

BRUNO SOARES LAURINDO

**ANÁLISE PROTEÔMICA DA RESISTÊNCIA À REQUEIMA EM
TOMATEIRO**

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
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L385a
2017 Laurindo, Bruno Soares, 1985-
Análise proteômica da resistência à requeima em
tomateiro / Bruno Soares Laurindo. - Viçosa, MG, 2017.
xvi, 92f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Derly José Henriques da Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Solanum lycopersicum*. 2. Tomate. 3.
Phytophthora infestans. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-
graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 22 ed. 635.642

BRUNO SOARES LAURINDO

**ANÁLISE PROTEÔMICA DA RESISTÊNCIA À REQUEIMA EM
TOMATEIRO**

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*.

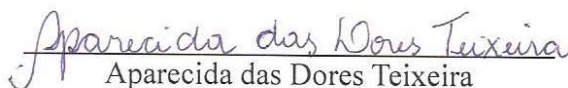
APROVADA: 13 de julho de 2017.



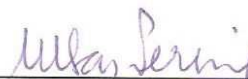
Antônio Carlos Baião de Oliveira



Camilo Elber Vital



Aparecida das Dores Teixeira



Maria Cristina Baracat Pereira
(Coorientadora)



Derly José Henriques da Silva
(Orientador)

BRUNO SOARES LAURINDO

**ANÁLISE PROTEÔMICA DA RESISTÊNCIA À REQUEIMA EM
TOMATEIRO**

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 julho de 2017.

Antônio Carlos Baião de Oliveira

Camilo Elber Vital

Aparecida das Dores Teixeira

Maria Cristina Baracat Pereira
(Coorientadora)

Derly José Henriques da Silva
(Orientador)

*Aos meus pais,
Liacir Laurindo da Silva (in memoriam) e
Elza Maria Soares da Silva, que viveram
este sonho tanto quanto eu.
À minha esposa Renata, pelo apoio
incondicional.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pela força que permitiu que eu chegasse até aqui.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

Ao Professor Derly José Henriques da Silva, pela orientação, ensinamentos, amizade e paciência, tornando-se mais que um orientador, um “pai”.

À Professora Maria Cristina Baracat-Pereira pelos ensinamentos e colaboração.

Aos pesquisadores Camilo Elber Vital, Antônio Carlos Baião de Oliveira e Aparecida das Dores Teixeira pela disponibilidade em integrar a comissão examinadora e pelas sugestões para o enriquecimento do trabalho.

A todos amigos que fazem ou fizeram parte do Núcleo de Estudos em Olericultura (NEO), pela troca de experiências e pelo longo tempo de boa convivência.

Aos amigos do Laboratório de Proteômica e Bioquímica de Proteínas e do NuBioMol, em especial à Patrícia Fontes, Camilo Elber, Edvaldo Barros e Rafael Torres pela disponibilidade e colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu pai Liacir Laurindo da Silva (*in memoriam*), que em quanto entre nós, idealizava esse sonho.

À minha mãe Elza Maria Soares da Silva, pelo incentivo incondicional para que todos os nossos sonhos se tornassem realidade.

À minha esposa Renata Dias Freitas Laurindo, pelo amor e carinho, uma verdadeira companheira de todos os momentos.

À minha sobrinha Laís, pelos momentos de descontração e alegria.

Aos amigos Doce e Nana, Gutierrez e Marcela, Júnior Caiafa e Sara, Tiago e Jaqueline, David, Otávio (Gu), Pedro, Alisson, Gilsão, João Paulo, por todos esses longos anos de convivência, responsáveis por parte dos melhores momentos da minha vida.

A todos os meus familiares, pelo incentivo.

Aos funcionários da Universidade Federal de Viçosa, pelos favores prestados durante a realização do curso.

A todos os demais, que de alguma forma contribuíram para conclusão deste trabalho.

Obrigado!

BIOGRAFIA

BRUNO SOARES LAURINDO, filho de Liacir Laurindo da Silva e Elza Maria Soares da Silva, nasceu em 22 de agosto de 1985, na cidade de Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil.

Em fevereiro de 2006, formou-se Técnico em Agropecuária pela Central de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal, UFV - Campus Florestal, em Florestal, Minas Gerais.

Em março de 2007, iniciou o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, colando grau em julho de 2011.

Em agosto de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, em nível de Mestrado, da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em julho de 2013.

Em agosto de 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Doutorado, da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da tese em julho de 2017.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Importância socioeconômica da tomaticultura.....	3
2.2 Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa	4
2.3 Requeima do tomateiro	6
2.4 Proteômica de plantas	9
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO I - Análise comparativa do proteoma constitutivo de genótipos de tomateiro contrastantes quanto à resistência à requeima	19
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Recursos fitogenéticos e condução do experimento	24
2.2 Análise proteômica.....	24
2.2.1 Extração e quantificação de proteínas.....	24
2.2.2 Eletroforese bidimensional (2-DE)	25
2.2.3 Aquisição e análise de imagens dos géis 2-DE	26
2.2.4 Tripsinização das amostras.....	26
2.2.5 Espectrometria de massas e identificação de proteínas	27
2.3 Atividade enzimática para validação de duas proteínas identificadas	28
2.3.1 Preparo dos extratos vegetais e quantificação de proteínas	28
2.3.2 Atividade de peroxidases	28
2.3.3 Atividade de quitinases	28
2.4 Análises de bioinformática.....	29
2.5 Análise da expressão relativa de proteínas por PCR em tempo real (RT-PCR)29	
3. RESULTADOS	31
3.1 Análise do perfil proteico constitutivo	31
3.2 Análise da atividade enzimática	36

3.3 Correlação entre mRNA e abundância de proteínas	36
4. DISCUSSÃO	37
4.1 Proteínas relacionadas a energia e metabolismo	37
4.2 Proteínas relacionadas à fotossíntese	38
4.3 Proteínas relacionadas ao estresse e defesa.....	39
4.4 Proteínas relacionadas à transcrição e outras proteínas	42
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
CAPÍTULO II- Proteômica comparativa revela proteínas relacionadas ao estresse oxidativo e da família taumatina associadas à resistência do tomateiro à requeima.....	
	51
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1 Recursos fitogenéticos e condução do experimento	56
2.2 Inoculação do patógeno, coleta das amostras para análises moleculares e avaliação da severidade da requeima	56
2.3 Análise proteômica.....	58
2.3.1 Extração e quantificação de proteínas.....	58
2.3.2 Eletroforese bidimensional (2-DE)	58
2.3.3 Aquisição e análise de imagens dos géis 2-DE	59
2.3.4 Tripsinização das amostras.....	59
2.3.5 Espectrometria de massas e identificação de proteínas	60
2.4 Análises de bioinformática.....	61
2.5 Extração de RNA total e análise da expressão relativa de proteínas por PCR em tempo real.....	62
3. RESULTADOS	64
3.1 Avaliação fenotípica em resposta à requeima	64
3.2 Análise do perfil de proteínas em resposta à requeima.....	64
3.3 Correlação entre mRNA e abundância de proteínas	73
3.4 Análise de redes da interação proteína-proteína.....	74
4. DISCUSSÃO	76
4.1 Avaliação fenotípica da resistência a requeima.....	76
4.2 Respostas proteômicas de genótipos contrastantes quanto a resistência à requeima.....	76

4.3 Proteínas relacionadas à energia e metabolismo	77
4.4 Proteínas relacionadas à fotossíntese	78
4.5 Proteínas relacionadas ao estresse e à defesa	79
4.6 Proteínas relacionadas à transcrição.....	82
4.7 Rede de interação proteína-proteína.....	83
5. CONCLUSÕES	84
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Géis bidimensionais representativos do extrato de folhas de tomateiro em IPG pH 3 a 10 e SDS-PAGE 12,5% em gel de 24 cm, com *spots* diferencialmente abundantes identificados e seus respectivos números de identificação (ID conforme Tabela 1) para comparação entre os ge genótipos Santa Clara (A) e BGH-2127 (B), suscetível e resistente à requeima respectivamente. pI: ponto isoelétrico; MM: massas moleculares. 31
- Figura 2.** Distribuição dos grupos de funções biológicas das proteínas diferencialmente abundantes entre os genótipos BGH-2127 (resistente) e Santa Clara (suscetível) de acordo com *software Mapman*. 34
- Figura 3.** Nível de abundância de proteínas entre os genótipos BGH-2127 (resistente) e Santa Clara (suscetível). 35
- Figura 4.** *Spots* das proteínas 2-cis peroxirredoxina BAS1 (*spot* 44) e tiorredoxina peroxidase (*spot* 48) diferencialmente abundantes entre os genótipos BGH-2127 (resistente) e Santa Clara (suscetível). 40
- Figura 5.** *Spots* da proteína endoquitinase ácida de 26 kDa (*spot* 65) diferencialmente abundante entre os genótipos BGH-2127 (resistente) e Santa Clara (suscetível). 40

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o BGH-2127 e Santa Clara, avaliados quanto a resistência à requeima (*Phytophthora infestans*)... 64
- Figura 2.** Géis bidimensionais representativos do extrato de folhas de tomateiro em IPG pH 3 a 10 e SDS-PAGE 12,5% em gel de 24 cm. Os *spots* diferencialmente abundantes e seus respectivos ID para os genótipos Santa Clara (A) e BGH 2127 (B) nos tempos 0 (azul), 2 (vermelho) e 48 (verde) horas após a inoculação com *P. infestans*. pI: ponto isoelétrico; MM: massas moleculares. 65
- Figura 3.** Distribuição dos grupos de funções biológicas das proteínas diferencialmente abundantes identificadas para os genótipos Santa Clara (A) e BGH-2127 (B) de acordo com *software Mapman*. 65

Figura 4. Abundância relativa (% volume) das proteínas diferencialmente abundantes considerando tratamentos inoculados e não inoculados com <i>P. infestans</i> no genótipo Santa Clara.	71
Figura 5. Abundância relativa (% volume) das proteínas diferencialmente abundantes considerando tratamentos inoculados e não inoculados com <i>P. infestans</i> no genótipo BGH-2127.	72
Figura 6. Rede de interação proteína-proteína analisadas pelo <i>software String</i> a partir de proteínas diferencialmente abundantes para o genótipo Santa Clara inoculado e não inoculado. Linhas de diferentes cores representam evidências de associações, conforme legenda.	74
Figura 7. Rede de interação proteína-proteína analisadas pelo <i>software String</i> a partir de proteínas diferencialmente abundantes para o genótipo BGH-2127 inoculado e não inoculado. Linhas de diferentes cores representam evidências de associações, conforme legenda.	75
Figura 8. <i>Spots</i> das proteínas 2-cis peroxirredoxina BAS1 (<i>spots</i> 44 e 213) e 2-cis peroxirredoxina (<i>spot</i> 53) diferencialmente abundantes no genótipo BGH-2127 no tempo 0 horas após a inoculação (T0 I) e controle não inoculado (T0 NI).	80
Figura 9. <i>Spots</i> da proteína taumatina diferencialmente abundantes no genótipo BGH-2127 no tempo 48 horas após a inoculação (T48 I) e controle não inoculado (T48 NI).	81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Proteínas diferencialmente abundantes em folhas de tomateiro dos genótipos BGH-2127 e Santa Clara, resistente e suscetível à requeima respectivamente, identificadas por espectrometria de massas. 32

CAPÍTULO II

Tabela 1. Proteínas diferencialmente abundantes no genótipo suscetível Santa Clara após inoculação com *P. infestans* identificadas por espectrometria de massas..... 66

Tabela 2. Proteínas diferencialmente abundantes no genótipo resistente BGH-2127 após inoculação com *P. infestans* identificadas por espectrometria de massas. 68

RESUMO

LAURINDO, Bruno Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Análise proteômica da resistência à requeima em tomateiro.** Orientador: Derly José Henriques da Silva. Coorientadores: Maria Cristina Baracat Pereira e Carlos Nick Gomes.

O cultivo do tomateiro possui relevante importância sócio-econômica na agricultura brasileira. Mesmo diante deste cenário favorável, a tomaticultura é considerada uma atividade de elevado risco econômico e de grande complexidade agrônômica. Dentre os principais problemas, destaca-se a requeima, causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. O controle da doença é altamente dependente do uso de agrotóxicos, pois a maioria dos cultivares de tomateiro não são resistentes. Na tentativa de reverter esse quadro, a principal alternativa é a transferência de genes de resistência presentes em acessos de tomateiro conservados em Bancos de Germoplasma. Assim, após oito anos de pesquisas foi selecionado o acesso BGH-2127 (*Solanum lycopersicum*), como fontes de resistência a requeima, dentre os 870 acessos de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV). Pelo fato da resistência ser quantitativa, torna-se difícil a avaliação e seleção fenotípica de genótipos superiores, feita apenas no campo ou em associação com marcadores moleculares genéticos tipo QTL. Neste contexto, a metodologia da análise proteômica torna-se uma alternativa viável, pois pode fornecer importantes informações e ferramentas para maior entendimento das rotas metabólicas da interação planta-patógeno e assim auxiliar no desenvolvimento de futuras estratégias para o desenvolvimento de cultivares de tomateiro resistentes. Com o auxílio de ferramentas proteômica, os objetivos deste estudo foram: analisar possíveis diferenças entre os proteomas constitutivos de genótipos de tomateiro contrastantes quanto a resistência à requeima; e identificar proteínas frente a infecção do patógeno que possam explicar possíveis mecanismos moleculares de resistência do tomateiro a esta doença. Foram avaliados o acesso BGH-2127 e o cultivar Santa Clara, resistente e suscetível à requeima, respectivamente. Para avaliação do proteoma constitutivo, as proteínas foram extraídas de amostras das folhas dos genótipos sem que tivesse ocorrido a inoculação, apenas comparando a constituição proteica do BGH-2127 e do Santa Clara. Na avaliação à resposta ao patógeno, as plantas foram inoculadas com uma mistura de esporângios de *P. infestans*, na concentração de 1×10^3 esporângios mL^{-1} , coletados em regiões da Zona da Mata Mineira, e as proteínas foram extraídas de folhas de cada

genótipo inoculado e não inoculado (controle) coletadas nos tempos 0, 2 e 48 horas. Na análise proteômica foi utilizada a técnica da eletroforese bidimensional (2-DE), com a primeira dimensão (focalização isoeletrica) realizada em tiras *IPG* de 24 cm, pH 3-10, e a segunda dimensão em *SDS-PAGE*, em gel 12,5%T. Foram obtidos três géis por tratamento, correspondendo a três repetições biológicas. Em seguida, os géis foram revelados por coloração com azul de coomassie coloidal. Posteriormente as imagens dos géis foram digitalizadas usando o equipamento *Image Scanner III* e analisadas no *software ImageMaster 2D Platinum 7.5*. *Spots* com variação de sobreposição acima de 1,5 e ANOVA $p < 0,05$ foram considerados diferencialmente abundantes. Os *spots* das proteínas diferencialmente abundantes foram identificados em espectrômetro de massas do tipo *MALDI-TOF/TOF Ultraflex III*. As listas de massas obtidas foram confrontadas contra os bancos de dados de proteínas obtidos do *UNIPROT*, com auxílio do *software MASCOT* e os resultados obtidos, validados pelo aplicativo *SCAFFOLD* com pelo menos 90% de probabilidade. As proteínas identificadas foram categorizadas funcionalmente usando o *software Mapman*. Uma vez listadas as proteínas diferencialmente abundantes para os genótipos BGH-2127 e Santa Clara foi realizada a construção de uma rede de interação proteína-proteína utilizando o *software STRING*. Ensaio de PCR em Tempo Real (RT-PCR) foram realizados para confirmar os níveis de abundância de algumas proteínas identificadas. O RNA total foi extraído de amostras de folhas e o cDNA obtido foi quantificado pelo equipamento *SpectraMax M5 microplate/cuvette reader*. A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada utilizando o equipamento *StepOne™ Real-Time PCR System* e para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o *software REST*. Na avaliação do proteoma constitutivo, 19 proteínas foram identificadas, e estão relacionadas com metabolismo e energia, fotossíntese, estresse e defesa e à transcrição. Aproximadamente 90% destas proteínas foram mais abundantes no cultivar Santa Clara. As proteínas endoquitinase ácida de 26 kDa e ribonuclease T2 foram mais abundantes no BGH-2127. Atividade enzimática confirmou maior abundância de quitinase no acesso BGH-2127 em relação à Santa Clara. Os padrões de expressão avaliados por PCR em tempo real diferiram dos resultados da análise proteômica. Na avaliação da resposta ao patógeno, 56 proteínas diferencialmente abundantes foram identificadas, sendo 39 referentes ao genótipo resistente e 17 ao suscetível. Estas proteínas foram categorizadas em grupos de funções biológicas de energia e metabolismo, fotossíntese, estresse e defesa, transcrição, outras proteínas e não caracterizadas. Para o acesso BGH-2127, proteínas do estresse oxidativo (2-cis peroxirredoxina BAS1 e 2-cis peroxirredoxina) e relacionadas à patogênese da

família PR-5 (taumatina) tiveram os níveis de abundância relativa aumentados nos tempos 0 e 48 horas após a inoculação, respectivamente, e foram consideradas importantes para o mecanismo de defesa deste genótipo. Os padrões de expressão avaliados por PCR em tempo real diferiram dos resultados da análise proteômica. Redes de interações proteína-proteína forneceram importantes informações sobre atividades celulares envolvidas na resistência do BGH-2127 à requeima. Diferenças na abundância das proteínas endoquitinase ácida de 26 kDa e ribonuclease T2 entre os proteomas constitutivos dos genótipos avaliados podem contribuir para o mecanismo de resistência do BGH-2127 à requeima. Proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (PR-9) e família taumatina (PR-5) possuem papel importante no mecanismo de defesa do acesso BGH-2127 resistente a requeima do tomateiro.

