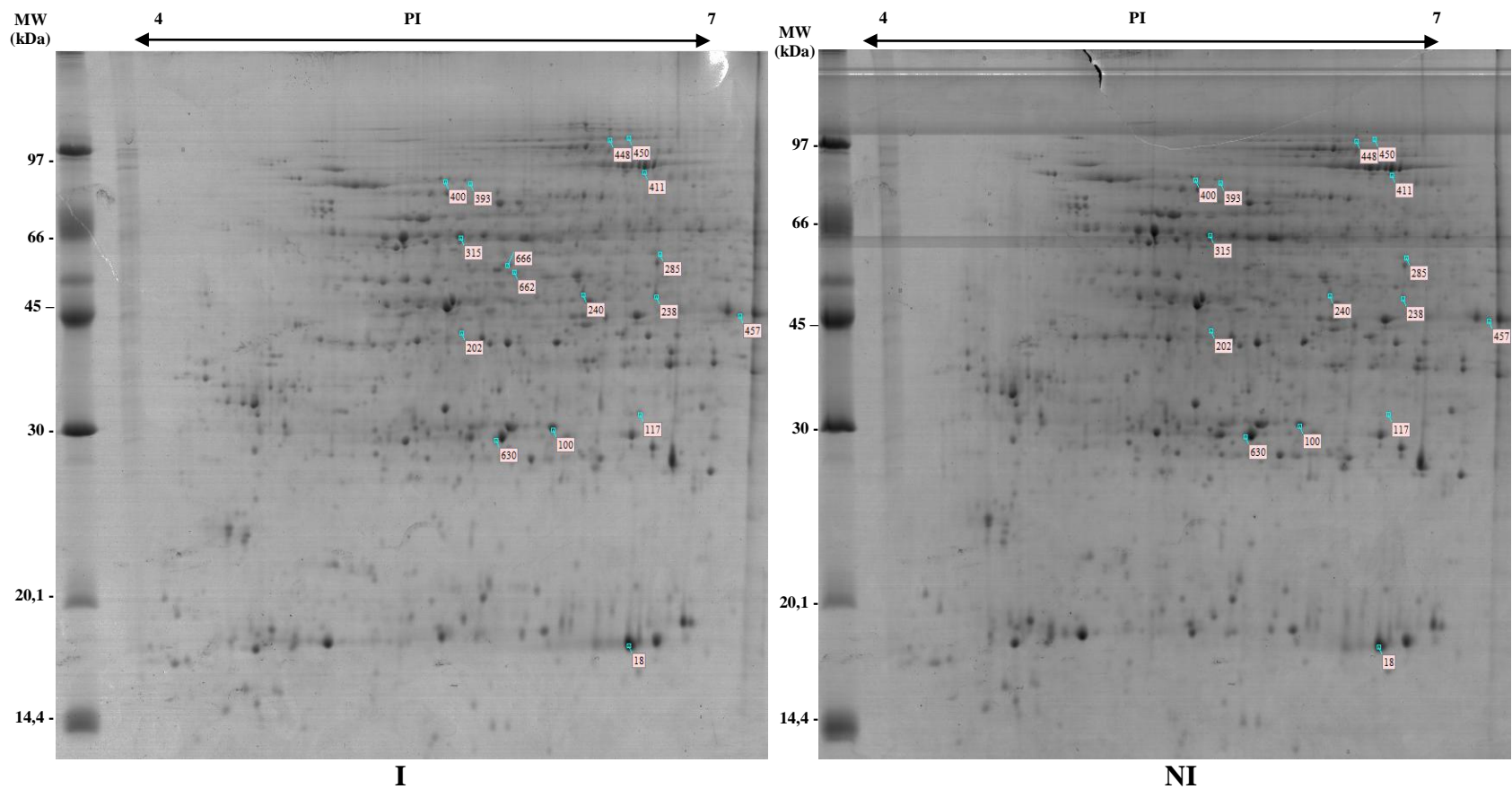


Figura 1: Perfil de proteínas de raízes de soja em resposta à inoculação por *Meloidogyne incognita* após 12 horas de inoculação obtidos por eletroforese bidimensional de plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI). Cerca de 900 µg de proteínas foram usados para análise 2-DE com tiras IPG de 18 cm (pH 4-7). Os géis foram visualizados com *Coomassie brilliant blue*. Os spots evidenciados diferencialmente expressos estão identificados pelo número Match ID. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

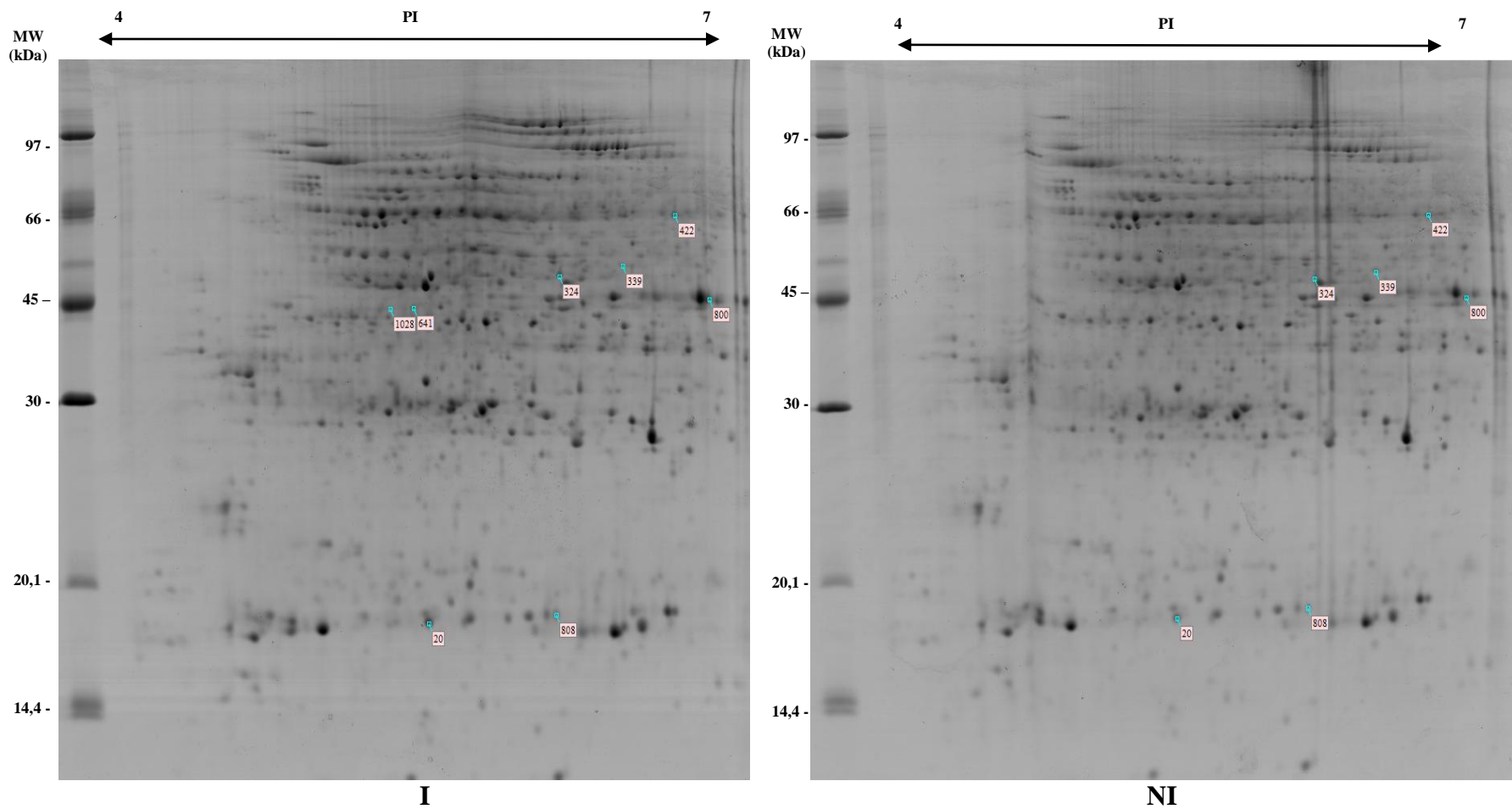


Figura 2: Perfil de proteínas de raízes de soja em resposta à inoculação por *Meloidogyne incognita* após 24 horas de inoculação obtidos por eletroforese bidimensional de plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI). Cerca de 900 µg de proteínas foram usados para análise 2-DE com tiras IPG de 18 cm (pH 4-7). Os géis foram visualizados com *Coomassie brilliant blue*. Os spots evidenciados diferencialmente expressos estão identificados pelo número Match ID. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

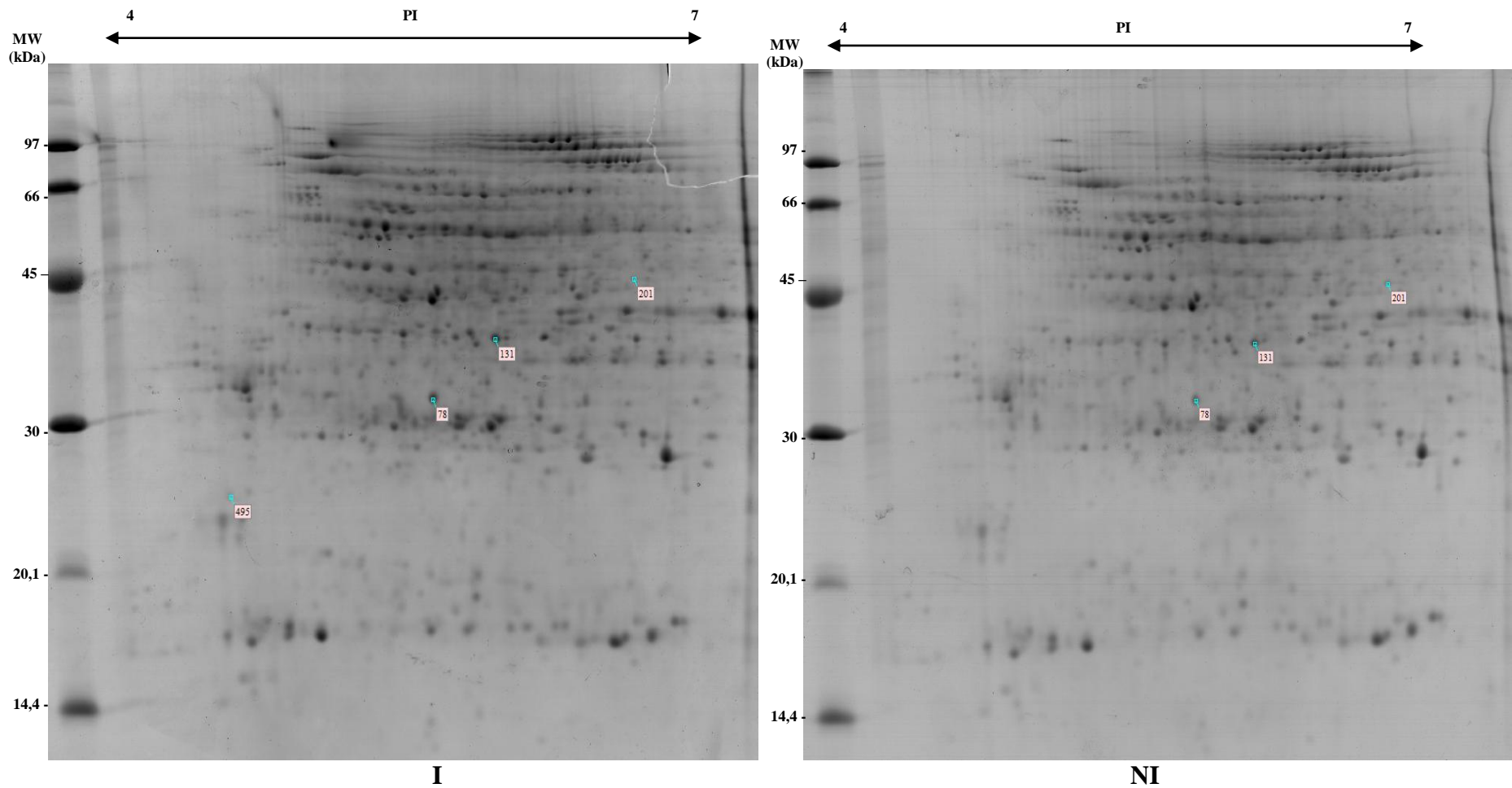


Figura 3: Perfil de proteínas de raízes de soja em resposta à inoculação por *Meloidogyne incognita* após 48 horas de inoculação obtidos por eletroforese bidimensional de plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI). Cerca de 900 µg de proteínas foram usados para análise 2-DE com tiras IPG de 18 cm (pH 4-7). Os géis foram visualizados com *Coomassie brilliant blue*. Os spots evidenciados diferencialmente expressos estão identificados pelo número Match ID. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

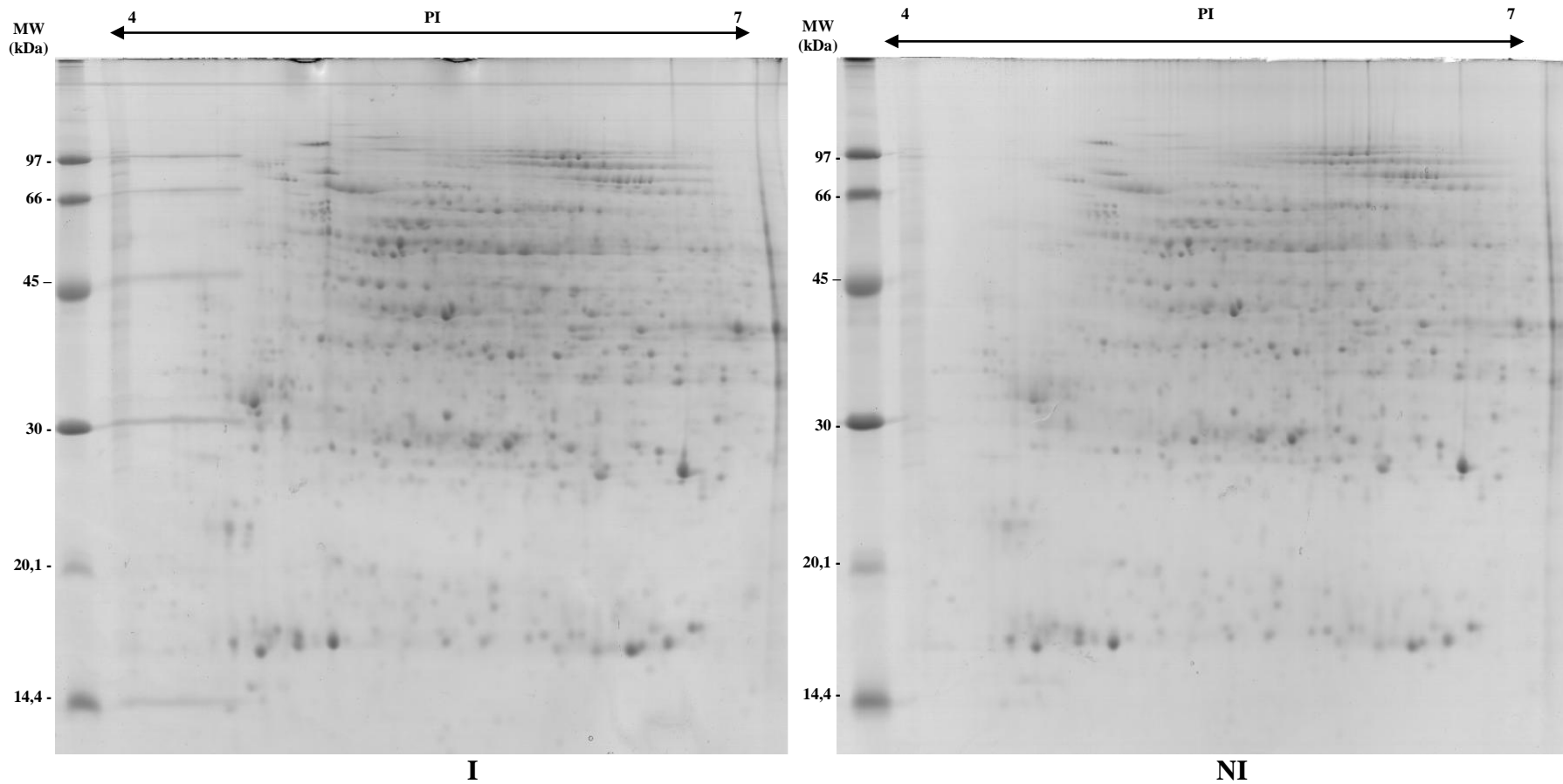


Figura 4: Perfil de proteínas de raízes de soja em resposta à inoculação por *Meloidogyne incognita* após 96 horas de inoculação obtidos por eletroforese bidimensional de plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI). Cerca de 900 µg de proteínas foram usados para análise 2-DE com tiras IPG de 18 cm (pH 4-7). Os géis foram visualizados com *Coomassie brilliant blue*. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

Tabela 2. Proteínas diferencialmente expressas em raízes de soja em resposta à inoculação com *Meloidogyne incognita* identificadas por espectrometria de massas MALDI-TOF-TOF.