ABSTRACT

LAURINDO, Bruno Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Proteomic analysis of resistance to late blight in tomato.** Adviser: Derly José Henriques da Silva. Co-advisers: Maria Cristina Baracat Pereira and Carlos Nick Gomes.

Growing tomatoes has significant economic and social importance in Brazilian agriculture. Nevertheless, the tomato production is considered an activity of high economic risk and major agronomic complexity. Among the main problems with regard to pests and diseases, there is the late blight, caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Disease control is highly dependent on the use of pesticides and there is no resistant cultivars. The main strategy to reverse that one situation is the introgression of resistance genes present in tomato accessions stored in germplasm banks. So, after eight years of research, BGH-2127 access (*Solanum lycopersicum*) was selected as a source of resistance to late blight, among the 870 tomato accessions of Vegetable Germplasm Bank of the Federal University of Viçosa (BGH-UFV). Due to the resistance to be quantitative it becomes difficult to practice selection of superior genotypes, made only in the field or associated with genetic molecular markers. In this context, the methodology of proteomics becomes viable alternative to provide valuable information and tools to better understanding the different ways of plant-pathogen relationship, thus this methodology can help future proposals genetic strategies to develop resistance cultivars of tomatoes. With the help of proteomic tools, the objectives of this study were: to analyze differences between the constitutive proteomes of tomato genotypes contrasting in resistance to late blight; and identify proteins against infection of the pathogen that may explain possible molecular mechanisms of resistance of tomato to this disease. The BGH-2127 and Santa Clara cultivar, resistant and susceptible to late blight respectively, were evaluated. For the evaluation of the constitutive proteome, proteins were extracted from leaf samples of the genotypes without inoculation, only comparing the protein constitution of BGH-2127 and Santa Clara. In evaluating the response to the pathogen, the plants were inoculated with a mixture of sporangia of *P. infestans* sporangia at a concentration of 1×10^3 sporangia mL^{-1} from different regions of Zona da Mata. Proteins were extracted from leaves of each genotype inoculated and non-inoculated (control) collected at time 0, 2 and 48 hours. In the proteomic analysis, the two-dimensional electrophoresis technique (2-DE) was used, with the first dimension (isoelectric focusing) performed using a 24-cm strip containing an immobilized pH gradient (IPG) ranging from 3 to 10 and the second

dimension was performed on SDS-PAGE 12.5%T. Three gels were obtained by treatment, corresponding to three biological replicates. Then the gels were stained with colloidal coomassie blue. Posteriorly the gels were scanned with the aid of Image Scanner III and analyzed using ImageMaster 2D Platinum 7.0 software. The expression values were considered significant according to the analysis of variance (ANOVA) at $p < 0.05$. Proteins in which the abundance ranged at least 1.5 times were considered to be differentially abundant. Protein identification was performed using the MALDI-TOF/TOF Ultraflex III type mass spectrometer. The standard list of proteins was obtained UNIPROT, through the use of the MASCOT application. The result obtained by MASCOT was validated by the SCAFFOLD application, with a minimum of 90% probability. Identified proteins were functionally categorized using Mapman program. Once the differentially abundant proteins for BGH-2127 and Santa Clara genotypes were listed, the construction of a protein-protein interaction network was carried out using the STRING software. Real-time PCR assays (RT-PCR) were performed to confirm the levels of abundance of some identified proteins. Total RNA was extracted from leaf samples and the cDNA obtained was quantified by the SpectraMax M5 microplate/cuvette reader. The PCR reaction was performed using StepOne™ Real-Time PCR System. Quantification of gene expression was performed using REST software. In evaluation of the constitutive proteome, nineteen proteins were identified, which were then related to metabolism and energy, photosynthesis, transcription, stress and defenses. Approximately 90% of these proteins were more abundant in Santa Clara, a susceptible cultivar. Acidic 26 kDa endochitinase and ribonuclease T2 proteins were more abundant in BGH-2127 access. The enzymatic activity confirmed a greater abundance of chitinase in the BGH-2127 access as compared to the cultivar Santa Clara. Gene expression analyses by real time PCR demonstrated that the mRNA levels were not correlated with the respective protein levels. Abundance of the acidic 26 kDa endochitinase and ribonuclease T2 proteins in the constitutive proteomes of BGH-2127 may be associated with the answer to the resistance of this access. In evaluating the response to the pathogen, fifty-six differentially abundant proteins were identified, with thirty-nine referring to the resistant genotype and seventeen to the susceptible genotype. These proteins were categorized into functional groups of energy and metabolism, photosynthesis, stress and defense, transcription, other proteins and not characterized. For access BGH-2127, oxidative stress proteins (2-cis peroxiedoxin BAS1 and 2-cis peroxiredoxin) and thaumatin-like protein had levels of relative abundance increased at times 0 and 48 hours after respectively, and were considered important for the defense

mechanism of this genotype. The expression standards evaluated by RT-PCR differed from the results of the proteomic analysis. Protein-protein interaction networks provided important information on cellular activities involved in the resistance of BGH-2127 late blight. Abundance of the acidic 26 kDa endochitinase and ribonuclease T2 proteins in the constitutive proteomes of BGH-2127 may be associated with the answer to the resistance of this access. Proteins related to oxidative stress (PR-9) and thaumatin-like family (PR-5) play an important role in the BGH-2127 access defense mechanism resistant to tomato late blight.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), cujo centro de diversidade é a América do Sul, se difundiu por todo o mundo se tornando uma das hortaliças mais cultivadas (Ranjan et al., 2012). Anualmente são cultivados mais de 5 milhões de hectares com produção superior a 170 milhões toneladas (Faostats, 2017).

Mesmo diante deste cenário favorável, a tomaticultura é considerada uma atividade de elevado risco econômico e de grande complexidade agrônômica, principalmente pelo grande número de patógenos que podem provocar doenças na cultura. Estima-se que aproximadamente 200 doenças e distúrbios fisiológicos podem causar danos ao tomateiro, e estas podem resultar em grandes danos, seja pela falta de controle eficaz ou pela elevação do custo de produção com a aplicação de agrotóxicos (Lopes et al., 2005).

Dentre os principais problemas, destaca-se a mela ou requeima causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. A ocorrência de epidemias sob condições favoráveis pode comprometer toda a produção de tomate em poucos dias (Nowick et al., 2012). O manejo desta doença pode ser feito por meio de técnicas culturais e principalmente pela aplicação de fungicidas (Foolad et al., 2014). No entanto, esta técnica de manejo pode propiciar grande variabilidade do patógeno, com consequente resistência a fungicidas (Hu et al., 2012). Destaca-se ainda que a elevada dependência de fungicidas para o manejo da requeima não é uma prática sustentável ao longo prazo, tornando a resistência genética mais atraente (Foolad et al., 2014).

O reduzido número de cultivares de tomateiro resistentes à *P. infestans* no mercado brasileiro reflete a dificuldade de trabalhar com esse patógeno em programas de melhoramento (Abreu et al., 2008). Na tentativa de reverter esse quadro, uma alternativa é a transferência de genes de resistência presentes em acessos de tomateiro conservados em Bancos de Germoplasma, uma vez que é possível identificar variações genéticas presentes nesses acessos, que representam rica fonte de genes responsáveis pelo controle de caracteres agrônômicos de interesse. Neste contexto, a busca por fontes de resistência que pertençam à mesma espécie que se deseja melhorar, facilita cruzamentos para transferência de genes (Abreu et al., 2008) e recuperação mais rápida das características agrônômicas desejadas (Adalid et al., 2012).

Em consequência da resistência quantitativa, com baixa herdabilidade e muito influenciada pelo ambiente (Abreu et al., 2008), vários fatores interferem na avaliação de genótipos resistentes tornando-se perturbadores da avaliação e seleção fenotípica. Neste contexto, a metodologia da análise proteômica torna-se uma alternativa viável na

condução do processo, fornecendo importantes informações e ferramentas para maior entendimento da relação planta-patógeno e para o desenvolvimento de cultivares resistentes. Além disso, oferece a possibilidade de estudar simultaneamente o conjunto de proteínas presentes numa unidade biológica, juntamente com sua catalogação, sua abundância, variações genótipo dependentes, implicações no desenvolvimento e respostas às mudanças ambientais, modificações pós-traducionais ou interações com outras entidades moleculares (Gonzales-Fernandes & Jorrin-Novo, 2011).

Estudos relacionados à proteômica do patossistema tomateiro x *P. infestans* são escassos, no entanto, são de extrema importância para o entendimento desta interação e melhoramento da cultura. A análise do proteoma do tomateiro em resposta a requeima pode contribuir para melhor entender a biologia deste patossistema, contribuindo para identificação de marcadores biológicos e potenciais genes para obtenção de cultivares resistentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância socioeconômica da tomaticultura

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) pertence à família Solanaceae, tem como centro de diversidade a América do Sul, em um estreito território limitado ao norte pelo Equador, ao sul pelo Chile, a oeste pelo Oceano Pacífico e a leste pela Cordilheira dos Andes (Clemente & Boiteux, 2012).

O tomate foi levado da América do Sul para o México, onde foi domesticado e recebeu o nome *tomatl*. No século XVI foi levado para a Europa e utilizado como planta ornamental, sendo os italianos os primeiros a utilizarem seus frutos na alimentação (Clemente & Boiteux, 2012). No Brasil, sua introdução ocorreu por meio de imigrantes europeus, no fim do século XIX (Alvarenga, 2004).

Devido à versatilidade de utilização, seja na forma *in natura* ou industrializada, o tomate ganha cada vez mais consumidores (Silva et al., 2005). Além disso, o tomate é considerado um alimento funcional, capaz de reduzir risco de algumas doenças degenerativas, principalmente devido à presença do licopeno, um carotenóide associado à prevenção de doenças oncológicas e cardiovasculares (Carvalho et al., 2006).

A tomaticultura possui relevante importância econômica no cenário nacional, uma vez que o cultivo do tomate está entre as principais atividades geradoras de emprego na agricultura brasileira, gerando anualmente cerca de 300 mil empregos diretos e movimentando em termos de mão de obra o montante de R\$ 280 milhões (Abcsem, 2012).

No ano de 2014, a produção mundial de tomate foi superior a 170 milhões de toneladas, cultivada em mais de cinco milhões de hectares. A China destaca-se como o maior produtor, responsável por mais de 30% da produção. No Brasil foram cultivados mais de 64 mil hectares e produzidas 4,3 milhões de toneladas (Faostat, 2017).

Os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais são os três maiores produtores, respectivamente, responsáveis por aproximadamente 65% da produção nacional de tomate. Neste mesmo ano, a produção mineira de tomate foi superior a 5,44 mil toneladas, colhidas em uma área de 11 mil hectares. As regiões Central, Triângulo e Sul de Minas são as principais produtoras do estado, responsáveis por quase 60% da produção (Secretaria de Estado de Agricultura, 2017).

2.2 Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa

Bancos de germoplasma são considerados unidades conservadoras de material genético de uso imediato ou com potencial de uso futuro (Cruz et al., 2012). Como atividades realizadas nos bancos de germoplasma pode-se citar: levantamento, aquisição, exploração e coleção; manutenção, multiplicação e regeneração; caracterização, avaliação, documentação, distribuição e intercâmbio do maior número possível de amostras de germoplasma dentro das limitações físico-econômicas (Borém & Miranda, 2013).

Com a preocupação de preservar recursos genéticos para as futuras gerações, a Universidade Federal de Viçosa (UFV) criou oficialmente o Banco de Germoplasma de Hortaliças (BGH-UFV) em 1966, com o apoio da Fundação ROCKEFELLER, com a finalidade de resgatar espécimes de espécies nativas ou introduzidas, preservar, documentar e disponibilizar germoplasma de outras regiões do globo, caracterizando o seu potencial para as condições climáticas das diversas regiões do Brasil (Silva et al., 2001). As coletas dos recursos genéticos do BGH-UFV iniciaram-se em 1964 e mantêm-se ativas até os dias atuais. Atualmente, o BGH-UFV possui em torno de 7225 acessos, com 25 famílias e 106 espécies. As famílias com maiores representações são: Solanaceae, 44,21%; Leguminosae, 16,83% e Cucurbitaceae, 15,70% (SILVA et al., 2001). A Universidade Federal de Viçosa mantém o segundo mais antigo banco de germoplasma de hortaliças da América Latina (Marim et al., 2009).

Recursos genéticos vegetais são a base da segurança alimentar e energia global, por isso é essencial que estes recursos sejam devidamente preservados e caracterizados, uma vez que servem como matéria-prima para o melhoramento de plantas (Nass et al., 2012). Entretanto, menos de 8% dos recursos conservados nos bancos de germoplasma são efetivamente utilizados pelos melhoristas (Vallois et al., 1998). Entre os principais fatores de baixa utilização dos acessos nos programas de melhoramento está o desconhecimento do potencial dos recursos genéticos disponíveis nos bancos de germoplasma por parte dos melhoristas (Carelli et al., 2006).

A disponibilização dos recursos genéticos passa necessariamente pelos trabalhos de caracterização e avaliação agrônômica, fitopatológica, entomológica dos acessos registrados nos bancos de germoplasma (Vallois et al., 1998). Neste sentido, os recursos genéticos de hortaliças pertencentes ao BGH-UFV vêm sendo caracterizados e avaliados e posteriormente estas informações são disponibilizadas via rede mundial de computadores, sendo possível a visualização destes resultados no site do BGH-UFV (www.bgh.ufv.br).

O tomateiro é a espécie com o maior número de acessos registrados no BGH-UFV, aproximadamente 870 acessos. Estudos de avaliação da resistência à requeima envolvendo acessos das espécies *Solanum habrochaites* e *Solanum lycopersicum* tem sido realizado ao longo dos últimos anos.

Abreu et al. (2008) estudaram a herança da resistência à requeima provenientes do cruzamento interespecífico entre as espécies *S. habrochaites* (BGH-6902) e *S. lycopersicum* (cv Santa Clara). Verificaram que a resistência é do tipo quantitativa e maior importância dos efeitos gênicos aditivos.

Fiorini et al. (2010) com o objetivo de identificar linhagens de tomateiro resistentes à requeima, selecionaram 10 linhagens F₈ originadas do cruzamento interespecífico entre *S. habrochaites* (BGH-6902) e *S. lycopersicum* (Santa Clara), como resistentes à doença. Concluíram ser possível a introgressão de genes de resistência a requeima presentes em *S. habrochaites* em *S. lycopersicum* para o desenvolvimento de cultivares de tomateiro resistentes a esta doença. Neste mesmo estudo, os autores relataram que o acesso BGH-1497 de *S. lycopersicum* possui bom nível de resistência à requeima, corroborando resultados preliminares obtidos por Ribeiro et al. (2006), que selecionaram o acesso BGH-1497 como uma possível fonte de resistência à requeima.

Elsayed et al. (2011) buscando desenvolver resistência quantitativa à requeima, combinaram diferentes fontes de resistência e mediante análise dialélica, observaram predominância dos efeitos da capacidade geral de combinação (CGC), sugerindo que os efeitos aditivos foram mais importantes que os efeitos não-aditivos.

Elsayed et al. (2012) estudaram a herança da resistência e determinaram os fatores genéticos que contribuem para a resistência da linhagem '163A' resultante do cruzamento interespecífico entre as espécies *S. lycopersicum* (cv Santa Clara) e *S. habrochaites* (BGH-6902). Os autores verificaram que dois genes recessivos atuam na resistência à requeima.

Nick et al. (2013) avaliaram critérios de seleção em progênies de cruzamento entre o cultivar de tomateiro Santa Clara (*S. lycopersicum*) e a espécie silvestre *S. habrochaites f. glabratum* quanto a atributos de qualidade dos frutos e de resistência à requeima. Concluíram que é possível obter ganhos genéticos satisfatórios ao selecionar para decréscimo na área abaixo da curva de progresso da requeima e aumento nos valores de sólidos solúveis e acidez titulável em progênies derivadas do cruzamento *S. lycopersicum* (Santa Clara) x *S. habrochaites* (BGH-6902).

Nick et al. (2014) estudaram os parâmetros genético e a correlação entre a resistência a requeima e qualidade de frutos em tomateiro em condições de campo sob clima tropical em 220 famílias F_{2:3}. Foi observada elevada herdabilidade, indicando a possibilidade de ganhos genéticos, sucesso na introgressão de alelos de resistência e correlações negativas entre a área abaixo da curva de progresso da requeima e as variáveis sólidos solúveis totais e acidez titulável.

Laurindo et al. (2016) analisaram os acessos BGH-2102, BGH-2117, BGH-2127, BGH-2130, BGH-2332 e BGH-2343, fontes de resistência à requeima, pertencentes à espécie *S. lycopersicum* em avaliações por meio de análise dialélica. Observaram existência de variabilidade genética aditiva entre os genitores, predominância de efeitos gênicos não aditivos e desvios de dominância bidirecional no controle do caráter. Os acessos BGH-2117, BGH-2127 e BGH-2343 destacaram-se como os de maior frequência de alelos favoráveis e divergentes, sugerindo a inclusão destes em cruzamentos visando o pré-melhoramento da resistência a requeima.

2.3 Requeima do tomateiro

A requeima ou mela do tomateiro causada pelo oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary é uma das principais doenças que ocorrem na cultura. Em levantamentos da importância científica e econômica de oomicetos que atacam plantas, *P. infestans* foi classificada como a primeira entre as dez espécies de maior relevância (Kamoun et al., 2015).

Este patógeno causa fascínio entre os pesquisadores e cinco razões o torna um patógeno considerado reemergente: disponibilidade de tecnologias para responder questões de importância histórica, a surpreendente e intensa devastação causada por este patógeno em novos locais, o elevado fluxo de populações em todo o mundo implicando em desafios para o manejo da doença, a revolução genômica que possibilitou enorme progresso na compreensão da biologia molecular e o elevado número de perguntas sem respostas convincentes (Fry et al., 2015).

O desenvolvimento desta doença está estritamente relacionado às condições climáticas, sendo favorecida por condições de baixa temperatura e alta umidade, podendo atacar todos os órgãos da parte aérea da planta como as folhas, hastes e frutos, resultando em eventual morte da planta em um curto período de tempo compreendido entre sete e dez dias (Nowick et al., 2012).

Inicialmente as lesões são pequenas e ocorrem nas pontas das folhas e hastes da planta, possuem aspecto encharcado no início da infecção progredindo para marrom

escuro com o avanço da epidemia. À medida que o agente patogênico penetra nos tecidos da planta ocorre um aumento no tamanho das lesões, levando a um expressivo desfolhamento do hospedeiro (Nowick et al., 2013).

A reprodução de *P. Infestans* pode ocorrer de forma assexuada, por meio da produção de esporângios, ou sexuada, quando há cruzamento entre isolados do grupo de compatibilidade A1 com A2 (Petchaboon et al., 2014).

Os esporângios durante a reprodução assexuada são produzidos em períodos de alta umidade relativa (acima de 90%) e temperaturas entre 18 a 22°C. Temperaturas acima de 18°C (temperatura ótima de 22°C) favorece a germinação direta, e sob temperaturas mais baixas (temperatura ótima de 12°C), ocorre à germinação indireta com a formação de até oito zoósporos por esporângio. A germinação direta dos esporângios em temperaturas relativamente altas, desde que haja temperaturas noturnas em torno de 22°C, explica a ocorrência de surtos de requeima mesmo em regiões quentes, consideradas de baixo risco para ocorrência da doença (Reis, 2010).

Na reprodução sexual, os micélios dos grupos de compatibilidade A1 e A2 interagem, podendo ocorrer a formação de oósporos e levar ao aumento da variação genética da população, o que pode resultar na rápida adaptação do patógeno ao ambiente e tornar as medidas de controle ainda mais difíceis (Han et al., 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que *P. Infestans* se reproduz predominantemente de forma assexuada, por meio de linhagens clonais (Alkher et al., 2015), que não possuem especificidade quanto ao hospedeiro (Michalska et al., 2016; Stroud et al., 2016).

Entre as principais medidas de controle da requeima, a aplicação de fungicidas é a mais utilizada (Foolad et al., 2014). Todavia, esta técnica de manejo é onerosa, traz riscos ao ambiente e à saúde dos aplicadores. Além do mais, pode propiciar grande variabilidade entre linhagens clonais de *P. infestans* quando realizada inadequadamente, com consequente resistência a determinados fungicidas (Hu et al., 2012). Reis et al. (2006) verificaram que populações brasileiras de *P. infestans* possuem elevadas porcentagens de isolados resistentes e moderadamente resistentes ao metalaxyl e mefenoxam, importantes fungicidas que atuam no controle da requeima.

Alternativamente, o desenvolvimento e uso de cultivares de tomateiro geneticamente resistentes representam estratégia satisfatória do ponto de vista social, econômico e ambiental para o controle da requeima (Mundt, 2014). No entanto, poucos cultivares com bons níveis de resistência estão disponíveis, devido à dificuldade de trabalhar com esse patógeno em programas de melhoramento (Abreu et al., 2008). A

autora cita como dificuldades o fato do patógeno possuir elevada taxa de mutação, a resistência ser do tipo quantitativa e a existência de poucas fontes com resistência genética reconhecidas.

Estudos relacionados à resistência genética a *P. infestans* tem sido alvo de interesse dos programas de melhoramento durante muitos anos. Dois mecanismos de resistência a *P. infestans* são descritos em tomate, a resistência qualitativa, também conhecida como raça-específica, controlada por um ou poucos genes e a resistência quantitativa, controlada por poligenes que conferem resistência a maior número de raças (Zhang et al., 2013).

Os genes de resistência qualitativa reportados são encontrados na espécie silvestre de tomateiro *Solanum pimpinellifolium*. O primeiro gene de resistência à *P. infestans* relatado foi o *Ph-1*, esse gene possui dominância completa e está situado no cromossomo 7, conferindo resistência à raça 0 do patógeno (Bonde & Murphy, 1952; Pierce, 1971; Nowick et al., 2012).

Um segundo gene de resistência à *P. infestans* denominado *Ph-2* foi identificado no acesso West Virginia 700 (Gallegly & Marvel, 1955). Este gene possui dominância parcial, e foi mapeado no cromossomo 10 (Gallegly, 1960; Pierce 1971; Turkensteen, 1973). Outro gene de resistência denominado como *Ph-3* foi relatado no acesso L3708, também confere dominância parcial a uma vasta gama do patógeno (Chunwongse et al., 2002).

Kole et al. (2006) mapearam em uma população derivada de um cruzamento entre uma variedade suscetível de tomate e um acesso de *S. pimpinellifolium* um gene denominado *Ph-4* que se encontra no cromossomo 2. Outro gene de resistência qualitativa à *P. infestans* foi identificado e localizado no cromossomo 1, este gene foi denominado de *Ph-5* (Foolad et al., 2008).

No entanto, existem relatos que isolados de *P. infestans* suplantaram a resistência conferida por estes genes (Michalska et al., 2016), demonstrando que os programas de melhoramento genético do tomateiro devem buscar outro mecanismo de resistência a esta doença, mediante a incorporação de resistência do tipo quantitativa (Elsayed et al., 2011). Neste contexto, QTLs que conferem resistência quantitativa já foram relatados em acessos de tomates de espécies silvestres (Smart et al., 2007; Chen et al., 2014), mas ainda não têm sido amplamente utilizados, dada a natureza complexa da herança da resistência (Abreu et al., 2008), ou por estar ligada a características agrônomicas indesejáveis (Haggard et al., 2015).

2.4 Proteômica de plantas

No melhoramento vegetal são utilizadas diferentes técnicas para identificação e seleção de genótipos superiores que variam desde a seleção fenotípica, até complexos métodos e ferramentas moleculares (Denis & Bouvet, 2013). A proteômica compreende metodologias e ferramentas moleculares que auxiliam os pesquisadores em programas de melhoramento e permite identificar simultaneamente milhares de proteínas (Silva-Sanchez et al., 2015).

O termo proteoma começou a ser empregado em 1994 para designar o conjunto de proteínas expressas pelo genoma de uma célula em determinado momento (Wilkins et al., 1995). A proteômica é considerada uma das vertentes da era pós-genômica e vem contribuindo significativamente para o entendimento global e integrado de sistemas biológicos (Budzinski et al., 2013).

Com o uso de ferramentas proteômicas, questões do tipo como, onde, quando e quais as proteínas são produzidas por um organismo podem ser respondidas (Gonzalez-Fernandes & Jorin-Novo, 2011). O campo da proteômica oferece ainda a possibilidade de estudar simultaneamente a abundância das proteínas, variações genótipo dependentes, mudanças a respostas ambientais e de desenvolvimento, modificações pós-traducionais, além de interações com outras proteínas e entidades moleculares (Valledor & Jorin, 2011). Dessa forma é possível compreender os mecanismos envolvidos na interação planta-patógeno, identificar novas estratégias para interromper o processo de infecção, desenvolver ferramentas capazes de prever e monitorar reações de um determinado genótipo (Pedreschi et al., 2013).

Existem diferentes técnicas proteômicas de uso atual, dentre estas, a eletroforese bidimensional (2-DE), aliada à espectrometria de massas do tipo *MALDI-TOF/TOF* é uma das mais utilizadas (Galdos-Riveros et al., 2010). Na eletroforese bidimensional (2-DE) em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) a separação das proteínas ocorre em duas etapas independentes, conforme suas propriedades físico-químicas. Na primeira etapa (primeira dimensão), as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), por meio da formação de um gradiente de pH no qual as proteínas movem-se até atingirem carga nula e estacionam. A separação na segunda etapa (segunda dimensão) ocorre em função da massa molecular (*MW*), por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (*SDS-PAGE*). No final, após a coloração dos géis um perfil proteico é formado, onde cada mancha (*spot*) corresponde a uma ou mais proteínas (Rabillouda & Lelong, 2011). Ao combinar esses dois

processos distintos, até 2.000 manchas (*spots*) podem ser visualizadas em um único gel (Barbosa et al., 2012).

A espectrometria de massas (MS) utilizando o equipamento *MALDI-TOF/TOF* identifica proteínas por uma técnica analítica de estudos de moléculas, que se baseia no movimento de íons em campos elétricos e magnéticos, para classificá-los de acordo com sua relação massa/carga (m/z), produzindo um espectro de massas (Silva et al., 2007). Esse equipamento é composto basicamente por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector (Barbosa et al., 2012). Íons peptídicos são gerados na fonte de ionização sem que ocorra alteração da estrutura química da molécula. Posteriormente, os íons são acelerados por um campo elétrico e separados pela relação m/z no analisador de massas, por fim, os íons passam pelo detector conectado a um computador com programas para análise dos dados (May et al., 2011).

No método de ionização *MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)*, uma matriz orgânica é utilizada para cristalizar os peptídeos. Essa matriz é sublimada por bombardeio a laser transferindo cargas para os analitos resultando na formação de íons peptídicos. Em seguida a massa molecular dos íons são avaliadas em um analisador tipo *TOF (Time Of Flight)*, onde os íons resultantes da primeira fase são acelerados e atravessam um tubo de vácuo com velocidade inversamente proporcional a sua massa. Quando os íons atingem o detector, o tempo decorrido entre a ionização e a detecção é utilizado para obter o valor m/z , para esse resultado dá-se o nome de *peptide mass fingerprint (PMF)*. Os peptídeos previamente detectados durante o *PMF* (íons precursores) são então isolados e submetidos à fragmentação por colisão com moléculas de um gás inerte, tal como argônio, nitrogênio ou hélio. O espectro obtido é chamado de *MS/MS* e os resultados inerentes a massa molecular (*MW*) dos peptídeos, obtida a partir do *PMF*, bem como a informação relativa a sequência de aminoácidos dos peptídeos, contida nos espectros de fragmentação (*MS/MS*), são usados pelos *softwares* de busca para “localizar” as proteínas nos bancos de dados (Cantú et al., 2009; Cottrell, 2011).

Muitas ferramentas e bancos de dados de proteínas estão disponíveis na rede mundial de computadores para os estudos de bioinformática estrutural e funcional de proteínas, com a finalidade de explicar os dados biológicos obtidos nas análises proteômicas (Espídola et al., 2010). Ferramentas de bioinformática comparam dados experimentais dos espectros *MS*, assim como dos espectros de fragmentação *MS/MS*, com dados de fragmentação teóricos, gerados *in silico*, de todas as proteínas presentes em determinado banco de dados, utilizando *softwares* específicos tais como *MASCOT*, permitindo identificar a proteína de interesse. Análises de bioinformática podem

também determinar a função da proteína e definir como essas macromoléculas interagem dentro de sistemas complexos, com objetivos de permitir que o pesquisador possa interpretar a grande quantidade de dados gerados na biologia moderna, de forma simples e aplicável ao usuário final (Vaudel et al., 2014).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCSEM. Associação brasileira de comércio de mudas e sementes. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=2420>. Acesso em jan. de 2017.
- ABREU, F.B.; SILVA, D.J.H.; CRUZ, C.D.; MIZUBUTI, E.S.G. Inheritance of resistance to *Phytophthora infestans* (Peronosporales, Pythiaceae) in a new source of resistance in tomato (*Solanum* sp.) formerly *Lycopersicon* sp. Solanales, Solanaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 493-497, 2008.
- ADALID, A. M.; ROSELLO, S.; VALCARCEL, M.; NUEZ, F. Analysis of the genetic control of b-carotene and L-ascorbic acid accumulation in an orange-brownish wild cherry tomato accession. **Euphytica**, v. 184, n. 2, p. 251–263, 2012.
- ALKHER, H.; ISLAM, M. R.; WIJEKON, C.; KALISCHUK, M.; KAWCHUK, L. M.; PETERS, R. D.; DAAYF, F. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Canada during 2012. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 305-314, 2015.
- ALVARENGA, M. A. A. R. **Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA, 2004. 393p.
- BARBOSA, E. B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G. M.; HENRIQUE, T.; MARQUI, A. B. T. D.; TAJARA, E. H. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 366-375, 2012.
- BONDE, R.; MURPHY, E. F. Resistance of certain tomato varieties and crosses to late blight. **Bull. Me. Agric. Exp. Stn**, v.497, p.5-15, 1952.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de plantas**. 5 ed. Viçosa: UFV, 2009. 529 p.
- BUDZINSKI, I. G. F.; REGIANI, T.; LABATE, M. T. V.; GUIDETTI-GONZALEZ, S.; da SILVA, D. I. R.; RODRIGUES, M. J. C.; BORGES, J. S.; MOZOL, I. M.; LABATE, C. A. Protômica. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. (Ed). **Ômicas 360º: aplicações e estratégias para o melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, p.153-179, 2013.
- CANTÚ, M. D.; CARRILO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2009.
- CARELLI, B.P.; GERALD, L.T.S.; GRAZZIOTIN, F.G.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic diversity among Brazilian cultivars and landraces of tomato *Lycopersicon*

esculentum Mill. revealed by RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 395-400, 2006.

CARVALHO, P. G. B.; MACHADO, C. M. M.; MORETTI, C. L.; FONSECA, M. E. N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 397-404, 2006.

CHEN, A. L.; LIU, C. Y.; CHEN, C. H.; WANG, J. F.; LIAO, Y. C.; CHANG, C. H.; TSAI, M.H.; HWU, K.K.; CHEN, K. Y. Reassessment of QTLs for late blight resistance in the tomato accession L3708 using a restriction site associated DNA (RAD) linkage map and highly aggressive isolates of *Phytophthora infestans*. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e96417, 2014.

CHUNWONGSE, J.; CHUNWONGSE, C.; BLACK, L.; HANSON, P. Molecular mapping of the Ph-3 gene for late blight resistance in tomato. **Journal Horticultural Science Biotechnology**, v. 77, p. 281-286, 2002.

CLEMENTE, F. M. V. T.; BOITEUX, L.S. **Produção de tomate para processamento industrial**. Embrapa, 2012, 344p.

COTTRELL, J. S. Protein identification using MS/MS data. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1842-1851, 2011.

CRUZ C. D.; REGAZZI A. J.; CARNEIRO P. C. S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Viçosa, MG: UFV, 2012. 514 p.

DENIS, M.; BOUVET, J. M. Efficiency of genomic selection with models including dominance effect in the context of Eucalyptus breeding. **Tree Genetics & Genomes**, v. 9, p. 37-51, 2013.

ELSAYED, A. Y. A. M.; SILVA, D. J. H.; CARNEIRO, P. C.; MIZUBUTI, E. S. G. The inheritance of late blight resistance derived from *Solanum habrochaites*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, p. 199-205, 2012.

ELSAYED, A. Y. A. M.; SILVA, D. J. H.; MIZUBUTI, E. S. G.; CARNEIRO, P. C. Combining the monogenic and polygenic resistant genes to late blight in tomato. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 3, p. 251-259, 2011.

ESPINDOLA, F. S.; CALÁBRIA, L. K.; REZENDE, A. A. A.; PEREIRA, B. B.; SANTANA, F. A.; AMARAL, I. M. R.; LOBATO, J.; FRANÇA, J. L.; MARIO, J. L.; FIGUEIREDO, L. B.; SANTOS-LOPES, L. P.; GOUVEIA, N. M.; NASCIMENTO, R.; TEIXEIRA, R. R.; REIS, T. A.; ARAÚJO, T. G. Recursos de bioinformática aplicados às ciências ômicas como genômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, p. 463-477, 2010.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: jan. 2017.

FIORINI, C. V. A.; SILVA, D. J. H.; MIZUBUTI, E. S. G.; SOUZA, J.B.; SILVA, L. J.; MILAGRES, C. C.; ZAPAROLI, M. R. Caracterização de linhagens de tomateiro originadas de cruzamento interespecífico quanto à resistência a requeima. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 197-202, 2010.

FOOLAD, M. R.; SULLENBERGER, M. T.; OHLSON, E. W.; GIGINO, B.K. Response of accessions within tomato wild species, *Solanum pimpinellifolium* to late blight. **Plant Breeding**, p. 1-11, 2014.

FOOLAD, M. R.; MERK, H. L.; ASHRAFI, H. Genetics, genomics and breeding of late blight and early blight resistance in tomato. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 27, p.75–107, 2008.

FRY, W. E.; BIRCH, P. R. J.; JUDELSON, H. S.; GRÜNWARD, N. J.; DANIES, G.; EVERTS, K. L.; GEVENS, A. J.; GUGINO, B. K.; JOHNSON, D. A.; JOHNSON, S. B.; MCGRATH, M. T.; MYERS, K. L.; RISTAINO, J. B.; ROBERTS, P. D.; SECOR, G.; SMAR, C. D. Five reasons to consider *Phytophthora infestans* a reemerging pathogen. **Phytopathology**, v. 105, n.7, p. 966-981, 2015.