Proteína ¹	Match ID/ Tempo	Espécie	Acesso (GI) ²	E value	PI / MW		Cobertura ³ (%)	Peptídeos identificados
					Experimental	Teórico		
S-adenosilmetionina sintase	662/12h	<i>Glycine max</i>	356505665	0.0	5,77/54.462	5,57/43.197	13	FVIGGPHGDAGLTGR TAAYGHFGR TIFHLNPSGR TQVTVEYYNDNGAmVPVR
S-adenosilmetionina sintase	666/12h	<i>Glycine max</i>	356505665	0.0	5,79/55.596	5,57/43.197	20	FVIGGPHGDAGLTGR IPDKEILQIVK nGTcAWLRPDGK TAAYGHFGR TIFHLNPSGR VLVNIEQQSPDIAQGVHGHFTK
Metionina sintase	450/12h	<i>Glycine max</i>	351724907	0.0	6,38/98.977	5,93 /84.230	5	AGITVIQIDEAALR YGAGIGPGVYDIHSPR YLFAGVVDGR
Ascorbato Peroxidase 2	100/12h	<i>Glycine max</i>	37196687	5 e ⁻¹⁵⁵	6,01/30.661	5,65/27.109	30	YASDEDAFFADYAEAHQK LAWHSAGTYDVSSK HPSELAHGANNGLDI AVR EDKPEPPPEGR ALLSDPVFRPLVEK

Proteína ¹	Match ID/ Tempo	Espécie	Acesso (GI) ²	E value	PI / MW		Cobertura ³ (%)	Peptídeos identificados
					Experimental	Teórico		
Glutathione transferase-8	630/12h	<i>Glycine max</i>	351726820	$7 e^{-161}$	5,76/30.142	5,22/25.836	38	ESLPPRPDPVFSFFK GLYESLFGSK LHNWSQEFLNHPIVK NNPILPSDPYQR nVEEAIEALQFLENEIK SVFTADEKER YVEENLR
Isoflavona reductase	202/12h	<i>Glycine max</i>	351724529	0.0	5,58/43.017	5,3/35.552	43	AGNPTFILVR DLEASEAYPHVEYSTVSEYLDQFV ETSPFNYYLLALYHSQQIK FFPSEFGLDVDR HIVWASVK ILVLGPTGAIGR IYVSEEEVLK LLIEDQVK LVTAANPETR NLAQIDITVPPR QVDVVICSFGR
Isoflavona reductase	1028/24h	<i>Glycine max</i>	2687724	0.0	5,21/43.128	5,30/35.552	16	ETSPFNYYLLALYHSQQIK FFPSEFGLDVDR HIVWASVK NLAQIDITVPPR
Isoflavona reductase	641/24h	<i>Glycine max</i>	2687724	0.0	5,31/43.117	5,30/35.552	32	AGNPTFILVR ETSPFNYYLLALYHSQQIK FFPSEFGLDVDR HIVWASVK ILVLGPTGAIGR LPNnYLSLNDIISLWEK NLAQIDITVPPR QVDVVICSFGR

Proteína ¹	Match ID/ Tempo	Espécie	Acesso (GI) ²	E value	PI / MW		Cobertura ³ (%)	Peptídeos identificados
					Experimental	Teórico		
Isoflavona redutase	131/48h	<i>Glycine max</i>	351726399	0.0	5,83/38.216	5,6/33.919	36	AGHPTLLVR AVFNKEEDIGTYTINSVDDPR EEDIGTYTINSVDDPR FYPSEFGNDVDR GLGVNLVLGDLYDHQSLVSAIK ILFIGGTGYIGK ILYIRPPANTLSFNELVTLWEGK IYVPEEQLLK KFYPSEFGNDVDR
Fosfoglicerato quinase	238/12h	<i>Glycine max</i>	356525744	0.0	6,51/48.545	6,28/42.366	23	ELDYLVGAVSNPK FYKEEEKNDPEFAK LASLADLYVNDAFGTAHR LVAQLPEGGVLLLENVR VDLNVPLDDNLNITDDTR YLKPSVAGFLmQK
Fosfoglicerato quinase	240/12h	<i>Glycine max</i>	356525744	0.0	6,16/48.974	6,28/42.366	38	AQGYSVGSSLVEEDKLSLATTLEK ELDYLVGAVSNPK FYKEEEKNDPEFAK GVSLLLPTDVVIADK GVTTIIGGGDSVAAVEK KLASLADLYVNDAFGTAHR LASLADLYVNDAFGTAHR RPFAAIVGGSK VDLNVPLDDNLNITDDTR YLKPSVAGFLmQK YSLKPLVPR
Fosfoglicerato quinase	324/24h	<i>Glycine max</i>	356525744	0.0	6,04/49.903	6,28/42.366	23	ELDYLVGAVSNPK GVSLLLPTDVVIADK GVTTIIGGGDSVAAVEK LASLADLYVNDAFGTAHR VDLNVPLDDNLNITDDTR YLKPSVAGFLmQK

Proteína ¹	Match ID/ Tempo	Espécie	Acesso (GI) ²	E value	PI / MW		Cobertura ³ (%)	Peptídeos identificados
					Experimental	Teórico		
Fosfoglicerato quinase	495/48h	<i>Glycine max</i>	356525744	0.0	4,57/24.453	6,28/42.366	23	ELDYLVGAVSNPK FYKEEEKNDPEFAK LASLADLYVNDAFGTAHR LVAQLPEGGVLLLENVR VDLNVPLDDNLNITDDTR YLKPSVAGFLmQK
Fosfoglicomutase	393/12h	<i>Glycine max</i>	356524354	0.0	5,62/79.910	5,35/63.351	14	QHWATYGR SEPQEEPFEGAASDGDADR SIFDFESIR VETTPFDGQKPGTSGLR VWIGQnGLLSTPAVSAVIR YLFEDGSR
Fosfoglicomutase	400/12h	<i>Glycine max</i>	356524354	0.0	5,50/80.8031	5,35/63.351	20	EDFGGGHPDPNLTAK FTFcYDALHGVGGAYAK QHWATYGR SEPQEEPFEGAASDGDADR SIFDFESIR VETTPFDGQKPGTSGLR VWIGQnGLLSTPAVSAVIR YLFEDGSR
ATP sintase subunidade α	422/24h	<i>Glycine max</i>	231585	0.0	6,61/65.496	5,70/55314	10	EAFPGDVfYLHSR EVAFAQFGSDLDAATQALLNR ITNFYTNFQVDEIGR
6-Fosfoglucontato desidrogenase	285/12h	<i>Glycine max</i>	356526585	0.0	6,56/57799	6,11/53.526	4	DYFGAHTYER GFPISVYNR
Transcetolase	411/12h	<i>Glycine max</i>	356506190	0.0	6,46/83.191	6,40/78.857	8	ALPTYTPESPADATR ESVFPAAVSAR HTPEGAALAEWNAK NPFWFNR VSIEAGSTFGWEK

Proteína ¹	Match ID/ Tempo	Espécie	Acesso (GI) ²	E value	PI / MW		Cobertura ³ (%)	Peptídeos identificados
					Experimental	Teórico		
Enolase	315/12h	<i>Glycine max</i>	351724891	0.0	5,58/62,265	5,4/47.643	32	AAVPSGASTGIYEALER AGWGVmASHR GNPTVEVDLTcSDGTFAR IEEELGAEAVYAGANFR LAmQEFmVLPVGASSFK LVLPVPAFNVIInGGSHAGNK mGVEVYHNLK TYDLnFKEDNNDGSQR VNQIGSVTESIEAVR
Aldo-ceto redutase	457/12h	<i>Glycine max</i>	378548275	0.0	6,92/45.038	5,74/31.403	18	DIEEEIVPLcR ELGIGIVPYSPLGR LDVEYIDLYYQHR RLDVEYIDLYYQHR YIGLSEASPDTIR
Aldo-ceto redutase	800/24h	<i>Glycine max</i>	378548275	0.0	6,76/45.895	5,74/26.294	24	DIEEEIVPLcR ELGIGIVPYSPLGR LDVEYIDLYYQHR RLDVEYIDLYYQHR VDTSVPIEETVGEK YIGLSEASPDTIR
Aconitato hidratase	448/12h	<i>Glycine max</i>	356550020	0.0	6,29/98.533	7,28/107.043	3	FDHFGQPAELK nGVTATDLVLTVTQILR
Cafeoil-CoA metiltransferase	78/48h	<i>Glycine max</i>	356521520	4 e-178	5,55/31.975	5,46/28.053	45	EGPALPVLDEmIKDEK EGPALPVLDEMIKDEK ENYELGPLVIK IEIcmLPVGDGITicR IEIcMLPVGDGITicR NHGSYDFIFVDADKDNLYNHYK SLLQSDALYQYILETSVYPR VGGVIGYDNTLWNGSVVAPPDAPLR VGGVIGYDNTLWNGSVVAPPDAPLRK

Proteína ¹	Match ID/ Tempo	Espécie	Acesso (GI) ²	E value	PI / MW		Cobertura ³ (%)	Peptídeos identificados
					Exp.	Teórico		
Glutamato desidrogenase 1	339/24h	<i>Glycine max</i>	351727761	0.0	6,36/51.983	5,97/44.498	9	DDGTLQSYVGFR GVLFATEALLNEYGK VVAVSDITGAIK
Glutamato desidrogenase 1	201/48h	<i>Glycine max</i>	351727761	0.0	6,46/45.418	5,97/44.498	11	DDGTLQSYVGFR GGIGcDPAELISELER GVLFATEALLNEYGK
Precursor glicoproteína do caule -31 kDa	117/12h	<i>Glycine max</i>	134146	1 e ⁻¹⁷⁷	6,44/32.081	6,72/29.262	41	AGFHTWEQLLK DYINGEQFR EVHHnDIFIFGIDNTVLSNIPYYEK IVGIIGDQWSDLLGDHR LAVEAHNIR LPNPmYYIE TIPEEcVEPTKDYInGEQFR TVNQQAFFYASER
Proteína relacionada a maturação	18/12h	<i>Glycine max</i>	351724283	2 e ⁻⁸⁷	6,39/17.948	5,96/17.751	36	FIFQAIDNDNHGGTIK LHQGEDWHHNETVK LREEVDPPYGHIEYLHK WTVEYER
Proteína relacionada a maturação	20/24h	<i>Glycine max</i>	351724283	2 e ⁻¹¹⁰	5,36 /17.776	5,38/17.609	45	IGEEVDPPYGYIEYVHK LFDGDIDNQFK LIFQAIDKENDSAIK WFNLFTTQLHHVQNLTD WTIEYER
Proteína relacionada a maturação	808/24h	<i>Glycine max</i>	351724283	1 e ⁻⁸¹	6,22/17.756	4,87/50.470	45	IFGEDIDHQYK VGEEVDLPGFIEYLNK VTTYHESIESVDEPNK WFNLFATQLHHVQNLTER WTIEYER