GALDOS-RIVEROS, A. C.; PIZA, A. R. T.; RESENDE, L. C.; MARIA, D. A.; MIGLINO, M. A. Proteômica: novas fronteiras na pesquisa clínica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1-24, 2010.

GALLEGLY, M. E.; MARVEL, M. E. Inheritance of resistance to tomato race-O of *Phytophthora-infestans*. **Phytopathology**, v. 45, p. 103-109, 1955.

GALLEGLY, M. E. Resistance to the late blight fungus in tomato. In: Camden, NJ. Proc. **Plant Science Seminar**, p. 113-135, 1960.

GONZALEZ-FERNANDES; JORRIN-NOVO, J. V. Contribution of proteomics to study of plant pathogenic fungi. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 1, p. 3-16, 2011.

HAGGARD, J. E.; JOHNSON, E. B.; CLAIR, D. A. St. Multiple QTL for horticultural traits and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* linked on *Solanum habrochaites* chromosome 11. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v. 5, n. 2, p. 219-233, 2015.

HAN, M.; LIU, G.; LI, J. P.; GOVERS, F.; ZHU, X. Q.; SHEN, C. Y.; GUO, L. Y. *Phytophthora infestans* field isolates from Gansu province, China are genetically highly diverse and show a high frequency of self fertility. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 79-88, 2013.

HU, C.H.; PEREZ, F. G.; DONAHOO, R.; MCLEOD, A.; MYERS, K.; IVORS, K.; SECOR, G.; ROBERTS, P. D.; DEAHL, K. L.; FRY, W. E.; RISTAINO, J. B. Recent genotypes of *Phytophthora infestans* in the eastern United States reveal clonal populations and reappearance of mefenoxam sensitivity. **Plant Disease**, v. 96, p. 1323-1330, 2012.

KAMOUN, S.; FURZER, O.; JONES, J. D. G.; JUDELSON, H. S.; ALI, G. S.; DALIO, R. J. D.; ROY, S. G.; SCHENA, L.; ZAMBOUNIS, A.; PANABIÈRES, F.; CAHILL, D.; RUOCCO, M.; FIGUEIREDO, A.; CHEN, X. R.; HULVEY, J.; STAM, R.; LAMOUR, K.; GIJZEN, K.; TYLER, B.M.; GRÜNWARD, N. L.; MUKHTAR, M. S.; TOMÉ, D. F. A.; TÖR, M.; ACKERVEKEN, G. V. D.; MCDOWELL, J.; DAAYF, F.; FRY, W. E.; LINDQVIST-KREUZE, H.; MEIJER, H. J. G.; PETRE, B.; RISTAINO, J.; YOSHIDA, K.; BIRCH, P. R. J.; GOVERS, F. G. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 4, p. 413-434, 2015.

KOLE, C.; ASHRAFI, H.; LIN, G.; FOOLAD, M. **Identification and molecular mapping of a new R gene, Ph-4, conferring resistance to late blight in tomato**. Solanaceae Conf. Univ. of Wisconsin, Madison, Abstr. 449, 2006.

LAURINDO, B. S.; LAURINDO, R. D. F.; NICK, C.; CARNEIRO, P. C. S.; MIZUBUTI, E. S. G.; SILVA, D. J. H. Potencial de hibridação entre acessos de tomateiro para pré melhoramento quanto à resistência à requeima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 1, p. 27-34, 2016.

LOPES, C.A.; REIS, A.; BIOTEUX, L.S. Doenças Fúngicas. In: LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. (Ed.). **Doenças do Tomateiro**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, p. 17-52, 2005.

MARIM, B.G.; SILVA, D. J. H.; MATTEDI, A. P.; MIRANDA, G. V.; CALIMAN, F. R. B. Variabilidade genética e importância relativa de caracteres em acessos de germoplasma de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1283-1290, 2009.

MAY, C.; BROSSERON, F.; CHARTOWSKI, P.; SCHUMBRUTZKI, C.; SCHOENEBECK, B.; MARCUS, K. Instruments and methods in proteomics. **Data Mining in Proteomics: From Standards to Applications**, v. 696, p. 3-26, 2011.

MICHALSKA, A. M.; SOBKOWIAK, S.; FLIS, B.; ZIMNOCH-GUZOWSKA, E. Virulence and aggressiveness of *Phytophthora infestans* isolates collected in Poland from potato and tomato plants identified no strong specificity. **European Journal of Plant Pathology**, v. 144, n. 2, p. 325-336, 2016.

MUNDT, C. C. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and

pests. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 27, p. 446-455, 2014.

NASS, L. L.; SIGRIST, M. S.; RIBEIRO, C. S. D. C.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Genetic resources: the basis for sustainable and competitive plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, n. SPE, p. 75-86, 2012.

NICK, C.; AGUILERA, J. G.; LAURINDO, B. S.; DE SOUZA ALMEIDA, V.; DE FREITAS, R. D.; CRUZ, C. D.; DA SILVA, D. J. H. Genetic parameters and correlation between tomato late blight field resistance and fruit quality. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 2418-2425, 2014.

NICK, C.; LAURINDO, B. S.; ALMEIDA, V. S.; FREITAS, R. D.; AGUILERA, J. G.; SILVA, E. C. F.; CRUZ, C. D.; SILVA, D. J. H. Seleção simultânea para qualidade do fruto e resistência à requeima em progênies de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 51-58, 2013.

NOWICKI, M.; KOZIK, E. U.; FOOLAD, M. R. Late Blight of Tomato. In: VARSHNEY, R.; TUBEROSA, R. Translational Genomics for Crop Breeding. **John Wiley & Sons, Inc.** p. 241-265, 2013.

NOWICKI, M.; FOOLAD, M. R.; NOWAKOWSKA, M.; KOZIK, E. U. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding. **Plant Disease**, v. 96, p. 4-17, 2012.

PETCHABOON, K.; SRISAWAD, N.; PONGAM, P.; CHUNWONGSE, C.; CHUNWONGSE, J. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on tomato and potato in the North of Thailand in 2000–2002. **European Journal of Plant Pathology**, v. 140, n. 3, p. 441-454, 2014.

PEDRESCHI, R.; LURIE, S.; HERTOOG, M.; NICOLA, B.; MÊS, M.; WOLTERING, E. Post-harvest proteomics and food security. **Proteomics**, v. 13, p. 1772–1783, 2013.

PEIRCE, L. C. Linkage tests with *Ph* conditioning resistance to race 0, *Phytophthora infestans*. **Report of the Tomato Genetics Cooperative**, p. 21-30, 1971.

RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 10, p. 1829-1841, 2011.

RANJAN, A.; ICHIHASHI, Y.; SINHA, N. R. The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. **Genome Biology**, v. 13, n. 8, p. 167, 2012.

REIS, A. **Requeima: doença destrutiva e comum ao tomateiro e à batateira**. Brasília – DF: Embrapa Hortaliças, 2010, 7p.

RIBEIRO, N. B.; RODRIGUES, G. S.; BARRA, V. R.; SILVA, D. J. H.; MIZUBUTI, E. S. G. Desempenho de acessos de tomateiro do Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV, quanto à resistência a *Phytophthora infestans*. **Summa Phytopathologica**, v.

32, p. 9-98, Suplemento, Resumo 53, 2006.

SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO DE MINAS GERAIS. Disponível em: <<http://www.agricultura.mg.gov.br/dados-do-agronegocio>>. Acesso em: jan. 2017.

SILVA, A. M. S.; CORRÊA, G. C.; REIS, E. M. Proteômica – Uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 2, n. 2, p.1-10, 2007.

SILVA, D. J. H.; MATTEDI, A. P.; MARIM, B. G.; MOREIRA, G. R.; ABREU, F. B.; YUHAZ, A. C. P.; RIBEIRO, N. B. Recursos Genéticos de tomateiro. **Recursos Genéticos de Hortaliças**, v. 1, p. 169-190, 2005.

SILVA, D. J. H.; MOURA, M. C. C. L.; CASALI, V. W. D. Recursos genéticos do banco de germoplasma de hortaliças da UFV: histórico e expedições de coleta. **Horticultura Brasileira**, v. 19, p. 108-114, 2001.

SILVA-SANCHEZ, C.; LI, H.; CHEN, S. Recent advances and challenges in plant phosphoproteomics. **Proteomics**, v. 15, n. 5-6, p. 1127-1141, 2015.

SMART, C. D.; TANKSLE, S. D.; MAYTON, H.; FRY, W. E. Resistance to *Phytophthora infestans* in *Lycopersicon pennellii*. **Plant Disease**, v. 91, p.1045-1049, 2007.

STROUD, J. A.; SHAW, D. S.; HALE, M. D.; STEELE, K. A. SSR assessment of *Phytophthora infestans* populations on tomato and potato in British gardens demonstrates high diversity but no evidence for host specialization. **Plant Pathology**, v. 65, n. 2, p. 334-341, 2016.

TURKENSTEEN, L. J. **Partial resistance of tomatoes against *Phytophthora infestans*, the late blight fungus**. 1973. 88p. Thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 1973.

VALOIS, A. C. C. **Genética aplicada a recursos fitogenéticos**. Brasília: Editora UNEB, 1998. 318p.

VALLEDOR, L.; JORRÍN, J. Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 1, p. 1-18, 2011.

VAUDEL, M.; VENNE, A. S.; BERVEN, F.S.; ZAHEDI, R. P.; MARTENS, L.; BARSNES, H. Shedding light on black boxes in protein identification. **Proteomics**, v. 14, p. 1001–1005, 2014.

WILKINS, M. R.; SANCHEZ, J. C.; GOOLEY, A. A.; APPEL, R. D.; HUMPHERYSMITH, I.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L. Progress with

proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 19-50, 1995.

ZHANG, Y.; LUBBERSTEDT, T.; XU, M. The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, n. 1, p. 23-35, 2013.

**CAPÍTULO I - Análise comparativa do proteoma constitutivo de genótipos de
tomateiro contrastantes quanto à resistência à requeima**

Análise comparativa do proteoma constitutivo de genótipos de tomateiro contrastantes quanto à resistência à requeima

RESUMO- A requeima é uma das doenças mais destrutivas do tomateiro, resultando em substanciais perdas econômicas. Há dificuldade no controle desta doença, por isso a caracterização molecular de genótipos de tomateiro pode auxiliar na seleção de plantas superiores quanto à resistência ao patógeno. O objetivo foi analisar possíveis diferenças entre os proteomas constitutivos do acesso BGH-2127 e do cultivar Santa Clara, resistente e suscetível à requeima, respectivamente. Foi realizada análise proteômica de amostras de folhas por eletroforese bidimensional (2-DE), seguida da identificação de proteínas por espectrometria de massas (*MALDI TOF/TOF*). Dezenove proteínas foram identificadas e estão relacionadas com metabolismo e energia, fotossíntese, estresse e defesa e à transcrição. Aproximadamente 90% destas proteínas foram mais abundantes no cultivar Santa Clara. As proteínas endoquitinase ácida de 26 kDa e ribonuclease T2 foram mais abundantes no BGH-2127. Os padrões de expressão avaliados por PCR em tempo real diferiram dos resultados da análise proteômica. Diferenças na abundância das proteínas endoquitinase ácida de 26 kDa e ribonuclease T2 entre os proteomas constitutivos dos genótipos avaliados podem contribuir para o mecanismo de resistência do BGH-2127 à requeima.

Palavras-chave: Análise proteômica, Recursos Genéticos, *Solanum lycopersicum*, resistência à *Phytophthora infestans*.

Comparative analysis of constitutive proteome between resistant and susceptible tomato genotypes regarding to late blight

ABSTRACT- Late blight is one of the most destructive diseases of the tomato, resulting in substantial economic losses. There is difficulty in controlling this disease, so the molecular characterization of tomato genotypes may help in the selection of higher resistance tomato plants against *Phytophthora infestans*, late blight's pathogen. The objective was to analyze the differences with regard to the constitutive proteome from between the access BGH-2127, resistant genotype, and Santa Clara susceptible genotype, to late blight. Proteomic analysis of leaf samples by two-dimensional electrophoresis (2-DE) followed by identification by mass spectrometry (MALDI TOF/TOF) was performed. Nineteen proteins were identified, which were then related to metabolism and energy, photosynthesis, transcription, stress and defenses. Approximately 90% of these proteins were more abundant in Santa Clara, a susceptible cultivar. Acidic 26 kDa endochitinase and ribonuclease T2 proteins were more abundant in BGH-2127 access. Gene expression analyses by real time PCR demonstrated that the mRNA levels were not correlated with the respective protein levels. Abundance of the acidic 26 kDa endochitinase and ribonuclease T2 proteins in the constitutive proteomes of BGH-2127 may be associated with the answer to the resistance of this access.

Key words: Proteomic analysis, Genetic resources, *Solanum lycopersicum*, resistance to *Phytophthora infestans*.

1. INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das culturas mais importantes em todo o mundo e considerado um modelo para estudos genéticos da resistência de plantas a patógenos (Ercolano et al., 2012). No entanto, um dos principais problemas permanece sem solução, o oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, agente etiológico da requeima, um dos patógenos mais destrutivos da cultura que resulta em substanciais perdas econômicas (Nowicki et al., 2012).

A maioria dos cultivares de tomateiro são suscetíveis à requeima e o manejo da doença é realizado principalmente pela aplicação de fungicidas (Foolad et al., 2014), uma prática onerosa que pode causar danos ao ambiente e contribuir para a seleção de isolados resistentes (Hu et al., 2012). Alternativamente, o desenvolvimento e uso de cultivares geneticamente resistentes representam estratégia satisfatória do ponto de vista social, econômico e ambiental para o controle da requeima (Mundt, 2014).

Fontes de resistência qualitativa conferida pelos genes *Ph1*, *Ph2* e *Ph3* identificados na espécie silvestre *Solanum pimpinellifolium* foram citadas por Nowicki et al. (2012), porém existem relatos que isolados de *P. infestans* suplantaram a resistência conferida por estes genes (Michalska et al., 2016). Resistência do tipo quantitativa também foi reportada na espécie silvestre *Solanum habrochaites* (Abreu et al., 2008), mas ainda não tem sido amplamente utilizada, dada a natureza complexa da herança da resistência (Abreu et al., 2008), ou por estar ligada a características agronômicas indesejáveis (Haggard et al., 2015). Como alternativa, visualiza-se a transferência de genes de resistência presentes em acessos de tomateiro conservados em Bancos de Germoplasma, que pertençam à mesma espécie que se deseja melhorar, possibilitando facilitar cruzamentos para transferência de genes (Abreu et al., 2008) e recuperação mais rápida das características agronômicas desejadas (Adalid et al., 2012).

O acesso BGH-2127 utilizado neste estudo, pertence a espécie cultivada *Solanum lycopersicum* e está conservado no Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV). Este acesso foi avaliado e destacou-se quanto ao nível de resistência à requeima (Laurindo et al., 2016).

A natureza complexa da herança e a elevada influência ambiental interferem na avaliação de genótipos resistentes, tornando-se perturbadores da seleção fenotípica. Neste contexto, a metodologia da análise proteômica torna-se uma alternativa viável de análise molecular, fornecendo informações e ferramentas para maior entendimento da relação planta-patógeno e obtenção de cultivares resistentes. A proteômica oferece a possibilidade de analisar alterações na abundância de proteínas, interações, atividades

emodificações pós-traducionais diante de diversas condições fisiológicas e, ou patológicas (Gu & Yu, 2014). Esta metodologia é amplamente utilizada em diferentes segmentos de pesquisa envolvendo plantas, com ênfase na resposta a aspectos bióticos, abióticos e fisiológicos do desenvolvimento (Negri et al., 2011; Kumar et al., 2015; Zhang et al., 2015). Na cultura do tomateiro, a análise proteômica tem sido utilizada com sucesso na identificação de proteínas em diferentes patossistemas (Ghosh et al., 2016; Zhang et al., 2016; Gong et al., 2017).

Determinadas proteínas podem estar presentes de forma constitutiva em plantas, como por exemplo diferentes tipos de β -1,3-glucanases e quitinases, que podem também aumentar sob outras condições de estresse. Estas proteínas possuem potencial para degradar componentes da parede celular de patógenos, contribuindo para o evento da resistência das plantas (Balasubramanian et al., 2012; Cletus et al., 2013). Assim, a avaliação do proteoma constitutivo de genótipos de tomateiro contrastantes quando à resistência à requeima pode contribuir para melhor entender possíveis mecanismos de resistência utilizados contra essa doença.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi analisar possíveis diferenças entre os proteomas constitutivos do acesso BGH-2127 e do cultivar Santa Clara, resistente e suscetível à requeima, respectivamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Recursos fitogenéticos e condução do experimento

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 45' 14" S, 42° 52' 53" W, altitude de 648,74 m).

O acesso BGH-2127 resistente a requeima (Laurindo et al., 2016), conservado no Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV e o cultivar suscetível Santa Clara (Abreu et al., 2008), ambos pertencentes à espécie *S. lycopersicum* foram avaliados. As plantas foram conduzidas em casa de vegetação, em vasos de 10 litros com uma única haste e tutoradas com fitilho. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três repetições, sendo estas constituídas por três vasos contendo uma planta cada.

2.2 Análise proteômica

2.2.1 Extração e quantificação de proteínas

A extração seguiu-se de acordo com Shen et al. (2002), com modificações. Folhas de tomateiro (5 g) de cada genótipo foram pulverizadas individualmente em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo. O pó obtido foi homogeneizado com polivinilpirrolidona (PVPP) 2% e adicionado de tampão de extração na proporção de 1:4 (amostra:solução, p:v), contendo Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, sacarose 250 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 mM, Triton X-100 1% (p/v), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM, tiourea 2 mM, benzamidina 1 mM e ditioneitol (DTT) 1 mM. Após agitação por 2h a 4°C, o material foi centrifugado a 20.100 x g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi reservado (sobrenadante 1). Ao precipitado, adicionou-se novamente o tampão de extração na proporção 1:4 (amostra:solução, p:v). Após 1h e 15 min sob agitação a 4°C, o material foi novamente centrifugado a 20.100 x g por 30 min a 4°C. O sobrenadante obtido foi recuperado (sobrenadante 2) e misturado ao anteriormente reservado (sobrenadante 1), formando o extrato proteico solúvel.

As proteínas foram então precipitadas *overnight* a -20°C pela adição de ácido tricloroacético 10% em acetona gelada e DTT 1 mM, na proporção de 1:1,5 (amostra:solução, v:v). Cada amostra foi então centrifugada a 20.100 x g por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado quatro vezes com acetona gelada e uma vez com etanol 80% (v/v) e DTT 1 mM, e seco a temperatura ambiente em sistema *SpeedVac* (Savant SpeedVac, Thermo Scientific, USA).

O pellet proteico obtido foi solubilizado em 600 µL de tampão de solubilização (ureia 7 M, tiourea 2 M, 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-

propanesulfonate (CHAPS) 2%, e DTT 0,3%), com a ajuda de um sonicador de banho. O sobrenadante foi removido e quantificado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão.

2.2.2 Eletroforese bidimensional (2-DE)

A focalização isoeétrica (IEF) das proteínas foi realizada utilizando fitas de 24 cm contendo gradiente imobilizado de pH (IPG) entre 3 e 10, em equipamento *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare, USA). Uma alíquota da amostra contendo 1.200 µg de proteína foi acrescida de tampão de reidratação constituído de DTT 40 mM, tampão IPG com pH 3 a 10 e o reagente comercial *DeStreak* (GE Healthcare, USA), em um volume total de 450 µL. As fitas foram focalizadas sob temperatura controlada de 20°C, de acordo com as seguintes etapas: 1) 200 V.h em passo único por 2 horas; 2) 500 V.h em passo único de 500 volts; 3) 800 V.h em gradiente até 1.000 volts; 4) 16.500 V.h em gradiente até 10.000 volts; 5) 27.500 V.h em passo único de 10.000 volts. A amperagem máxima foi de 50 µA por fita. Após a focalização, as fitas foram imediatamente armazenadas a -80°C até o momento da utilização para a separação por massa em segunda dimensão.

As proteínas foram reduzidas equilibrando-se as fitas IPG, por 15 min, em tampão DTT (ureia 6 M, glicerol 25,5% (v/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 2%, DTT 1%, azul de bromofenol 0,002% e Tris-HCl 75 mM, pH 8,8). Em seguida foram alquiladas em tampão similar ao tampão DTT, porém contendo iodoacetamida 2,5% por 15 min. As fitas foram colocadas no topo do gel-SDS e fixadas com solução de agarose (agarose 0,5%, azul de bromofenol 0,002%, Tris 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 1%).

A segunda dimensão foi realizada em *SDS-PAGE* a 12,5%T, em cuba tipo *DaltSix* (GE Healthcare, USA), como descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada inicialmente 10 mA por gel e voltagem de 80 V, por 45 min, seguindo-se o uso de corrente de 40 mA por gel e voltagem de 500 V 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. O marcador de massa molecular *Broad Range* (*Bio-Rad*) foi utilizado. Foram feitos três géis por tratamento, correspondentes a três repetições biológicas.

Ao término da 2ª dimensão, as proteínas foram fixadas com solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) por 12 h, seguindo-se revelação por 72 h em solução contendo sulfato de amônio a 8% (m/v), coomassie blue G-250 0,08% e etanol 20% (v/v). Os géis foram armazenados em solução contendo ácido acético 5% (v/v).

2.2.3 Aquisição e análise de imagens dos géis 2-DE

Os géis foram digitalizados com o auxílio do equipamento *Image Scanner III* (GE Healthcare, USA). As imagens foram analisadas utilizando o *software ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare, USA). Os valores de expressão foram considerados significativos segundo ANOVA a $p < 0,05$. As proteínas em que a abundância variou pelo menos 1,5 vezes foram consideradas diferencialmente abundantes.

2.2.4 Tripsinização das amostras

A tripsinização foi realizada segundo Shevchenko et al. (2006) com modificações. Inicialmente, os *spots* diferencialmente abundantes foram retirados dos géis e para a remoção de corantes, os pedaços de géis contendo as proteínas foram transferidos para tubos de 500 μ l contendo solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM (v/v) para uma primeira lavagem por 12 horas. Em seguida, procedeu-se uma segunda lavagem na mesma solução por 1 hora, e outra lavagem com solução de metanol 50% em bicarbonato de amônio 25 mM (v/v) por mais 1 hora. A solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila por 5 min por 2 vezes com secagem em *SpeedVac Concentrator Plus* (Eppendorf) por 10 min. As proteínas foram reduzidas com DTT 25 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min a 56°C, em banho-maria, e alquiladas com iodoacetamida a 75 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min, à temperatura ambiente. Os pedaços de gel foram lavados com bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min por 2 vezes, e desidratados em acetonitrila por 5 min com secagem em *SpeedVac Concentrator Plus* (Eppendorf) por 10 min.

Para a digestão enzimática, os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (20 μ g/mL) em solução de bicarbonato de amônio 40 mM, pH 8,0 e acetonitrila 10%. A solução com enzima (15 μ l) (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade, Promega V5280*) foi adicionada fria (4°C) e as amostras foram mantidas em gelo durante 45 min para penetrar no gel. Às amostras foram adicionados 50 μ L da solução de bicarbonato de amônio 40 mM em acetonitrila 10% (v/v) e incubadas a 37°C durante 22 h em banho-maria.

Os pedaços de gel foram submetidos a banho ultrassom por 10 min, agitados a 1.500 x g por 2 min e a solução foi removida para novos tubos. Aos pedaços de gel restantes, em duas etapas sequenciais, foram adicionados 40 μ L da solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% (v/v), para recuperar a maior quantidade de fragmentos

trípticos. Foram novamente agitados a 1.500 x g por 2 minutos e as soluções foram removidas e adicionada ao tubo novo.

Após essas etapas toda a solução foi totalmente evaporada em *SpeedVac Concentrator Plus (Eppendorf)* e os peptídeos trípticos foram ressuspensos em 2,5 µl de solução contendo ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. Todas as amostras foram submetidas à dessalinização em coluna de hidrofobicidade C18 (*ZipTip - Eppendorf*), seguindo recomendações do fabricante.

2.2.5 Espectrometria de massas e identificação de proteínas

A identificação das proteínas foi realizada utilizando-se o espectrômetro de massas do tipo *MALDI-TOF/TOF Ultraflex III* (Bruker Daltonics), disponibilizado pelo Núcleo de Análises de Biomoléculas da UFV. Cerca de 1 µl de cada amostra contendo os peptídeos foi aplicada à placa de aço do espectrômetro de massas juntamente com matriz de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (10 mg ml⁻¹) (Sigma), numa proporção 1:1. As amostras foram analisadas no modo positivo com refletor ativado.

As listas de massas foram confrontadas contra os Bancos de Dados de proteínas do gênero *Lycopersicum* (*download* em 21/03/16, com 33.950 entradas), da família *Solanaceae* (*download* em 14/03/2016, com 114.203 entradas) e do grupo *Viridiplantae* (*download* em 27/04/15, com 2.864.275 entradas), todos obtidos do *UNIPROT*, por meio do uso do aplicativo *MASCOT*, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; permitindo uma tolerância de erro para o íon parental de 0,2 Da e para os fragmentos de 0,5 Da; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

As proteínas identificadas pelo *MASCOT* como “*Uncharacterized*” foram processadas por meio do algoritmo *BLAST* (Altschul et al., 1990). Através desse algoritmo foi possível identificar quais as proteínas constantes do banco de dados depositado no *Phytozome*, cujas sequências apresentaram maior nível de identidade com as sequências das proteínas “*Uncharacterized*”.

O resultado obtido pelo *MASCOT* foi validado pelo aplicativo *SCAFFOLD*, versão 3.6.4 (Proteome Software INc., Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados foi aplicado o algoritmo *Peptide Prophet* (Keller et al., 2002) e para as proteínas o algoritmo *Protein Prophet* (Nesvizhskii et al., 2003), como critério de aceitação foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90% de probabilidade de

identificação para ambos, peptídeos e proteínas, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

2.3 Atividade enzimática para validação de duas proteínas identificadas

2.3.1 Preparo dos extratos vegetais e quantificação de proteínas

Os extratos vegetais foram preparados a partir de folhas de cada genótipo (5g) pulverizados separadamente em nitrogênio líquido. Ao pó obtido, foram adicionados PVPP 2% e TrisHCl 50 mmol L⁻¹, pH 7,0 (1:3, g:mL), acrescido de PMSF e benzamidina 1,0 mmol L⁻¹. Os extratos foram centrifugados a 20.100 x g a 4°C, por 25 min, e os sobrenadantes foram recuperados e utilizados para avaliar as atividades enzimáticas conforme Almeida et al. (2012). A quantificação da proteína solúvel foi realizada conforme Bradford (1976), usando albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados corresponderam à média dos valores obtidos.

2.3.2 Atividade de peroxidases

As peroxidases (EC 1.11.1.7) foram avaliadas em 470 nm, a 30°C, pela produção de tetraguaiacol (Silva et al., 2004). A mistura de reação foi constituída de 1.019 µL de solução de reação (125 µL de guaiacol, 153 µL de peróxido de hidrogênio e 50 mL de fosfato de sódio 10 mmol L⁻¹, pH 6,0) e 1 µL do extrato vegetal. Após três minutos de incubação, os valores de absorbância foram avaliados em dois momentos da reação, e a atividade das peroxidases foi expressa em variação da absorbância a 470 nm por minuto por µg de proteína.

2.3.3 Atividade de quitinases

As quitinases (EC 3.2.1.14) foram avaliadas a 25°C por 48 horas, por meio da variação colorimétrica da reação sobre o substrato *Chitin Azure* (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP), a partir de fragmentos insolúveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Chitin-RBV) (Hackman & Goldberg, 1964). Fragmentos (50 µg) do substrato insolúvel foram acrescidos de 600 µL de tampão de extração e 400 µL do extrato. Em seguida, a mistura foi incubada, e os valores de absorbância a 575 nm da amostra e do controle foram avaliados. Na reação-controle, o extrato foi substituído por tampão de extração. A atividade foi expressa em variação da absorbância a 575 nm por dia por g de quitina por µg de proteína.

Os dados da atividade enzimática foram submetidos à análise de variância, pelo

teste F, com o auxílio do aplicativo computacional GENES (Cruz, 2013).

2.4 Análises de bioinformática

Todas as proteínas identificadas foram funcionalmente categorizadas com auxílio do *software Mapman* (Thimm et al., 2004).

2.5 Análise da expressão relativa de proteínas por PCR em tempo real (RT-PCR)

As amostras de folha de plantas do acesso BGH-2127 e do cultivar Santa Clara foram maceradas em nitrogênio líquido e o RNA total extraído com o uso do reagente *TRIZOL* (Invitrogen), conforme o protocolo do fabricante.

Em aproximadamente 100 mg do material macerado foi adicionado 1 mL do reagente *TRIZOL* e as amostras foram incubadas por 5 minutos. Posteriormente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados ao tubo e após homogeneização por 3 minutos, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, sendo adicionados 500 µL de álcool isopropílico. Após 30 minutos e centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o *pellet* formado lavado com etanol a 75%. Após nova centrifugação a 9.500 x g por 5 minutos a 4°C, o excesso de etanol foi removido e o *pellet* ressuspensionado com água livre de DNases e RNases. O RNA foi quantificado (*SpectraMax M5 microplate/cuvette reader* (Molecular Devices)) e analisado em gel de agarose 1,5 % (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL.

Para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega). Para tal, ao RNA total (3 µg) foram adicionados 3 µL de DNase (1u/µL), 1 µL de *RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer* e água tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC) para completar o volume final de 10 µL. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A enzima foi inativada pela adição de 1µl de *RQ1 DNaseStop Solution* e incubação por 10 minutos a 65°C. Para a realização da transcrição reversa, 500 ng de RNA tratado com DNase foi utilizado na reação e adicionou-se 1 µL de *oligodT* (estoque a 500 µg/mL). O RNA foi desnaturado a 70°C por 5 minutos (seguida de incubação em gelo por 1 minuto) sendo então adicionados ao tubo 4 µL de *5X First-Strand Buffer*, 2 µL de DTT 0,1M, 1 µL de dNTP *mix* (dGTP, dCTP, dATP, dTTP – estoque a 10 mM), 1 µL *RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (40 units/µL), 1 µL da enzima *M-MLV RT* (200 U/µL - Promega) e água DEPC para completar o volume final de 12 µL. As amostras foram incubadas a 42°C por 60 minutos. O cDNA obtido foi quantificado *SpectraMax M5 microplate/cuvette reader* (Molecular Devices).

Os ensaios de PCR em tempo real foram conduzidos conforme manuais da *Applied Biosystems*. As amostras de cDNA foram diluídas para uma concentração final de 100 ng/μL.

A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada utilizando o aparelho *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O volume total da reação por amostra foi de 10 μL, composta de oligonucleotídeos específicos que codificam as proteínas 2-cis peroxirredoxina BAS1 (FW: 5'-CCTTCTGCTTTTAATGGACTTCGT-3'; RV: 5'-TGAGCAACCCGAGTATTGATTG-3'), tiorredoxina peroxidase (FW: 5'-TCTCAGTCGACAATTGTTTCCTTCT-3'; RV: 5'-GGATCGGGATTTGTTGATACGA-3'), endoquitinase ácida de 26 kDa (FW: 5'-TGCCACAACGTTATCATTGGA-3'; RV: 5'-ATGACACCGTACCCTGGA-3'), cDNAs de plantas do BGH-2127 e do Santa Clara e o *kit SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em duplicatas empregando placas de 48 poços. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o *software REST*. Como controle endógeno para normalização dos dados do PCR em tempo real foi utilizado o *primer* específico actina (FW: 5'-CCTTCAACGTTCCAGCTATG-3'; RV: 5'-TCACCAGAGTCCAACACAATAC-3') (Li & Luan, 2014).

3. RESULTADOS

3.1 Análise do perfil proteico constitutivo

A análise proteômica em gel bidimensional dos genótipos de tomateiro contrastantes quanto à resistência à requeima evidenciou que 41 *spots* tiveram abundância diferencial ($p < 0,05$). Deste total, 19 proteínas foram identificadas por espectrometria de massas (Figura 1) e corresponderam a 17 proteínas diferentes (Tabela 1). Os *spots* 24 e 122 foram identificadas como ATP sintase subunidade beta, e os *spots* 140 e 268 como Subunidade II do centro de reação do FI.

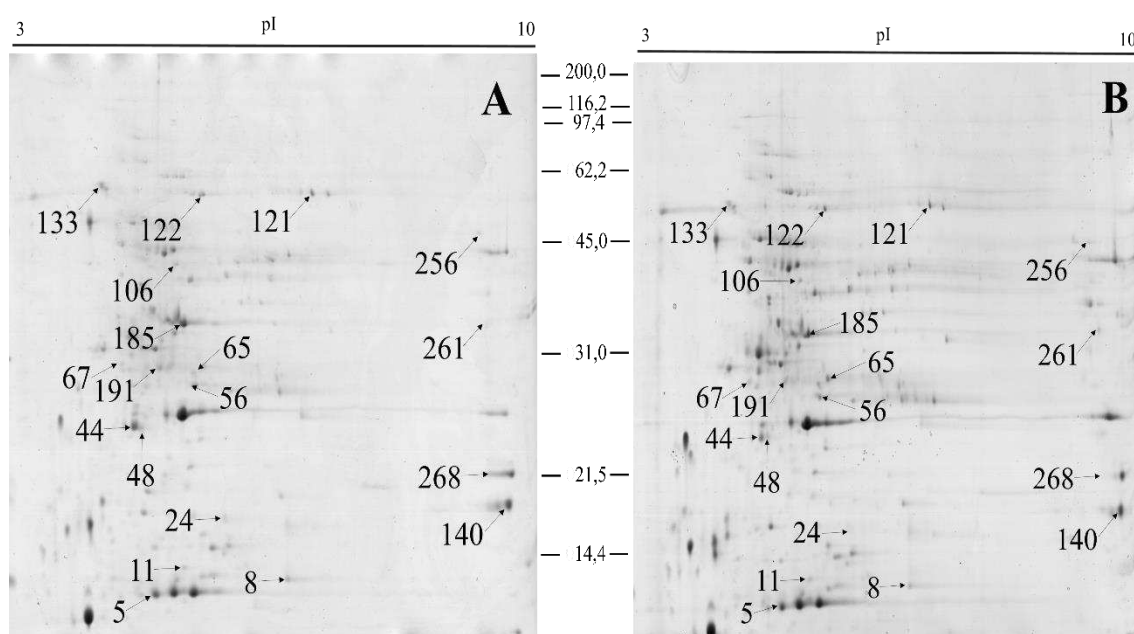


Figura 1. Géis bidimensionais representativos do extrato de folhas de tomateiro em IPG pH 3 a 10 e *SDS-PAGE* 12,5%T em gel de 24 cm, com *spots* diferencialmente abundantes identificados e seus respectivos números de identificação (ID conforme Tabela 1) para comparação entre os genótipos Santa Clara (A) e BGH-2127 (B), suscetível e resistente à requeima respectivamente. pI: ponto isoelétrico; MM: marcador de massas moleculares *Broad Range* (Bio-Rad) em kDa.