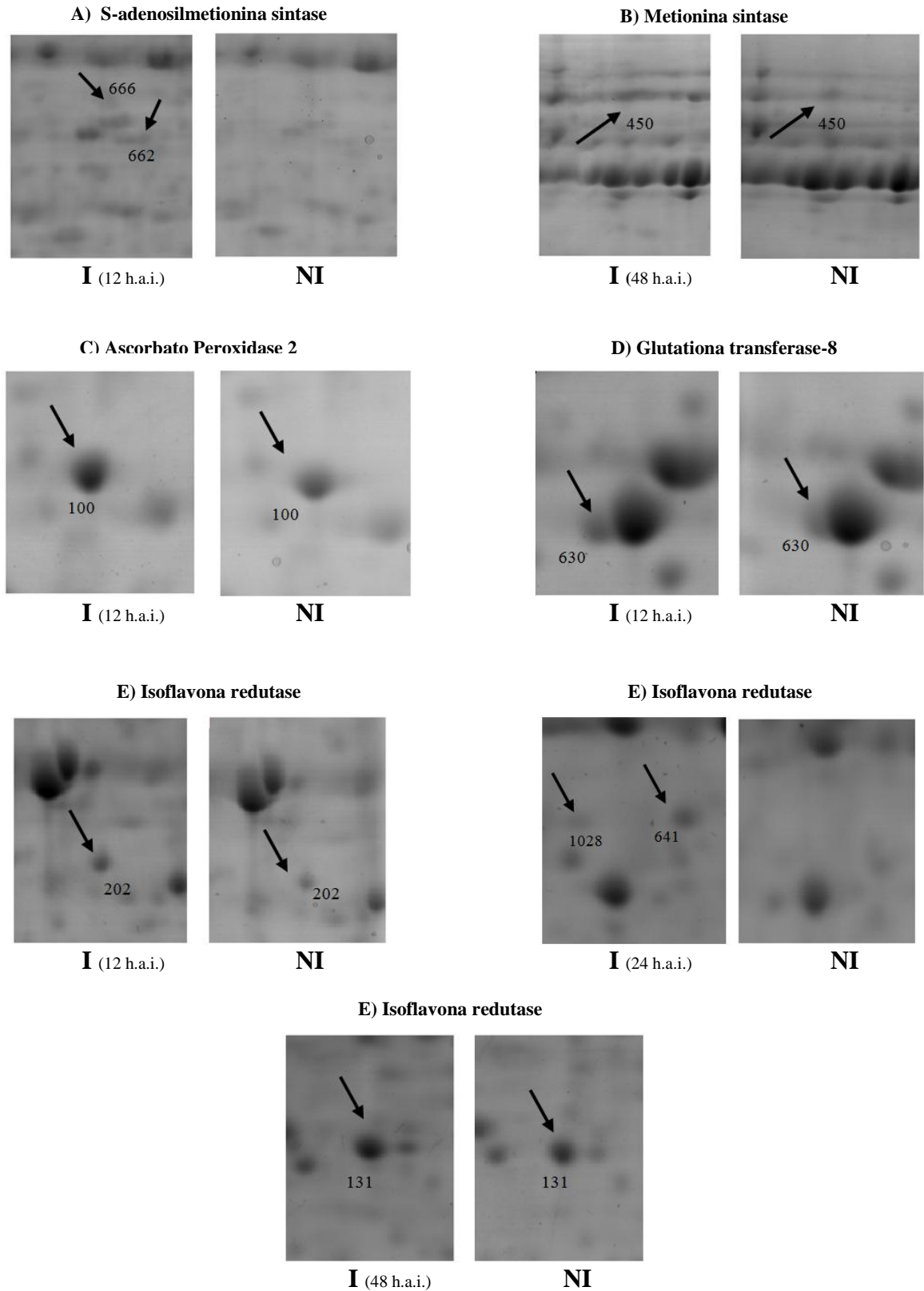
1 Todas as proteínas tiveram uma confirmação de pelo menos 98% de certeza no *software* Scaffold (Proteome Software, Inc., Portland, OR).

2 GenInfo Identifier (GI) - número de acesso ao no GenBank – NCBI.

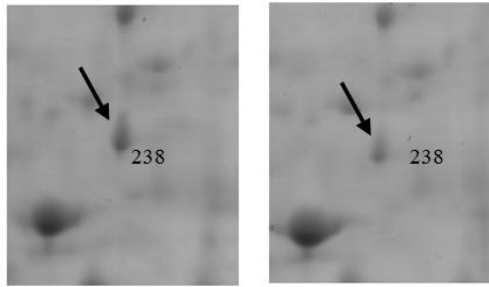
3 Porcentagem obtida no *software* Scaffold (Proteome Software, Inc., Portland, OR).

* Indicação da presença de diferentes tipos de isoformas.

Na Figura 5 estão evidenciadas as imagens ampliadas dos *spots* referentes às proteínas diferencialmente expressas em resposta à inoculação com *Meloidogyne incognita*.



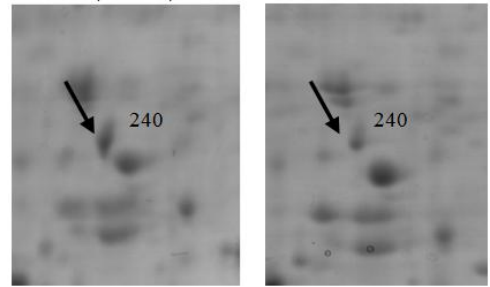
F) Fosfoglicerato quinase



I (12 h.a.i.)

NI

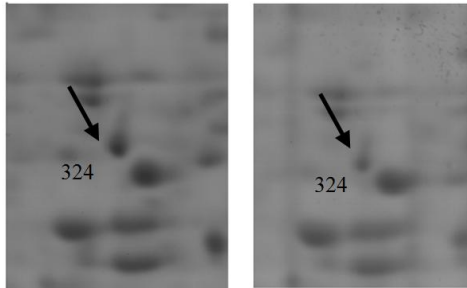
F) Fosfoglicerato quinase



I (12 h.a.i.)

NI

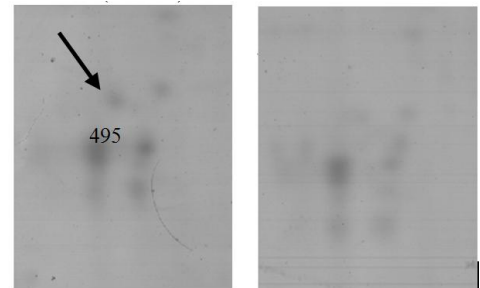
F) Fosfoglicerato quinase



I (24 h.a.i.)

NI

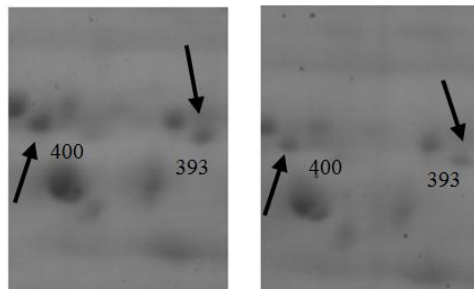
F) Fosfoglicerato quinase



I (48 h.a.i.)

NI

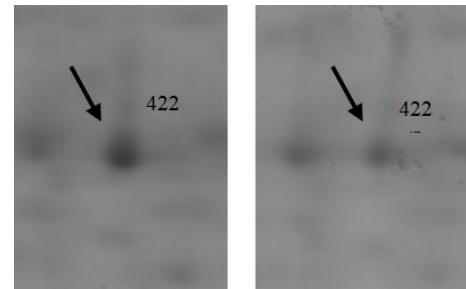
G) Fosfoglicomutase



I (12 h.a.i.)

NI

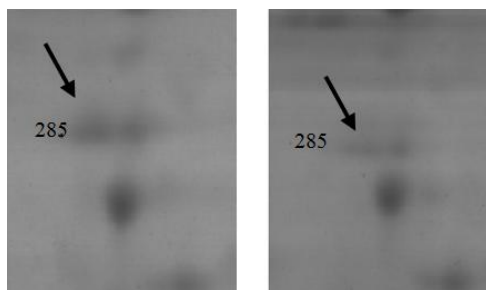
H) ATP sintase subunidade alfa



I (24 h.a.i.)

NI

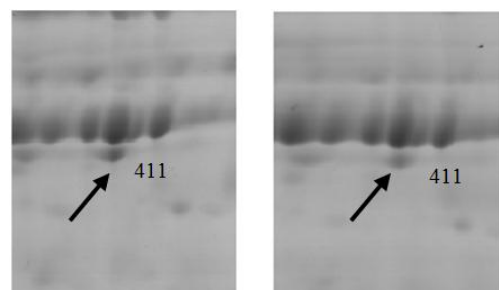
I) 6-Fosfoglucontato desidrogenase



I (12 h.a.i.)