Tabela 1. Proteínas diferencialmente abundantes em folhas de tomateiro dos genótipos BGH-2127 e Santa Clara, resistente e suscetível à requeima, respectivamente, identificadas por espectrometria de massas

ª ID	Acesso (UNIPROT)	Proteína (Organismo)	ªpI/MM		ªNível de abundância	Anova (p<0.05)	ªCobertura (%)	ªScore	ªPeptídeos identificados
			Experimental	Teórico					
Energia e metabolismo									
8	K4AYT8	Nucleosídeo difosfoquinase (<i>Solanum lycopersicum</i>)	6,66/12,10	6,32/16,24	-2,07	0,008	10,80	100	IIGATNPLESAAAGTIR
*24	Q2MI94	ATP sintase subunidade beta (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,74/16,51	5,43/14,57	-4,18	0,001	19,50	169	IGNNEITVLVNDAEK TLNLSVLTPNR
122	Q2MI93	ATP sintase subunidade beta (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,50/54,28	5,28/53,49	-2,19	0,025	4,60	183	AHGGVSVFGGVGER FVQAGSEVSALLGR
256	Q645M9	Malato desidrogenase glioissomal (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,27/35,37	8,40/37,94	-2,43	0,006	5,37	60	TPIQYFNR
Fotossíntese									
5	A9S3R8	Ribulose bifosfato carboxilase subunidade menor (<i>Physcomitrella patens</i>)	4,81/11,80	8,20/20,16	-2,67	0,045	6,63	178	ENNSSPGYYDGR
*106	K4B4L4	Estabilidade do FSII/Fator de montagem HCF136 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,12/40,68	6,25/41,16	-1,94	0,030	15,90	236	GFGILDVGYR GTGLTEDFEEVSVQSR SIASAEEDFNRYR TVSSGISGASYTGTTFSTVNR
121	P27065	Ribulose bifosfato carboxilasesubunidade maior (<i>Solanum lycopersicum</i>)	7,09/54,22	6,55/53,43	-2,95	0,035	6,29	243	DITLGFVDLLR DNGLLLHIHR DTDILAAFR
140	P12372	Subunidade II do centro de reação FSI (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,73/17,98	9,71/22,96	-10,09	0,038	3,37	50	INYQFYR
185	P23322	Proteína envolvida no enriquecimento de oxigênio 1 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,23/32,50	5,91/35,15	-1,64	0,024	2,43	81	VPFLFTIK
*191	K4B876	Clorofila de ligação a/b (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,87/28,87	5,15/28,20	-2,31	0,018	7,92	76	FGEAVWFK SAPSSSPWYGPDR
268	P12372	Subunidade II do centro de reação FSI (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,76/21,56	9,71/22,96	-2,58	0,004	48	3,37	INYQFYR

Estresse e defesa

*44	K4D389	2-cis peroxirredoxina BAS1 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,53/23,80	6,00/29,73	-3,03	0,006	14,2	155	AYNVLIPDQGIALLR VNTEILGVSVDVFSHLAWVQTER
48	K0I7G7	Tiorredoxina peroxidase (<i>Nicotiana tabacum</i>)	4,70/24,67	8,25/39,97	-2,16	0,006	5,19	90	SYNVLIPDQGIALLR
56	Q9M5A8	Chaperonina 21 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,66/36,59	5,84/56,02	-1,53	0,039	7,03	394	HYAGYVNIDESHGK NLYYYFVESER WFEIYPEFLK ELFEQMLSFR
65	Q05539	Endoquitinase ácida de 26 kDa (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,52/28,15	5,93/28,01	+1,77	0,036	3,95	65	ELFEQMLSFR
*131	K4B172	Calreticulina (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,09/57,73	4,50/40,80	-1,73	0,011	3,36	53	FYAISAEFPEFSNK
261	K4CBC7	Ribonuclease T2 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,95/30,89	8,52/17,34	+2,43	0,006	5,37	66	TPIQYFNR

Transcrição

*67	K4BK45	Fator de <i>splicing</i> 3B, subunidade IV (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,36/28,97	4,70/32,68	-1,65	0,035	4,73	68	IYVGNIPWDIDDAR
-----	--------	---	------------	------------	-------	-------	------	----	----------------

Outras proteínas

*11	K4CA08	Repetições de pentapéptido (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,23/13,53	8,24/24,76	-1,58	0,026	6,58	70	GSVIQGADFTDVPLR
-----	--------	---	------------	------------	-------	-------	------	----	-----------------

^aID representa o número de identificação das proteínas nos géis bidimensionais.

^bPontos isoelétricos (pI) e massas moleculares (MM em KDa) experimentais e teóricos.

^cNível de abundância representados pela % de volume dos *spots*: os sinais (+) e (-) indicam maior e menor abundância da proteína, respectivamente, para o genótipo BGH-2127(resistente) em relação ao cultivar Santa Clara (suscetível) à requeima.

^dPorcentagem de cobertura.

^e*Score Mascot*.

^fPeptídeos identificados e confirmados com pelo menos de 90% de certeza pelo *software Scaffold*.

**BLAST* realizado a partir da sequência obtida do *UNIPROT* no *Phytozome*.

As 19 proteínas identificadas foram categorizadas em cinco grupos de funções biológicas relacionadas ao metabolismo e energia, fotossíntese, estresse e defesa, transcrição e outras funções (Figura 2; Tabela 1).

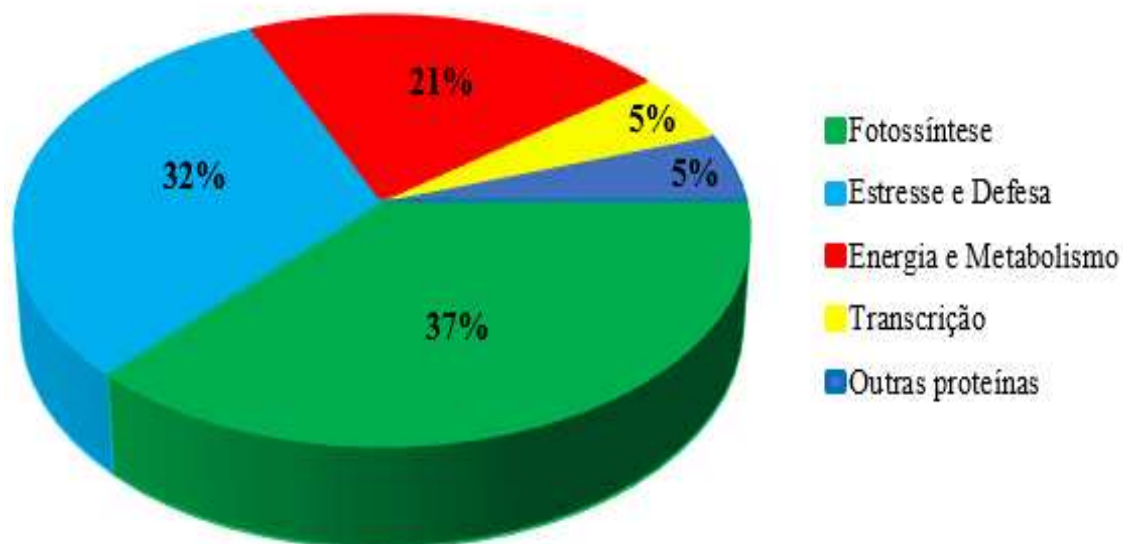


Figura 2. Distribuição das funções biológicas das proteínas diferencialmente abundantes entre os genótipos BGH-2127 (resistente) e Santa Clara (suscetível) de acordo com *software Mapman*.

Proteínas relacionadas ao metabolismo e energia, fotossíntese, transcrição e outras funções tiveram maior abundância no cultivar Santa Clara. Somente as proteínas endoquitinase ácida de 26 kDa (*spot 65*) e ribonuclease T2 (*spot 261*) do grupo de estresse e defesa tiveram maior abundância no acesso BGH-2127 (Figura 3). Entre as proteínas identificadas relacionadas ao estresse e defesa, a 2-cis peroxirredoxina BAS1 (*spot 44*), tioredoxina peroxidase (*spot 48*) e endoquitinase ácida de 26 kDa (*spot 65*), possuem funções bem conhecidas em mecanismos de defesa de plantas.

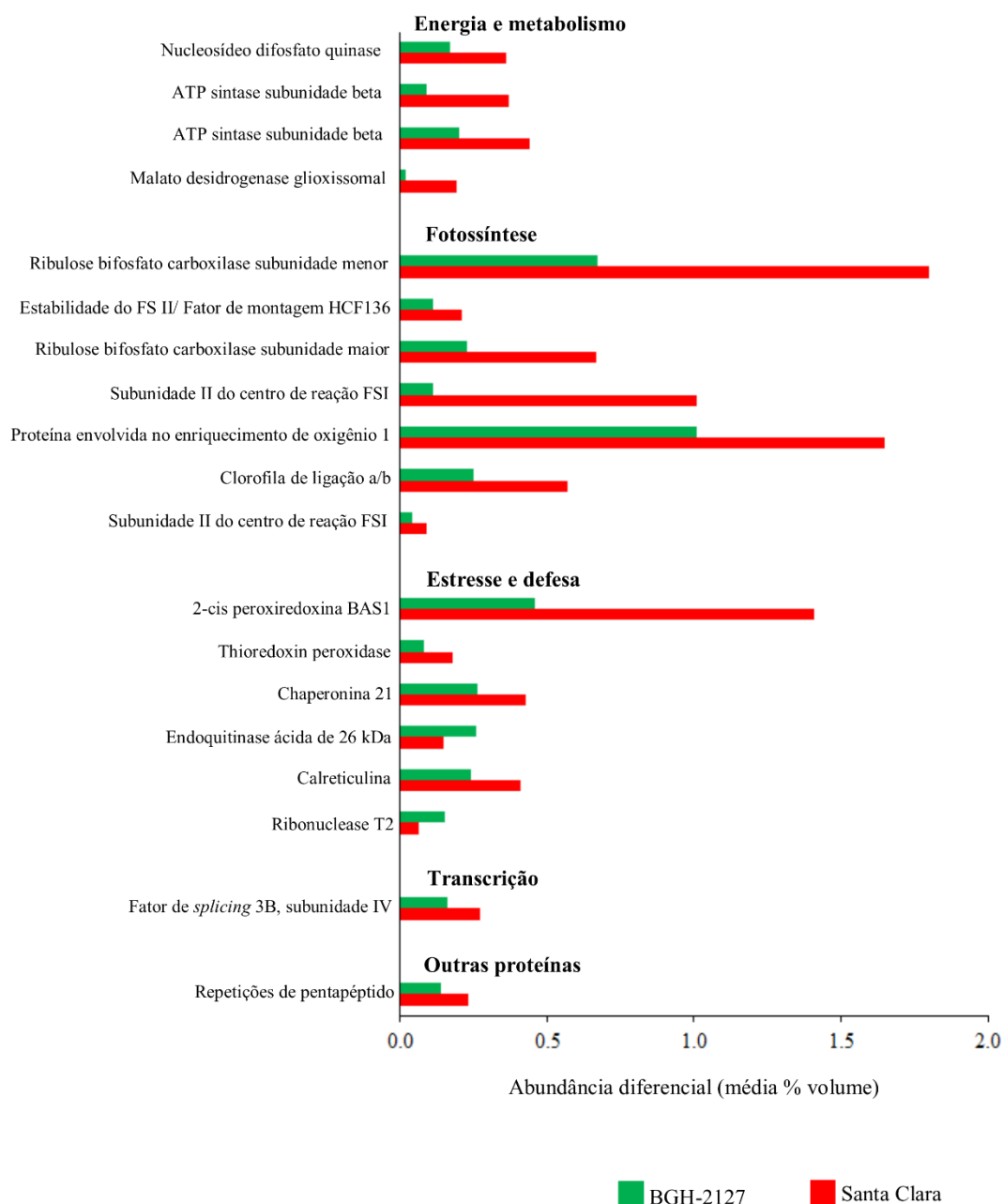


Figura 3. Nível de abundância de proteínas entre os genótipos BGH-2127 (resistente) e Santa Clara (suscetível).

3.2 Análise da atividade enzimática

Atividades enzimáticas de peroxidases e quitinases confirmaram as variações na abundância diferencial de proteínas relacionadas à defesa entre o acesso BGH-2127 e o cultivar Santa Clara. A atividade das peroxidases entre os genótipos diferiram pelo teste F a 1% de probabilidade. A atividade desta enzima no cultivar Santa Clara foi $0,175 \pm 0,010$ ($\Delta A/\text{min} \cdot \mu\text{g}$ de proteína), para o acesso BGH-2127 esse valor foi $0,058 \pm 0,010$ ($\Delta A/\text{min} \cdot \mu\text{g}$ de proteína).

Para atividade de quitinases não foi observada diferença significativa pelo teste Fa 1% de probabilidade. O valor de atividade dessa enzima no acesso BGH-2127 foi igual a $0,015 \pm 0,004$ (ABS/h.mg de proteína), enquanto o valor do cultivar Santa Clara foi $0,013 \pm 0,000$ (ABS/h.mg de proteína).

3.3 Correlação entre mRNA e abundância de proteínas

Os níveis dos transcritos (mRNA) dos genes que codificam as proteínas 2-cis peroxirredoxina BAS1 (*spot 44*), tiorredoxina peroxidase (*spot 48*) e endoquitinase ácida de 26 kDa (*spot 65*), avaliados entre os genótipos BGH-2127 e Santa Clara, não tiveram correlação com os níveis de abundância das respectivas proteínas.

A expressão do gene que codifica 2-cis peroxirredoxina BAS1 foi maior no acesso a BGH-2127, enquanto a proteína correspondente foi menos abundante que no cultivar Santa Clara. Não houve diferença no nível de expressão dos genes que codificam a tiorredoxina peroxidase (*spot 48*) e a endoquitinase ácida de 26 kDa (*spot 65*), enquanto a abundância da proteína tiorredoxina peroxidase (*spot 48*) foi menor, e da endoquitinase ácida de 26 kDa (*spot 65*) foi maior no acesso BGH-2127 em relação ao cultivar Santa Clara.

4. DISCUSSÃO

O acesso BGH-2127 é considerado fonte de resistência à requeima e pertence à espécie cultivada *S. lycopersicum* (Laurindo et al., 2016). Esta característica diferencial possibilita sua utilização em programas de melhoramento, pois, problemas devido ao arraste gênico ocorrido quando genitores silvestres são utilizados seriam minimizados, uma vez que QTL's responsáveis pela resistência à requeima afetando características morfoagronômicas de interesse na cultura do tomateiro são reportados (Haggard et al., 2015).

Com base nas variações da abundância diferencial das proteínas, foram consideradas suas relações com diferentes processos biológicos, visando demonstrar suas possíveis contribuições para a resistência à requeima do acesso BGH-2127.

A resistência de plantas a patógenos resulta de vários fatores fisiológicos e, ou, mecanismos bioquímicos (Galmés et al., 2011), que ocasionam a síntese de proteínas de forma constitutiva ou induzida. Neste trabalho, as proteínas constitutivas de maior importância identificadas foram relacionadas a processos do metabolismo e energia, fotossíntese, estresse e defesa e à transcrição. Aproximadamente 90% das proteínas constitutivas identificadas tiveram menor abundância no acesso BGH-2127 quando comparadas ao cultivar Santa Clara. As exceções foram as proteínas endoquitinase ácida de 26 kDa (*spot* 65) e ribonuclease T2 (*spot* 261) que foram mais abundantes no acesso BGH-2127. Em folhas de soja inoculadas com *Cercospora kikuchii* e *Diaporthe phaseolorum* foi observado que as proteínas quitinase e ribonuclease aumentaram significativamente na presença dos agentes patogênicos (Upchurch & Ramirez, 2010).

Os 19 *spots* identificados corresponderam a 17 proteínas diferentes, uma vez que duas delas foram representadas por mais de um *spot* no mesmo gel (*spots* 24 e 122). Esses resultados indicam *spots* com diferentes valores de massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) para uma mesma proteína, que ocorrem devido a alterações no proteoma e podem ser atribuídas a modificações pós-traducionais, ou a presença de diferentes formas da mesma proteína de uma determinada família funcional (Wu et al., 2013).

4.1 Proteínas relacionadas a energia e metabolismo

Em plantas muitas proteínas estão envolvidas em vias metabólicas e energéticas, sendo consideradas importantes na resposta à infecção (Cipriano et al., 2016). Nucleosídeo difosfato quinase (*spot* 8) é uma proteína componente da via de resistência de plantas de tomate ao agente patogênico *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Xing et

al., 2008), e são também consideradas membros de sinalização na imunidade inata de plantas (Tena et al., 2011).

Proteínas que fazem parte do complexo de ATP sintase consistem em várias subunidades, e utilizam o gradiente de prótons transmembranares para a biossíntese de ATP celular (Millar et al., 2011). O ATP celular possui papel importante como molécula de sinalização em respostas ao estresse, incluindo aqueles causados por patógenos (Cao et al., 2014). Dois *spots* (24 e 122) foram identificados como ATP sintase subunidade beta. Esta proteína serve como alvo para o ATP extracelular que atua como regulador negativo da morte celular em plantas. Isso foi verificado em plantas de *Arabidopsis*, em que o gene responsável por codificar a proteína ATP sintase subunidade beta foi eliminado, tornando as plantas resistentes a micotoxina fumonisina B1 (Chivasa et al., 2011).

Malato desidrogenase glioxissomal (*spot* 256) está presente nas mitocôndrias, peroxissomos, citoplasma e plastídeos. Convertem oxalacetato em malato utilizando NADPH, facilitando a regeneração do aceptor de elétrons NADP⁺. O ataque de patógenos tem como uma das consequências a rápida formação de espécies reativas do oxigênio, capaz de degradar proteínas (Lehmann et al., 2015). Plantas de *Arabidopsis thaliana* que receberam gene de malato desidrogenase glioxissomal mantiveram os níveis de espécies reativas de oxigênio baixa, indicando aparente ausência de estresse oxidativo (Hebbelmann et al., 2012).

4.2 Proteínas relacionadas à fotossíntese

A fotossíntese é um processo metabólico importante que contribui amplamente para o estado geral de energia celular, para o equilíbrio redox ao fornecer NADPH, ATP e esqueletos de carbono que suportam o crescimento da planta. Além disso, estimulam o início e a manutenção de respostas contra fatores de estresse externos (Kangasjärvi et al., 2014).

As proteínas ribulose bifsosfato carboxilase subunidade menor (*spot* 5) e a ribulose bifsosfato carboxilase subunidade maior (*spot* 121) influenciam diretamente o sucesso do processo fotossintético, produzindo energia para várias atividades metabólicas, inclusive para respostas de defesa das plantas (Liu et al., 2014). Em estudo do patossistema *Nicotiana benthamiana* x *Tomato mosaic tobamovirus* (ToMV) foi verificada a importância da rubisco na defesa das plantas (Zhao et al., 2013).

A proteína subunidade II do centro de reação FSI foi representada por mais de um *spot* no gel (*spots* 140 e 268), indicando a presença de diferentes formas da mesma

proteína. Este fenômeno pode ser atribuído a modificações pós-traducionais, que influenciam a atividade e função dessas proteínas, induzindo a sua ligação com novos grupos funcionais (Liu et al., 2016). Na cultura do milho, foi observado a formação de complexos dessa proteína com as proteínas ferredoxina e ferredoxina-oxidoredutase no centro de reação do FSI, sugerindo um importante papel na infecção causada por *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) (Wu et al., 2013).

As demais proteínas identificadas relacionadas ao processo fotossintético possuem importantes funções no centro de reações do FSII, que é considerado um ponto de sinalização de resistência na interação planta-patógeno (Metha et al., 2008). A proteína estabilidade do FSII/fator de montagem HCF136 (*spot106*) foi descrita como essencial para a estabilidade do FSII, atuando como fator de montagem desse centro de reação. O fator desencadeante é uma chaperona molecular que se liga à subunidade ribossomal 50S no processo de tradução, sendo considerada a primeira proteína a interagir com os polipeptídeos emergentes do ribossomo (Meurer et al., 1998; Plucken et al., 2002; Ludlam et al., 2004). Em *Cucurbita pepo*, essa proteína foi altamente abundante na fase inicial da infecção da doença *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (Nováková et al., 2015).

Uma proteína com função importante nas reações luminosas da fotossíntese identificada é a proteína envolvida no enriquecimento de oxigênio 1 (*spot 185*) (Chamnanmanoontham et al., 2015). Essa proteína foi associada à defesa de plantas de milho contra a infecção causada pelo agente patogênico *Curvularia lunata* (Huang et al., 2009).

A proteína clorofila de ligação a/b (*spot 191*) é responsável pelo equilíbrio da excitação de energia entre o FSI e o FSII (Kundu et al., 2012). Diante do desafio de plantas de amendoim silvestre frente ao patógeno *Phaeoisariopsis personata*, ocorreu expressão diferencial da proteína clorofila de ligação a/b, indicando sua possível participação na resistência a este patógeno (Kumar & Kirti, 2015).

4.3 Proteínas relacionadas ao estresse e defesa

As proteínas relacionadas ao estresse e à defesa desempenham um papel importante durante o desenvolvimento celular em todos os indivíduos, principalmente em resposta a infecções causadas por agentes patogênicos. As proteínas identificadas como 2-cis peroxirredoxina BAS1 (*spot 44*) e tiorredoxina peroxidase (*spot 48*) estão inseridas nas subfamílias em que as peroxidases são subdivididas (Koua et al., 2008). Em plantas, as peroxidases estão ligadas a processos metabólicos, formação de lignina e

suberina, estruturação e alongamento da parede celular. Quando atuam na defesa das células contra a explosão oxidativa, consomem peróxido de hidrogênio no citosol, vacúolo, parede celular e espaço extracelular. Estão ainda ligadas às reações de hipersensibilidade, dificultando a invasão da planta pelo patógeno (Almagro et al., 2009; Karuppanapandian et al., 2011). No entanto, mesmo sendo responsável por importantes funções nas plantas, esse não parece ser o principal mecanismo de resistência do acesso BGH-2127 frente a requeima, devido à menor abundância dessas proteínas quando comparado ao cultivar Santa Clara (Figura 4).

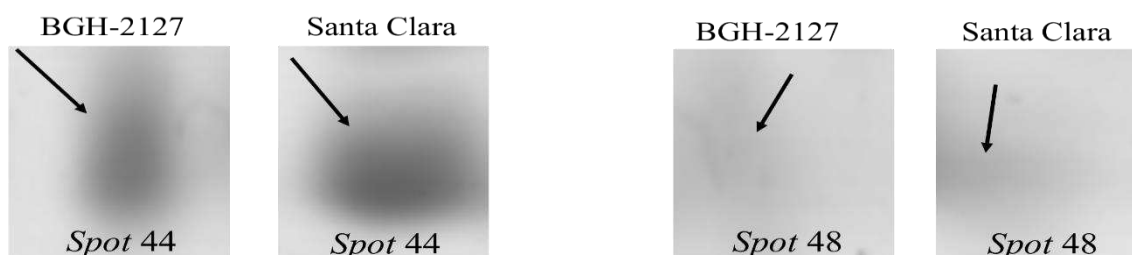


Figura 4. *Spots* das proteínas 2-cis peroxirredoxina BAS1 (*spot* 44) e tiorredoxina peroxidase (*spot* 48) diferencialmente abundantes entre os genótipos BGH-2127 (resistente) e Santa Clara (suscetível).

A proteína endoquitinase ácida de 26 kDa (*spot* 65) foi diferencialmente abundante entre o acesso BGH-2127 e o cultivar Santa Clara, com maior abundância no genótipo resistente (Figura 5).

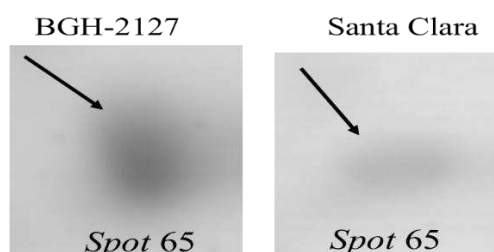


Figura 5. *Spots* da proteína endoquitinase ácida de 26 kDa (*spot* 65) diferencialmente abundante entre os genótipos BGH-2127 (resistente) e Santa Clara (suscetível).

Genes que codificam quitinases em plantas compreendem uma ampla família que diferem em ocorrência e atividade. Quitinases envolvidas na simbiose e no desenvolvimento de nódulos em leguminosas foram verificadas. Estas proteínas foram induzidas por uma série de estresses abióticos. Além disso, podem ainda produzir moléculas de sinalização ou fatores morfogênicos (Grover, 2012). Proteínas relacionadas à patogênese pertencentes às famílias PR-3, PR-4, PR-8 e PR-11 são classificadas como endoquitinases e degradam quitina e β -glucana, presentes na parede

celular de vários patógenos (van Loon et al., 2006). Oomicetos possuem glucano na parede celular, o que permite inferir sobre a contribuição desta proteína para a resistência do acesso BGH-2127 à requeima. Resultados semelhantes foram encontrados na avaliação das diferenças constitutivas entre os clones de seringueira contrastantes quanto à resistência a agentes patogênicos do gênero *Phytophthora*, em que quitinases foram consideradas importantes para o mecanismo de defesa do clone resistente (Havanapan et al., 2016). A expressão de genes de quitinase foi relacionada à resistência ao oomiceto *Plasmopara viticola* em plantas de videira (Selim et al., 2013), e em frutos de mamão, quitinases induziram resistência a *Phytophthora nicotianae* (Shi et al., 2013). Em estudo sobre a expressão de genes entre cultivares de batata contrastantes quanto a resistência à requeima, a infecção pelo patógeno induziu a expressão de Chitinase A (ChtA), com abundância diferencial superior a dez vezes nos genótipos resistentes (Orłowska et al., 2012).

Os níveis de transcrição dos genes que codificam as proteínas de 2-cis peroxirredoxina BAS1 (*spot 44*), tiorredoxina peroxidase (*spot 48*) e endoquitinase ácida de 26 kDa (*spot 65*) não corresponderam aos níveis de abundância das respectivas proteínas. Estes resultados podem ser justificados, pois, a abundância relativa de proteínas pode ou não ocorrer na mesma proporção dos níveis relativos de mRNA. Processos regulatórios ocorrem depois que o mRNA é sintetizado, isto é, pós-transcrição, pós-tradução e regulação da degradação protéica, que atuam no controle da abundância das proteínas (Vogel & Marcotte, 2012). No estudo da interação entre cultivares de tomates resistentes e suscetíveis à infecção pelo *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), para várias proteínas, os padrões de expressão analisados por PCR em tempo real também diferiram dos resultados da análise proteômica (Huang et al., 2016).

Ribonuclease T2 (*spot 261*) foi mais abundante no acesso BGH-2127. As ribonucleases (RNases) podem ser distinguidas com base na função. Em solanáceas, genes S-RNase são responsáveis pelo reconhecimento e rejeição da autopolinização (Köthke & Köck, 2012). Uma RNase intracelular T2 de *A. thaliana* foi considerada essencial para a reciclagem do RNA ribossômico. Os mutantes que não possuíam atividade desta proteína acumulavam RNA intracelularmente, e o rRNA nesses mutantes tinham meia-vida mais longa. A renovação normal de rRNA é essencial para manter a homeostase celular (Hillwig et al., 2011). Além das funções anteriormente citadas, as RNases também participam de respostas de defesa a agentes patogênicos (MacIntosh et al., 2010). A RNase aumenta a resistência à infecção por *Phytophthora sojae* em *Glycine max* (Fan et al., 2015). Os genes da classe PR-10 em folhas de videira foram

acumulados em nível de mRNA em resposta à infecção por *P. viticola* e aumentaram a resistência do hospedeiro (He et al., 2013). Em folhas de soja, uma proteína com atividade de ribonuclease inibiu significativamente o crescimento de hifas de *Phytophthora sojae* (Jiang et al., 2015).

A proteína chaperonina 21 (*spot 56*) é importante na função de proteção e dobramento de proteínas recém-sintetizadas. Essa proteína é induzida em resposta de ativação das vias de sinalização para reparar potenciais danos que podem ser causados aos organismos. Chaperoninas foram consideradas de extrema importância na proteção contra o estresse oxidativo em plantas de *A. thaliana*, intermediando a atividade dependente de ferro superóxido dismutase (FeSOD) (Kou et., 2012).

Caracterizada por sua multifuncionalidade, calreticulina (*spot 131*) é uma proteína presente no retículo endoplasmático e possui grande afinidade pelo Ca^{2+} . Estudos sugerem que essa proteína está envolvida na regulação da defesa das plantas contra patógenos biotróficos. Em períodos iniciais de infecção, *P. infestans* utiliza tecidos vivos do hospedeiro para sua sobrevivência, tornando a presença dessa proteína de extrema relevância. Em *Nicotiana benthamiana*, calreticulina foi considerada essencial para resistência à *P. infestans* (Matsukawa et al., 2013).

4.4 Proteínas relacionadas à transcrição e outras proteínas

Uma proteína relacionada a transcrição diferencialmente abundante entre BGH-2127 e Santa Clara foi identificada, a fator de *splicing* 3B, subunidade IV (*spot 67*). O *splicing* é um processo que remove os íntrons e une os éxons após a transcrição do RNA. Proteínas fator de *splicing* são importantes para manter o processamento eficiente do RNA sob condições de estresse. Mecanismos pós-transcricionais à base de *splicing* podem regular a ativação de moléculas pré-existentes para garantir uma resposta imediata ao estresse (Mazzucotelli et al., 2008). Em plantas de arroz, o gene SLP5 codifica uma proteína fator de *splicing* 3b subunidade 3 (SF3b3) relacionada a defesa das plantas por meio de reação de hipersensibilidade (Chen et al., 2012).

A proteína identificada como repetição de pentapeptídeo (*spot 11*) não foi classificada nos grupos funcionais anteriormente discutidos. Análises de bioinformática já identificaram centenas dessas proteínas, no entanto, a função bioquímica da maioria das proteínas membros da família repetição de pentapeptídeo são desconhecidas (Vetting et al., 2006).

5. CONCLUSÕES

A maior abundância das proteínas endoquitinase ácida de 26 kDa e ribonuclease T2 no acesso BGH-2127 podem contribuir para a resistência deste genótipo à requeima.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, F. B.; SILVA, D. J. H.; CRUZ, C. D.; MIZUBUTI, E. S. G. Inheritance of resistance to *Phytophthora infestans* (Peronosporales, Pythiaceae) in a new source of resistance in tomato (*Solanum* sp.) formerly *Lycopersicon* sp.) Solanales, Solanaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 2, p. 493-497, 2008.
- ADALID, A. M.; ROSELLO, S.; VALCÁRCEL, M.; NUEZ, F. Analysis of the genetic control of b-carotene and L-ascorbic acid accumulation in an orange-brownish wild cherry tomato accession. **Euphytica**, v. 184, n. 2, p. 251–263, 2012.
- ALMAGRO, L.; GÓMEZ-ROS, L. V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROSBARCELO, A.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 377-390, 2009.
- ALMEIDA, H. O.; BARBOSA, M. O.; MARQUES, A. E.; PEREIRA, T. H. A.; MAGALHÃES-JÚNIOR, M. J.; TESSAROLLO, N. G.; GAMES, P. D., BARROS, E. G.; STOLF-MOREIRA, R.; MARCELINO-GUIMARAES, F. C.; ABDELNOOR, R. V.; PEREIRA, P. R. G.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem asiática da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p.163-172, 2012.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- BALASUBRAMANIAN, V.; VASHISHT, D.; CLETUS, J.; SAKTHIVEL, N. Plant β -1, 3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi. **Biotechnology letters**, v. 34, n. 11, p. 1983-1990, 2012.
- 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. 7, p. 248-254, 1976.
- CAO, Y.; TANAKA, K.; NGUYEN, C. T.; STACEY, G. Extracellular ATP is a central signaling molecule in plant stress responses. **Current opinion in plant biology**, v. 20, p. 82-87, 2014.
- CHAMNANMANOONTHAM, N.; PONGPRAYOON, W.; PICHAYANGKURA, R.; ROYTRAKUL, S.; CHADCHAWAN, S. Chitosan enhances rice seedling growth via gene expression network between nucleus and chloroplast. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 1, p. 101-114, 2015.
- CHEN, X.; HAO, L.; PAN, J.; ZHENG, X.; JIANG, G.; JIN, Y.; GU, Z.; QIAN, Q.;

- ZHAI, W.; MA, B. SPL5, a cell death and defense-related gene, encodes a putative splicing factor 3b subunit 3 (SF3b3) in rice. **Molecular breeding**, v. 30, n. 2, p. 939-949, 2012.
- CHIVASA, S.; TOMÉ, D. F.; HAMILTON, J. M.; SLABAS, A. R. Proteomic analysis of extracellular ATP-regulated proteins identifies ATP synthase β -subunit as a novel plant cell death regulator. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 3, p.1-13, 2011.
- CIPRIANO, A. K.; GONDIM, D. M.; VASCONCELOS, I. M.; MARTINS, J. A.; MOURA, A. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MELO, J. G. M.; CARDOSO, J. E.; PAIVA, A. L. S.; OLIVEIRA, J. T. Proteomic analysis of responsive stem proteins of resistant and susceptible cashew plants after *Lasiodiplodia theobromae* infection. **Journal of proteomics**, v. 113, p. 90-109, 2015.
- CLETUS, J.; BALASUBRAMANIAN, V.; VASHISHT, D.; SAKTHIVEL, N. Transgenic expression of plant chitinases to enhance disease resistance. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 11, p. 1719-1732, 2013.
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, p. 271-276, 2013.
- ERCOLANO, M. R.; SANSEVERINO, W.; CARLI, P., FERRIELLO, F.; FRUSCIANTE, L. Genetic and genomic approaches for R-gene mediated disease resistance in tomato: retrospects and prospects. **Plant cell reports**, v. 31, n. 6, p. 973-985, 2012.
- FAN, S.; JIANG, L.; WU, J.; DONG, L.; CHENG, Q.; XU, P.; ZHANG, S. A novel pathogenesis-related class 10 protein gly m 4l, increases resistance upon *Phytophthora sojae* infection in soybean (*Glycine max* [L.] merr.). **PloS one**, v. 10, n. 10, p. e0140364, 2015.
- FOOLAD, M. R.; SULLENBERGER, M. T.; OHLSON, E. W.; GIGINO, B.K. Response of accessions within tomato wild species, *Solanum pimpinellifolium* to late blight. **Plant Breeding**, v. 133, n. 3, p. 1-11, 2014.
- GALMES, J.; CONESA, M. A.; OCHOGAVÍA, J.; PERDOMO, J. A.; FRANCIS, D. M.; RIBAS-CARBÓ, M.; SAVÉ, R.; FLEXAS, J.; MEDRANO, H.; CIFRE, J. Physiological and morphological adaptations in relation to water use efficiency in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*. **Plant, cell & environment**, v. 34, n. 2, p. 245-260, 2011.
- GE Healthcare. **2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients – Principles and Methods**. Code number: 80-6429-60, 2002.
- GHOSH, S.; NARULA, K.; SINHA, A.; GHOSH, R.; JAWA, P.; CHAKRABORTY, N.;

CHAKRABORTY, S. Proteometabolomic analysis of transgenic tomato overexpressing oxalate decarboxylase uncovers novel proteins potentially involved in defense mechanism against *Sclerotinia*. **Journal of proteomics**, v. 143, p. 242-253, 2016.