NI

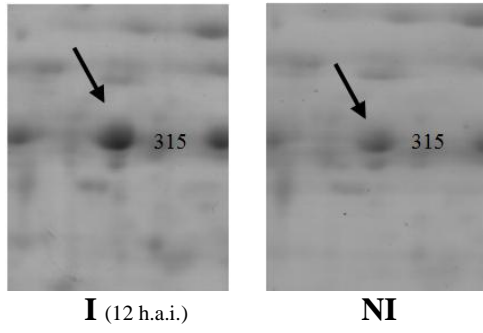
.I) Transcetolase



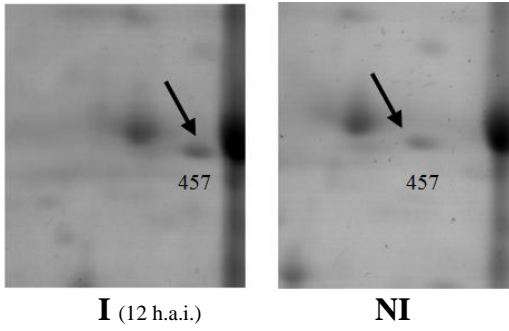
I (12 h.a.i.)

NI

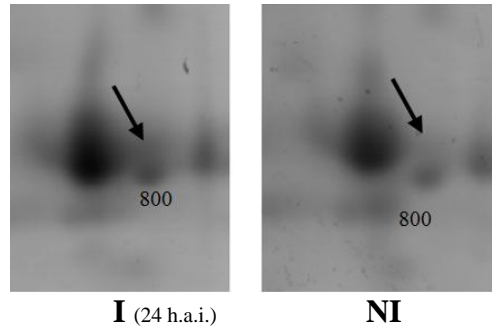
K) Enolase



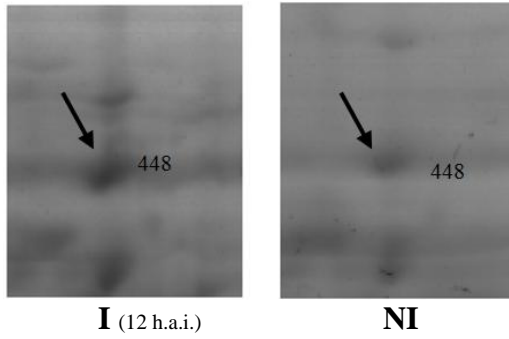
L) Aldo-ceto redutase



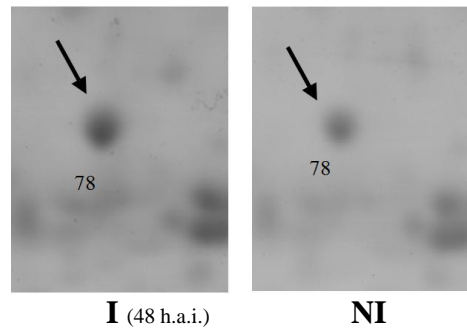
L) Aldo-ceto redutase



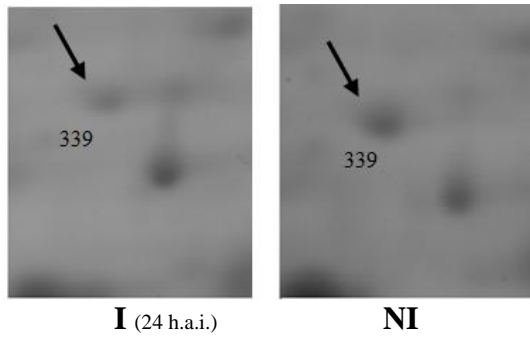
M) Aconitato hidratase



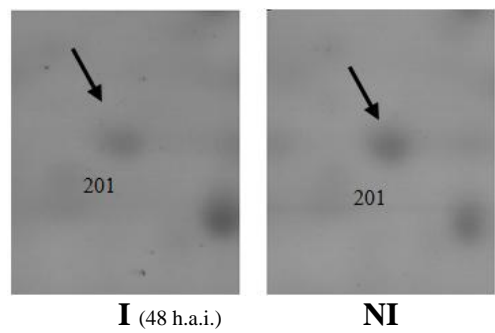
N) Cafeoil-CoA metiltransferase



O) Glutamato desidrogenase 1



O) Glutamato desidrogenase 1



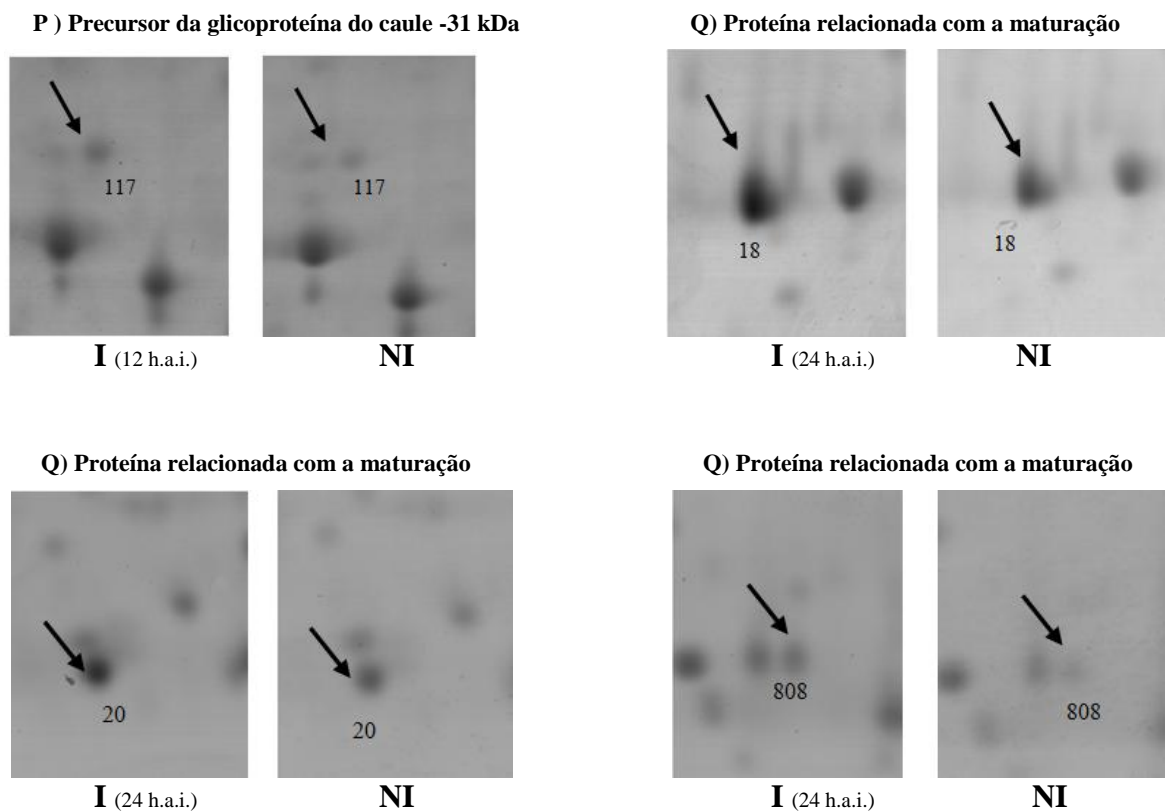


Figura 5. *Spots* diferencialmente expressos no genótipo Conquista inoculado (I) com *Meloidogyne incognita* em comparação com o não inoculado (NI). **A**, S-adenosilmetionina sintase; **B**, Metionina sintase; **C**, Ascorbato Peroxidase 2; **D**, Glutaciona transferase-8; **E**, Isoflavona redutase; **F**, Fosfoglicerato quinase; **G**, Fosfoglicomutase; **H**, ATP sintase subunidade alfa; **I**, 6-Fosfoglucontato desidrogenase; **J**, Transcetolase; **K**, Enolase; **L**, Aldo-ceto redutase; **M**, Aconitato hidratase; **N**, Cafeoil-CoA metiltransferase; **O**, Glutamato desidrogenase 1; **P**, Precursor da glicoproteína do caule -31 kDa; **Q**, Proteína relacionada com a maturação.

Proteínas diferencialmente expressas em resposta à inoculação com *Meloidogyne incognita*

S-adenosilmetionina sintase

Neste trabalho foi observada a presença da enzima S-adenosilmetionina sintase (SAM) apenas nos géis das plantas inoculadas pelo patógeno às 12 h.a.i. evidenciada por meio de 2 *spots* diferenciais indicando serem isoformas (Tabelas 1 e Figura 5A). Essa enzima converte a metionina em S-adenosilmetionina (SAM) e está envolvida na rota metabólica do etileno (Wang et al., 2002; Yang; Hoffman, 1984). Esse hormônio controla muitos estádios do desenvolvimento da planta, tais como, maturação de frutos, senescência de folhas e flores, e também está fortemente correlacionado com a resposta da planta em interações planta-patógeno (Boller, 1991). A maior expressão dessa enzima nesse trabalho

implica numa maior produção do etileno que é importante hormônio vegetal em resposta de defesa de plantas.

Metionina sintase

Houve um aumento de expressão da metionina sintase nas plantas inoculadas 12 h.a.i (Tabela 1 e Figura 5B). A metionina sintase catalisa a penúltima etapa na produção da metionina pela transferência de um grupo metil do 5-metiltetrahidrofolato para homocisteína, formando a metionina que é então catalisada em S- S-adenosilmetionina pela S-adenosilmetionina sintetase (Ravanel et al., 1998).

A metionina é o aminoácido precursor do etileno em todas as plantas superiores. Inicialmente a metionina é catalisada em S-adenosilmetionina pela S-adenosilmetionina sintetase. Posteriormente, S-adenosil-metionina (SAM) é convertido em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) pela ação da enzima ACC sintetase (ACCS). O ACC é então metabolizado pela enzima ACC oxidase (ACCO), por uma reação de oxidação que necessita de O₂ e ferro, que é ativada pelo CO₂ para produzir etileno (Wang et al., 2002, Yang; Hoffman, 1984).

Dessa forma, a metionina sintase e S-adenosilmetionina sintetase (que também foi identificada nesse trabalho) estão envolvidos metabolicamente na biossíntese de etileno. Esse hormônio está fortemente correlacionado com a resposta da planta em interações planta-patógeno (Boller, 1991), controla muitos estádios do desenvolvimento da planta, tais como, maturação de frutos, senescência de folhas e flores. Sua síntese é fortemente estimulada por fatores exógenos, como infecções fúngicas e/ou bacterianas, injúrias mecânicas, estresses hídrico, térmico e salino, e também por outros fitormônios (Wang et al., 2002). . A maior expressão da metionina sintase nesse trabalho implica numa maior produção do etileno que é importante hormônio vegetal em resposta de defesa de plantas

Ascorbato peroxidase 2

Foi verificado um aumento de expressão da ascorbato peroxidase (APx) nas plantas inoculadas 12 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5C). Essa proteína é uma das principais enzimas envolvidas no sistema de detoxificação de espécies reativas de oxigênio nas plantas, catalisando a conversão do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água (Guzzo; Harakava, 2007; Polle, 2001). As isoenzimas APx são distribuídas em quatro compartimentos

celulares distintos e são classificadas de acordo com a localização subcelular, sendo que a APx 2 é localizada no citosol da célula.

A explosão oxidativa e seus intermediários reativos, ocorre após o reconhecimento do patógeno com indução de genes de defesa e morte celular, onde o H_2O_2 age como um sinal para indução de genes de proteção celular nas células vizinhas para restringir o desenvolvimento da lesão em função da resposta de hipersensibilidade (HR), que é, então, acompanhada pelo desenvolvimento de uma resistência sistêmica adquirida (SAR) (Resende et al., 2003). Dessa forma, a APx está envolvida nos mecanismos de proteção da célula vegetal contra os danos provocados pelo estresse oxidativo, minimizando os efeitos tóxicos desses compostos. Em trabalhos que utilizaram a proteômica para investigarem proteínas envolvidas em mecanismos de defesa em soja, foram encontrados resultados semelhantes por Zhang et al. (2011) e por Fan et al. (2012) que avaliaram a resposta de defesa em relação a infecção de *Phytophthora sojae* e lagartas *Prodenia litura*, respectivamente.

Glutathione Transferase 8

As glutathione transferases (GSTs) compreendem uma família de enzimas multifuncionais e são consideradas as principais enzimas detoxificantes com a capacidade de catalisar a conjugação de moléculas eletrofílicas para o tripeptídeo glutathione (GSH; γ -glutamil-cisteína-glicina) (Dixon et al., 2002), tornando-os mais solúveis em água e mais facilmente elimináveis do organismo. Em plantas foram confirmadas e nomeadas seis classes de GST: Phi, Tau, Theta, Zeta, Lambda e DHAR (Dixon et al., 2002). A expressão das diversas classes de GSTs de vegetais é altamente variável de acordo com o tecido e com condições ambientais (Soranzo et al., 2004). A classe que foi encontrada nesse estudo foi a GST Tau que também é caracterizada como GST-8 (Tabela 1 e Figura 5D). Essa enzima foi identificada 12 h.a.i. em plantas inoculadas e não inoculadas. Contudo, percebeu-se uma pequena modificação quanto ao ponto isoelétrico, caracterizando uma possível modificação pós-traducional.

Essa classe enzimática é composta de proteínas diméricas e solúveis (Dixon et al., 2002). Elas apresentam dois sítios ativos por dímero cujas atividades são independentes entre si. Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de ligação, um para a glutathione (GSH) que é muito específico, e outro sítio de ligação com menor especificidade

para os eletrófilos (Danielson; Mannervik, 1985). Elas foram primeiramente identificadas como sendo induzidas por auxinas, e também tem sido demonstrado estar envolvida na resposta de uma variedade de estresses endógenos e exógenos, incluindo ataque de patógenos, ferimentos, toxicidade de metais pesados e temperatura (Edwards et al., 2000). Mukherjee et al. (2010) e Ahsan et al. (2008) verificaram a maior expressão dessas proteínas em resposta a estresses biótico e abiótico, respectivamente.

Isoflavona redutase

A isoflavona redutase apresentou-se mais expressa nos tempos 12 e 48 h.a.i. nas plantas inoculadas em relação aos controles. Já no tempo 24 h.a.i. foram detectados dois *spots* diferenciais expressos apenas nas plantas inoculadas (Tabela 1 e Figura 5E). Essa enzima é específica da via de biossíntese dos isoflavonóides (Zabala et al., 2006) e é encontrada tipicamente em leguminosas. Ela catalisa uma redução NADPH-dependente, envolvida na biossíntese de compostos derivados da via dos fenilpropanóides. A maior expressão dessa enzima indica que flavonóides tem um papel importante nessa relação planta-patógeno estudada. França et al. (2001) também evidenciaram a importância dessa enzima no sistema de defesa das plantas.

Fosfoglicerato quinase

A fosfoglicerato quinase (PGK) apresentou-se diferencialmente expressa 12 e 48 h.a.i. nos géis das plantas inoculadas. Nos tempo 12 e 24 h.a.i. ela foi mais expressa nas plantas inoculadas quando comparadas ao controle e no tempo 48 h.a.i. ela foi identificada apenas nas plantas inoculadas (Tabela 1 e Figura 5F). Essa proteína foi identificada nos tempos 12 e 24 h.a.i por meio de *spots* correspondentes que apresentaram mesma MW e PI. Ela também foi identificada em dois outros *spots* diferenciais no tempo 12 e 48 h.a.i. com MW e PI diferentes dos *spots* mencionados anteriormente, indicando que podem ser isoformas diferentes ou terem passado por modificações pós-traducionais.

Essa enzima atua na via glicolítica na conversão do 1,3-bisfosfoglicerato em 3-fosfoglicerato, que resulta na produção de uma molécula de ATP. Mutuko e Nose (2012) avaliaram plantas de arroz (*Oryza sativa*) infectadas com *Rhizoctonia solani* e verificaram um aumento da atividade enzimática da PGK. Proteínas quinases tem um papel central

durante o reconhecimento do patógeno e na ativação de mecanismos de defesa de plantas (Hammond-Kosack; Jones, 1997).

Fosfoglicomutase

A fosfoglicomutase foi mais expressa nas plantas inoculadas 12 h.a.i. identificadas por 2 *spots* evidenciando a possibilidade de serem isoformas dessa enzima (Tabela 1 e Figura 5G). Ela é uma isomerase que atua na transferência de grupamento fosfato na conversão de glicose-1P para glicose-6P, tendo função importante no metabolismo de células vegetais (Dai et al., 1992). O aumento na expressão dessa enzima sugere que a demanda de energia aumenta na forma de ATP para a célula.

ATP sintase subunidade Alfa

Foi observado aumento da expressão da enzima ATP sintase subunidade alfa nos géis das plantas inoculadas 24 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5H). A ATP sintase é uma enzima capaz de sintetizar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico durante a fosforilação oxidativa e a fotossíntese (Zhang et al., 2006). Presentes tanto em mitocôndrias quanto em cloroplasto, elas são compostas por dois componentes F1 e F0 (Johnson 2008), sendo que as subunidades alfa e beta formam o núcleo catalítico em F1, onde ocorre a síntese de ATP (Avni et al., 1991). Essa enzima foi mais expressa nas plantas inoculadas pelo patógeno possivelmente devido à alta energia requerida durante o processo de infecção. Trabalhos semelhantes evidenciaram esse mesmo tipo de regulação, tanto em estresse biótico (Liu et al., 2011) quanto abiótico (Gao et al 2011; Yıldırım et al., 2011).

6-Fosfogluconato desidrogenase

Foi observada que a enzima 6-Fosfogluconato desidrogenase (6PGD) teve sua expressão aumentada em plantas inoculadas 12 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5I). A 6PGD é a segunda desidrogenase da via das pentoses que é uma rota alternativa para o metabolismo de glicose. Ela catalisa a descarboxilação oxidativa do 6-fosfogluconato a ribulose-5-fostato, com a concomitante geração de CO₂ e NADPH durante a fase oxidativa da via das pentoses. Nesse estudo, essa proteína foi mais expressa em plantas inoculadas 12 h.a.i. sugerindo um redirecionamento do fluxo metabólico para a via das pentoses. Corroborando com esse resultado, Wang et al. (2011) também observaram aumento na expressão dessa

enzima sob estresse causado pelo fungo *Verticillium dahlia* em raízes de algodão. Pode-se inferir que o aumento dessa enzima esteja correlacionado com a proteção celular contra o estresse oxidativo por espécies reativas, pois o NADPH produzido detoxifica e regenera a forma reduzida da glutathione que é uma das principais enzimas antioxidantes (Frosali et al., 2004).

Transcetolase

A transcetolase apresentou-se mais expressa nas plantas inoculadas 12 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5J). Essa enzima participa da fase não oxidativa da via das pentoses promovendo a transferência reversível de um grupo cetol de 2 carbonos da xilulose-5-P a um receptor aldose. Juntamente com a enzima transaldolase, promove uma ligação entre as vias glicolíticas e das pentoses-P. Wang et al. (2011) observaram aumento na expressão dessa enzima sob estresse causado pelo patógeno *Verticillium dahlia* em raízes de algodão.

Enolase

A enolase é uma enzima envolvida na via glicolítica realizando a conversão de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. Os resultados desse trabalho mostraram que essa enzima foi induzida em resposta à inoculação do patógeno 12 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5K). Baseado em evidências de géis 2D, essa enzima também foi induzida em resposta a estresse abióticos como seca em arroz e milho (Salekdeh et al., 2002; Lal et al., 1998) e também por estresse biótico por meio da infecção da bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. em oliveira (Campos et al., 2009). Segundo esses últimos autores, o aumento da expressão foi considerado tão alto que os levaram a concluir que tal proteína pudesse ser um possível marcador molecular envolvido na interação analisada.

Aldo ceto redutase

Um *spot* identificado como a enzima aldo-ceto redutase (AKR) foi detectado tendo a expressão aumentada nas plantas inoculadas 12 e 24 h.a.i. em posições correspondentes dos géis 2D (Tabela 1 e Figura 5L). AKR são enzimas amplamente distribuídas na natureza que possuem vários papéis no metabolismo de esteróides, açúcares e compostos carbonílicos. Essas proteínas também atuam no metabolismo de compostos tóxicos endógenos e exógenos, incluindo aqueles produzidos em situações de estresse. Foi sugerido

que o papel primário dessas enzimas seria de detoxificar as células de vários aldeídos e cetonas tóxicos produzidos durante situações de estresse (Simpson et al., 2009).

Aconitato hidratase

A aconitato hidratase apresentou-se mais expressa nas plantas inoculadas 12 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5M) Essa enzima, também conhecida por aconitase, catalisa a estereoisomerização do citrato para o isocitrato, por meio da formação intermediária do cis-aconitato no ciclo de ácido tricarbóxico (Beinert; Kennedy, 1993). Sua maior expressão sugere que as plantas precisam de mais energia para enfrentar o estresse causado pelo patógeno e suprir as mudanças metabólicas necessárias para a defesa celular. Estas observações foram consistentes com Cui et al. (2005) que observaram um aumento da expressão de duas vezes dessa enzima em raízes plantas de arroz acometidas por estresse a baixa temperatura.

Cafeoil-CoA metiltransferase

A enzima Cafeoil-CoA metiltransferase (CCoOAMT) foi mais expressa nas plantas inoculadas 48 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5N). Esta enzima está envolvida na biossíntese de lignina, catalisando a metilação dos ésteres cafeoil CoA e 5-hidroxiferuloil CoA a feruloil CoA e sinapoil CoA, respectivamente, que são reações intermediárias no processo da biossíntese da lignina (Ferrer et al., 2005).

Esta enzima está diretamente relacionada com a função de defesa das plantas, sendo que seus produtos (feruloil CoA e sinapoil CoA) são utilizados no enrijecimento da parede celular. Em relações incompatíveis patógeno-hospedeiro, a expressão de cafeoil-CoA metiltransferase é induzida poucas horas após a inoculação do patógeno causando reação de hipersensibilidade e morte celular programada. Em estudo de Liu et al. (2011) sobre a interação entre soja e o nematoide *Heterodera glycines* a expressão dessa enzima foi induzida. Os autores utilizaram a proteômica diferencial para identificação das proteínas e afirmam que a cafeoil-CoA metiltransferase está relacionada com a resistência ao nematoide de cisto da soja.

Glutamato desidrogenase 1

Neste trabalho foi encontrada uma diminuição da expressão da enzima glutamato desidrogenase 1 (GDH-1) nos tempos 24 e 48 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5O). Essa enzima

catalisa a reação reversível de aminação/desaminação que pode levar tanto a síntese quanto ao catabolismo do glutamato, envolvendo ácido α -cetogluturato e íons amônio (Dixon; Webb, 1964). Existem pelo menos dois genes de GDH em plantas, cada um codificando para um polipeptídeo distinto, chamados de subunidades α e β (Purnel et al., 2005). Essa enzima, juntamente com a glutamina sintase, está envolvida na manutenção e balanço de carbono e nitrogênio em plantas (Mifflin et al., 2002). O estresse causado pela inoculação do patógeno afeta o metabolismo desse aminoácido diminuindo a expressão da enzima. Em estudo de Yıldıırım et al. (2011) também foi verificada redução na expressão dessa enzima em função da exposição de níveis tóxicos do metal pesado chumbo à espécie *Phanerochaete chrysosporium*.

Precursor da glicoproteína do caule - 31 KDa

Nesse trabalho, foi evidenciado aumento da expressão da proteína precursora da glicoproteína do caule 12 h.a.i. nas plantas inoculadas (Tabela 1 e Figura 5P). Essa proteína também é conhecida como proteína de reserva vegetativa (*vegetative storage protein - VSP*). Durante a formação da semente estas proteínas são degradadas para suprir a semente com o nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento (Wittenbach, 1983; Staswick, 1994). Em geral, elas são sujeitas a regulação por açúcares, luz, fosfato, nitrogênio, ferimento, auxinas e jasmonatos (Mason; Mullet, 1990; Mason et al., 1992; Berger et al., 1995).

Em relação a interação planta patógeno, a ativação das proteínas de armazenamento vegetativo pode ser correlacionada com aumento dos níveis de ácido jasmônico e metil jasmonato em função do ataque de patógenos ou após algum ferimento (Benedetti et al., 1995; Devoto; Turner, 2005).

Proteína relacionada com a maturação

A proteína relacionada com a maturação "*Ripening related protein*" foi mais expressa 12 e 24 h.a.i. nas plantas inoculadas e um outro *spot* representado por uma isoforma diferencial foi identificado apenas nos géis de plantas inoculadas 24 h.a.i. (Tabela 1 e Figura 5Q). Essa proteína está envolvida principalmente nos processos de amadurecimento e maturação de plantas (Frenkel et al., 1968), mas também apresenta uma correlação entre os seus níveis e os de etileno (Kevany et al., 2007). Uma possível explicação para o aumento da expressão dessa proteína pode ser devido a um aumento na concentração de etileno sob a presença do patógeno. Resultados semelhantes foram

encontrados por Curto et al. (2006) e por Die et al. (2007) em resposta a interação planta-parasita.

Outras Proteínas

Algumas outras proteínas foram identificadas sendo mais expressas nas plantas inoculadas como 6'- deoxichalcona sintase, Fator de elongação 1 Delta, Precursor coper amino oxidase, Proteína Ran-3, Benzil álcool O- benzoiltransferase, Peroxisomal betaína-aldeído desidrogenase.

CONCLUSÕES

1. A técnica utilizada mostrou-se eficaz para a identificação de proteínas diferencialmente expressas permitindo a verificação de alterações metabólicas em raízes de soja em resposta à infecção por *Meloidogyne incognita*.
2. Foram encontrados 45 *spots* diferencialmente expressos em raízes de soja, sendo 35 identificados por espectrometria de massa, o que levou a identificação de 17 proteínas.
3. A resposta do hospedeiro ao processo infeccioso ocorreu principalmente nos primeiros tempos avaliados (12 e 24 h.a.i.).
4. Foi possível a identificação de proteínas envolvidas no metabolismo de espécies reativas de oxigênio (glutathione transferase e ascorbato peroxidase 2); proteínas envolvidas com a produção de hormônios vegetais como etileno e ácido jasmônico (proteína relacionada à maturação, precursor da glicoproteína de 31kDa do caule); biossíntese de lignina (Caffeoyl-CoA metiltransferase); metabolismo de aminoácidos (metionina sintase, glutamato desidrogenase); metabolismo energético (aconitato hidratase, enolase, transcetolase, 6 fosfogluconato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, fosfoglicomutase, ATP sintase subunidade alfa); e processo de oxido-redução (Isoflavona reductase).
5. Este estudo aprofundou os conhecimentos dos mecanismos de defesa da soja em relação ao nematoide de galha *M. incognita* do ponto de vista fisiológico, bioquímico e genético, e pode auxiliar o desenvolvimento de cultivares resistentes a esse patógeno, bem como fornecer proteínas/genes candidatos de interesse para a pesquisa de genótipos transgênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHSAN, N.; LEE, D.G.; ALAM, I.; KIM, P.J.; LEE, J.J.; AHN, Y.O.; KWAK, S.S.; LEE, I.J.; BAHK, J.D.; KANG, K.Y.; RENAUT, J.; KOMATSU, S.; LEE, B.H. Comparative proteomic study of arsenic-induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. **Proteomics**, v.8, n.17, p.3561-3576, 2008.

AVNI, A.; AVITAL, S.; GROMET-ELHANAN, Z. Reactivation of the chloroplast CF1-ATPase beta subunit by trace amounts of the CF1 alpha subunit suggests a chaperonin-like activity for CF1 alpha. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.7317-7320, 1991.

BEINERT, H.; KENNEDY, M. Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. **FASEB Journal**, v.7, p.1442-1449, 1993.

BENEDETTI, C.E.; XIE, D.X.; TURNER, J.G. Coi1-dependent expression of an Arabidopsis vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v.109, p.567-572, 1995.

BERGER, S.; BELL, E.; SADKA, A.; MULLET, J.E. Arabidopsis thaliana Atvsp is homologous to soybean VspA and VspB, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. **Plant Molecular Biology**, v.27, p.933-942, 1995.

BOLLER, T. Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In: Matoo, A. K.; Suttle, J.C. (Ed.). **The plant hormone ethylene**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p 293-314.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CAMPOS, A.; COSTA, G.; COELHO, A.V.; FEVEREIRO, P. Identification of bacterial protein markers and enolase as a plant response protein in the infection of *Olea europaea* subsp. *europaea* by *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*. **European Journal of Plant Pathology**, v.125, p.603-616, 2009.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Central de Informações Agropecuárias**: Safras 2011. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: Março de 2012.

CUI, S.; HUANG, F.; WANG, J.; XIAO, M.; CHENG, Y.; LIU, J. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. **Proteomics**, v.5 p.3162-3172, 2005.

CURTO, M.; CAMAFEITA, E.; LOPEZ, J.A.; MALDONADO, A.M.; RUBIALES, D.; JORRÍN, V. A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). **Proteomics**, v.6, p.163-174, 2006.

DAI, J. B. et al.

DAI, J.B.; LIU, Y.; RAY, W.J, JR.; KONNO, M. The crystal structure of muscle phosphoglucosmutase refined at 2.7-angstrom resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.6322-6337, 1992.

DALL'AGNOL, A. **Perspectivas da Soja Brasileira - Embrapa Soja 2006**. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&&idT=831>>. Acesso em: 05 dez. 2006.

DANIELSON, U.H.; MANNERVIK, B. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. **Biochemical Journal**, v.23, n.2, p.263-267.

DEVOTO, A.; TURNER, J.G. Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.123, p.161-172, 2005.

DIE, J.V.; DITA, M.A.; KRAJINSKI, F.; GONZÁLEZ-VERDEJO, C.I.; RUBIALES, D.; MORENO, M.T.; ROMÁN, B. Identification by suppression subtractive hybridization and expression analysis of *Medicago truncatula* putative defense genes in response to *Orobanche crenata* parasitization. **Physiology Molecular and Plant Pathology**, v.70, p.49-59, 2007.

DIXON, D.P.; LAPHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, v.3, p.1-10, 2002.

DIXON, M.; WEBB, E.C. **Enzymes**. 2.ed. New York, Academic Press, 1964. 950p.

EDWARDS, R.; DIXON, D. P.; WALBOT, V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and health. **Trends in Plant Science**, v.5, n.5, p.193-198, 2000.

FAN, R.; WANG, H.; WANG, Y.; YU, D. Proteomic analysis of soybean defense response induced by cotton worm (*prodenia litura*, fabricius) feeding. **Proteome Science**, v.10, p.16, 2012.

FERRER, J.L.; ZUBIETA, C.; DIXON, R.A.; NOEL, J.P. Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. **Plant Physiology**, v.137, p.1009-1017, 2005.

FRANÇA, S.C.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M. A.; PUGA, R. D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J. O. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.243-250, 2001.

FRENKEL, C.; KLEIN I.; DILLEY, D.R. Protein synthesis in relation to ripening of pome fruits. **Plant Physiology**, v.13, p.1146-1153, 1968.

FROSALI, S.; DI SIMPLICIO, P.; PERRONE, S.; DI GIUSEPPE, D.; LONGINI, M.; TANGANELLI, D.; BUONOCORE, G. Glutathione recycling and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of term and preterm newborns at birth. **Biology of the Neonate**, v.85, p.188-194, 2004.

GAO, L.; YAN, X.; LI, X.; GUO, G.; HU, Y.; MA, W.; YAN, Y. Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). **Phytochemistry**, v.72, n.10, p.1180-91, 2011.

GUZZO, S.D.; HARAKAVA, R. Mecanismos envolvidos na resistência induzida em plantas a doenças: sinalização e expressão de genes de defesa. In: RODRIGUES, F.A.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa, MG, cap. 12, p.281- 301, 2007.

HAMMOND-KOSACK, K.E.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.575-607, 1997.

JOHNSON, E.A. Altered expression of the chloroplast ATP synthase through site-directed mutagenesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Photosynthesis Research**, v.96, p.153-162, 2008.

KEVANY, B.M.; TIEMAN, D.M.; TAYLOR, M.G.; CIN, V.D.; KLEE, H.J. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. **Plant Journal**, v.51, p.458-467, 2007.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LAL, S.K.; LEE, C.; SACHS, M.M. **Plant Physiology**, v. 118, p.1285-1293, 1998.

LIU, D.; CHEN, L.; DUAN, Y. Differential Proteomic Analysis of the Resistant Soybean Infected by Soybean Cyst Nematode, *Heterodera glycines* Race 3. **Journal of Agricultural Science**, v.3, n.4, p.160-167, 2011.

MASON, H.S.; DEWALD, D.B.; CREELMAN, R.A.; MULLET, J.E. Coregulation of soybean vegetative storage protein gene expression by methyl jasmonate and soluble sugars. **Plant Physiology**, v.98, n.3, p.859-867, 1992.

MASON, H.S.; MULLET, J.E. Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. **Plant Cell**, v.2, n.6, p.569-79, 1990.

MATRIX SCIENCE. Disponível em: <<http://www.matrixscience.com/>>. Acesso em: 08 Jun. 2012.

MIFLIN, B.J.; HABASH, D.Z. **Journal Exp. Bot.** The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. v.53, p.979-987, 2002.

MUKHERJEE, A.K.; CARP, M.J.; ZUCHMAN, R.; ZIV, T.; HORWITZ, BA.; GEPSTEIN, S. Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. **Journal of Proteomic**, v.73, p.709 -720, 2010.

MUTUKU, J.M.; NOSE, A. Changes in the contents of metabolites and enzyme activities in rice plants responding to *Rhizoctonia solani* Kuhn infection: activation of glycolysis and connection to phenylpropanoid pathway. **Plant and Cell Physiology**, v.53, n.6, p.1017-1032, 2012.

NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic Analysis. **Electrophoresis**, v.6, p.427-448, 1985.

PHYTOZOME. Disponível em: <<http://www.phytozome.com/>>. Acesso em: 08 Jun. 2012.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, v.126, p.445-462, 2001.

PURNELL, M.P.; SKOPELITIS, D.S.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; BOTELLA, J.R. Modulation of higher-plant NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase activity in transgenic tobacco via alteration of beta subunit levels. **Planta**, v.222, p.167-180, 2005.

RAVANEL, S.; GAKIERE, B.; JOB, D.; DOUCE, R. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 95, v.13, p.7805-7812, 1998.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. Reactive oxygen species on plant defense responses to pathogens. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.2, p.123-130, p. 2003.

ROESSING, A.C.; GUEDES, L.C.A. Aspectos econômicos do complexo soja: sua participação na economia brasileira e evolução na região central. In: ARANTES, N.E.; SOUZA, P.I.M. (Eds.). **A cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. p.1-69.

SALEKDEH, G.H.; SIOPONGCO, J.; WADE, L.J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. **Proteomics**, v.2, p.1131-1145, 2002.

SARMA, A.D.; OEHRLE, N.W.; EMERICH, D.W. Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v.379, p.192-195, 2008.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature**, v.1, n.6, p.2856-2860, 2006.

SIMPSON, P.J.; TANTITADAPITAK, C.; REED, A.M.; MATHER, O.C.; BUNCE, C.M.; WHITE, S.A.; RIDE, J.P. Characterization of two novel aldo-keto reductases from *Arabidopsis*: expression patterns, broad substrate specificity, and an open active-site structure suggest a role in toxicant metabolism following stress. **Journal of Molecular Biology**, v.392, n.2, p.465-80. 2009.

SORANZO, N.; SARI-GORLA, M.; MIZZI, L.; TOMA, G.; FROVA, C. Organization and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. **Molecular Genetics and Genomics**, v.271, n.5, p.511-521, 2001.

STASWICK, P.E. Storage proteins of vegetative plant tissues. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p.303-322, 1994.

WANG, F.X.; MA, Y.P.; YANG, C.L.; ZHAO, P.M.; YAO, Y.; JIAN, G.L.; LUO, Y.M., XIA, G.X. Proteomic analysis of the sea-island cotton roots infected by wilt pathogen *Verticillium dahlia*. **Proteomics**, v.11, p.4296-309, 2011.

WANG, K.L.C.; LI, H.; ECKER, J.R. Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. **Plant Cell**, v.14, S131 - S151, 2002.

WITTENBACH, V.A. Purification and characterization of a soybean leaf storage glycoprotein. **Plant Physiology**, v.73, p.125-129, 1983.

YANG, S.F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35, p.155-189, 1984.

YILDIRIM, V.; OZCAN, S.; BECHER, D.; BUTTNER, K.; HECKER, M.; OZCENGIZ, G. Characterization of proteome alterations in *Phanerochaete chrysosporium* in response to lead exposure. **Proteome Science**, v. 9, p.1-12, 2011.

YORINORI, J.T. Situação atual das doenças potenciais no cone sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, II, 2002, Foz do Iguaçu. **Anais...** Londrina: Embrapa CNPSoja, 2002. p.171-187.

ZHANG, X.; TAKANO, T.; LIU, S. Identification of mitochondrial ATP synthase small subunit gene (*RMtATP6*) expressed in response to salts and osmotic stresses in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.57, n. 1, p.193-200, 2006.

ZHANG, Y.M.; ZHAO, JIN, M.; XIANG, Y.; BIAN, X.C.; ZUO, Q.M.; SHEN, Q.; GAI, J.Y.; XING, H. Proteomics study of changes in soybean lines resistant and sensitive to *Phytophthora sojae*. **Proteome Science**, v. 9, p.52, 2011.