GONG, C.; LIU, Y.; LIU, S. Y.; CHENG, M. Z.; ZHANG, Y.; WANG, R. H.; CHEN, H.; LI, J.; CHEN, X.; WANG, A. X. Analysis of *Clonostachys rosea*-induced resistance to grey mould disease and identification of the key proteins induced in tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 123, p. 83-93, 2017.

GROVER, A. Plant Chitinases: Genetic diversity and physiological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 1, p. 57-73, 2012.

GU, Q.; YU, L. Proteomics quality and standard: from a regulatory perspective. **Journal of proteomics**, v. 96, p. 353-359, 2014.

HACKMAN, R. H.; GOLDBERG, M. New substrates for use with chitinases. **Analytical Biochemistry**, v. 8, n. 3, p. 397-401, 1964.

HAGGARD, J. E.; JOHNSON, E. B.; CLAIR, D. A. St. Multiple QTL for horticultural traits and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* linked on *Solanum habrochaites* chromosome 11. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v. 5, n. 2, p. 219-233, 2015.

HAVANAPAN, P. O.; BOURCHOOKARN, A.; KETTERMAN, A. J.; KRITTANAI, C. Comparative proteome analysis of rubber latex serum from pathogenic fungi tolerant and susceptible rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Journal of proteomics**, v. 131, p. 82-92, 2016.

HE, M.; XU, Y.; CAO, J.; ZHU, Z.; JIAO, Y.; WANG, Y.; GUAN, X.; YANG, Y.; XU, W.; FU, Z. Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection. **Protoplasma**, v. 250, n. 1, p. 129-140, 2013.

HEBBELMANN, I.; SELINSKI, J.; WEHMEYER, C.; GOSS, T.; VOSS, I.; MULO, P.; NUNES-NESE, A.; DO, P. T.; FERNIE, A. R.; TALLA, S. K.; RAGHAVENDRA, A. S.; LINKE, V.; SCHEIBE, R. Multiple strategies to prevent oxidative stress in *Arabidopsis* plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 3, p. 1445-1459, 2012.

HILLWIG, M. S.; CONTENTO, A. L.; MEYER, A.; EBANY, D.; BASSHAM, D. C.; MACINTOSH, G. C. RNS2, a conserved member of the RNase T2 family, is necessary for ribosomal RNA decay in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 3, p. 1093-1098, 2011.

HU, C. H.; PEREZ, F. G.; DONAHOO, R.; MCLEOD, A.; MYERS, K.; IVORS, K.;

SECOR, G.; ROBERTS, P. D.; DEAHL, K. L.; FRY, W. E.; RISTAINO, J. B. Recent genotypes of *Phytophthora infestans* in the eastern United States reveal clonal populations and reappearance of mefenoxam sensitivity. **Plant Disease**, v.96, p. 1323-1330, 2012.

HUANG, X.; LIU, L.; ZHAI, Y.; LIU, T.; CHEN, J. Proteomic comparison of four maize inbred lines with different levels of resistance to *Curvularia lunata* (Wakker) Boed infection. **Progress in Natural Science**, v. 19, n. 3, p. 353-358, 2009.

JIANG, L.; WU, J.; FAN, S.; LI, W.; DONG, L.; CHENG, Q.; XU, P.; ZHANG, S. Isolation and characterization of a novel pathogenesis-related protein gene (GmPRP) with induced expression in soybean (*Glycine max*) during infection with *Phytophthora sojae*. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0129932, 2015.

KANGASJÄRVI, S.; TIKKANEN, M.; DURIAN, G.; ARO, E. M. Photosynthetic light reactions – An adjustable hub in basic production and plant immunity signaling. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 81, p. 128-134, 2014.

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J. C.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709, 2011.

KELLER, A.; NESVIZHSHKII, A. I.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 20, p.383-5392, 2002.

KUMAR, D.; KIRTI, P. B. Transcriptomic and proteomic analyses of resistant host responses in *Arachis diogeni* challenged with late leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis personata*. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0117559, 2015.

KUNDU, S.; CHAKRABORTY, D.; PAL, A. Proteomic analysis of salicylic acid induced resistance to *Mungbean Yellow Mosaic India Virus* in *Vigna mungo*. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 3, p. 337-349, 2011.

KUO, W. Y.; HUANG, C. H.; LIU, A. C.; CHENG, C. P.; LI, S. H.; CHANG, W. C.; WEISS, C.; AZEM, A.; JINN, T. L. Chaperonin 20 mediates iron superoxide dismutase (FeSOD) activity independent of its co-chaperonin role in *Arabidopsis* chloroplasts. **New Phytologist**, v. 197, n. 1, p. 99-110, 2013.

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

LAURINDO, B. S.; LAURINDO, R. D. F.; NICK, C.; CARNEIRO, P. C. S.; MIZUBUTI, E. S. G.; SILVA, D. J. H. Potencial de hibridação entre acessos de tomateiro para pré melhoramento quanto à resistência à requeima. **Pesquisa**

Agropecuária Brasileira, v. 51, n. 1, p. 27-34, 2016.

LEHMANN, S.; SERRANO, M.; L'HARIDON, F.; TJAMOS, S. E.; METRAUX, J. P. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. **Phytochemistry**, v. 112, p. 54-62, 2015.

LIU, J.; QIAN, C.; CAO, X. Post-translational modification control of innate immunity. **Immunity**, v. 45, n. 1, p. 15-30, 2016.

LIU, H. M.; FANG, L.; CHE, Y. S.; WU, F. Z.; YANG, C. P. Protein expression patterns in two *Spiraea* species in response to cold treatment. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 7, p. 4533-4547, 2014.

LUDLAM, A. V.; MOORE, B. A.; XU, Z. The crystal structure of ribosomal chaperone trigger factor from *Vibrio cholerae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 37, p. 13436-13441, 2004.

MACINTOSH, G. C.; HILLWIG, M. S.; MEYER, A.; FLAGEL, L. RNase T2 genes from rice and the evolution of secretory ribonucleases in plants. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 283, n. 4, p. 381-396, 2010.

MATSUKAWA, M.; SHIBATA, Y.; OHTSU, M.; MIZUTANI, A.; MORI, H.; WANG, P.; MAKOTO, O.; KAZUHITO, K.; TAKEMOTO, D. *Nicotiana benthamiana* calreticulin 3a is required for the ethylene-mediated production of phytoalexins and disease resistance against oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 8, p. 880-892, 2013.

MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A. M.; CROSATTI, C.; GUERRA, D.; STANCA, A. M.; CATTIVELLI, L. Abiotic stress response in plants: when post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Science**, v. 174, n. 4, p. 420-431, 2008.

MEHTA, A.; BRASILEIRO, A.; SOUZA, D. S.; ROMANO, E.; CAMPOS, M. A.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; ROCHA, T. L.; SILVA, M. S.; FRANCO, O. L.; FRAGOSO, R. R.; BEVITORI, R.; ROCHA, T. L. Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us? **FEBS journal**, v. 275, n. 15, p. 3731-3746, 2008.

MEURER, J.; PLÜCKEN, H.; KOWALLIK, K. V.; WESTHOFF, P. A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 18, p. 5286-5297, 1998.

MICHALSKA, A. M.; SOBKOWIAK, S.; FLIS, B.; ZIMNOCH-GUZOWSKA, E. Virulence and aggressiveness of *Phytophthora infestans* isolates collected in Poland from potato and tomato plants identified no strong specificity. **European Journal of Plant Pathology**, v. 144, n. 2, p. 325-336, 2016.

- MILLAR, A. H.; WHELAN, J.; SOOLE, K. L.; DAY, D. A. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. **Annual review of plant biology**, v. 62, 79-104, 2011.
- MUNDT, C.C. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 27, p. 446-455, 2014.
- NEGRI, A. S.; ROBOTTI, E.; PRINSI, B.; ESPEN, L.; MARENGO, E. Proteins involved in biotic and abiotic stress responses as the most significant biomarkers in the ripening of *Pinot Noir skins*. **Functional & integrative genomics**, v. 11, n. 2, p. 341-355, 2011.
- NESVIZHSHKII, A. I.; KELLER, A.; KOLKER, E.; ABERSOLD, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646-4658, 2003.
- NOVÁKOVÁ, S.; FLORES-RAMÍREZ, G.; GLASA, M.; DANCHENKO, M.; FIALA, R.; SKULTETY, L. Partially resistant *Cucurbita pepo* showed late onset of the *Zucchini yellow mosaic virus* infection due to rapid activation of defense mechanisms as compared to susceptible cultivar. **Frontiers in plant science**, v. 6, n. 263, 2015.
- NOWICKI, M.; FOOLAD, M. R.; NOWAKOWSKA, M.; KOZIK, E. U. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding. **Plant Disease**, v. 96, n. 1, p. 4-17, 2012.
- PLÜCKEN, H.; MÜLLER, B.; GROHMANN, D.; WESTHOFF, P.; EICHACKER, L. A. The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*. **Febs Letters**, v. 532, n. 1-2, p. 85-90, 2002.
- SHEN, S.; MATSUBAE, M.; TAKAO, T. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. **The Journal of Biochemistry**, v.132, n. 4, p.613-620, 2002.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2006.
- SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R. S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B. D.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, v. 29, n. 2, p. 288-295, 2004.
- TENA, G.; BOUDSOCQ, M.; SHEEN, J. Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 5, p. 519-529, 2011.
- van LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-

162, 2006.

THIMM, O.; BLÄSING, O.; GIBON, Y.; NAGEL, A.; MEYER, S.; KRÜGER, P.; SELBIG, J.; MULLER, L. A.; RHEE, S. Y.; STITT, M. Mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **The Plant Journal**, v. 37, n. 6, p. 914-939, 2004.

UPCHURCH, R. G.; RAMIREZ, E. M. Defense-related gene expression in soybean leaves and seeds inoculated with *Cercospora kikuchii* and *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 75, n. 1, p. 64-70, 2010.

WU, L.; HAN, Z.; WANG, S.; WANG, X.; SUN, A.; ZU, X.; CHEN, Y. Comparative proteomic analysis of the plant–virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with *Sugarcane Mosaic Virus*. **Journal of proteomics**, v. 89, p. 124-140, 2013.

VETTING, M. W.; HEGDE, S. S.; FAJARDO, J. E.; FISER, A.; RODERICK, S. L.; TAKIFF, H. E.; BLANCHARD, J. S. Pentapeptide repeat proteins. **Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 1-10, 2006.

VOGEL, C.; MARCOTTE, E. M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 227-232, 2012.

XING, T.; RAMPITSCH, C.; SUN, S.; ROMANOWSKI, A.; CONROY, C.; STEBBING, J. Á.; WANG, X. TAB2, a nucleoside diphosphate protein kinase, is a component of the tMEK2 disease resistance pathway in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 73, n. 1, p. 33-39, 2008.

ZHANG, Z.; XIN, W.; WANG, S.; ZHANG, X.; DAI, H.; SUN, R.; FRAZIER, T.; ZHANG, B.; WANG, Q. Xylem sap in cotton contains proteins that contribute to environmental stress response and cell wall development. **Functional & integrative genomics**, v. 15, n. 1, p. 17-26, 2015.

ZHANG, M.; KOH, J.; LIU, L.; SHAO, Z.; LIU, H.; HU, S.; ZHU, N.; DUFRESNE, C.P.; CHEN, S.; WANG, Q. Critical role of COI1-dependent jasmonate pathway in AAL toxin induced PCD in tomato revealed by comparative proteomics. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

ZHAO, J.; LIU, Q.; ZHANG, H.; JIA, Q.; HONG, Y.; LIU Y. The rubisco small subunit is involved in tobamovirus movement and Tm-2²-mediated extreme resistance. **Plant Physiology**, v. 161, n. 1, p.374-383, 2013.

CAPÍTULO II - Proteômica comparativa revela proteínas relacionadas ao estresse oxidativo e da família taumatina associadas à resistência do tomateiro à requeima

Proteômica comparativa revela proteínas relacionadas ao estresse oxidativo e da família taumatina associadas à resistência do tomateiro à requeima

Resumo– Neste estudo foram utilizadas técnicas proteômicas para estudar os mecanismos moleculares envolvidos na defesa do tomateiro contra a requeima (*Phytophthora infestans*). As proteínas foram extraídas de folhas do acesso BGH-2127 e do cultivar Santa Clara, resistente e suscetível ao patógeno, respectivamente. Folhas de cada genótipo inoculado e não inoculado (controle) foram coletadas nos tempos 0, 2 e 48 horas e analisadas por eletroforese bidimensional (2-DE) seguida da identificação por espectrometria de massas (*MALDI TOF-TOF*). Um total de 56 proteínas diferencialmente abundantes foram identificadas, sendo 39 referentes ao genótipo resistente e 17 ao suscetível. Estas proteínas foram categorizadas biologicamente em grupos relacionados à energia e metabolismo, fotossíntese, estresse e defesa, transcrição, outras proteínas e não caracterizadas. Para o acesso BGH-2127, proteínas do estresse oxidativo (2-cis peroxirredoxina BAS1 e 2-cis peroxirredoxina) e relacionadas a patogênese da família PR-5 (taumatina) tiveram os níveis de abundância relativa aumentados nos tempos 0 e 48 horas após a inoculação, respectivamente, e foram consideradas importantes para o mecanismo de defesa deste genótipo. Os padrões de expressão avaliados por PCR em tempo real diferiram dos resultados da análise proteômica. Redes de interações proteína-proteína forneceram importantes informações sobre atividades celulares envolvidas na resistência do BGH-2127 à requeima.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L.; mecanismos de resistência; proteínas relacionadas à patogênese; *Phytophthora infestans*.

Comparative proteomics reveals set of oxidative stress and thaumatin-like proteins associated with resistance to late blight of tomato

Abstract- Proteomics techniques were used to study the molecular mechanisms involved in the defense of tomato against late blight (*Phytophthora infestans*). Proteins were extracted from resistant access BGH-2127 and susceptible cultivar Santa Clara. Leaves of the inoculated and non-inoculated (control) genotypes were collected at 0, 2, and 48 h after inoculation and analyzed by two-dimensional electrophoresis (2-DE), followed by identification with mass spectrometry (MALDI TOF-TOF). A total of 56 differentially abundant proteins were identified, of which 39 were resistant genotypes and 17 were susceptible. These proteins were categorized into functional groups of energy and metabolism, photosynthesis, stress and defense, transcription, other proteins, and as un-characterized ones. For access BGH-2127, oxidative stress proteins (2-cis peroxiedoxin BAS1 and 2-cis peroxiredoxin) and thaumatin-like protein showed increase in the relative abundance at 0 and 48 h of inoculation, respectively, and were therefore considered important for the defense mechanism of this genotype. The expression standards evaluated by real-time PCR differed from the results of the proteomic analysis. The protein-protein interaction networks provided important information on the cellular activities involved in the resistance of BGH-2127 late blight.

Key-words: *Solanum lycopersicum* L.; resistance mechanisms; pathogenesis-related proteins; *Phytophthora infestans*.

1. INTRODUÇÃO

O oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, agente etiológico da requeima é um dos patógenos mais destrutivos do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), responsável por substanciais perdas econômicas na cultura (Nowicki et al., 2012).

Por mais de 150 anos, *P. Infestans* tem se destacado no campo científico com milhares de artigos publicados. Diante dessa importância, alguns fatores como o fascínio de pesquisadores por este patógeno, a surpreendente e intensa devastação causada em novos locais, o elevado fluxo de populações em todo o mundo implicando em desafios para o manejo da doença, a revolução genômica que possibilita enorme progresso na compreensão da biologia molecular e o elevado número de perguntas sem respostas convincentes fazem com que este patógeno seja considerado reemergente (Fry et al., 2015).

Mesmo diante de tamanha importância, a maioria dos cultivares de tomateiro disponíveis no mercado são suscetíveis a requeima e o manejo da doença é realizado principalmente com aplicação de fungicidas (Foolad et al., 2014), uma prática onerosa que pode causar danos ao ambiente e contribuir para a seleção de isolados resistentes (Hu et al., 2012). Como alternativa, o desenvolvimento e uso de cultivares geneticamente resistentes representam estratégias satisfatórias do ponto de vista social, econômico e ambiental para o controle da requeima (Mundt, 2014).

Fontes de resistência a requeima são encontradas nas espécies silvestres *Solanum habrochaites* (Abreu et al., 2008) e *Solanum pimpinellifolium* (Foolad et al., 2014). Os genes *Ph-1*, *Ph-2* e *Ph-3* nos cromossomos 7, 10 e 9, respectivamente, da espécie *S. pimpinellifolium* foram mapeados e relatados como fontes com resistência qualitativa à requeima (Nowicki et al., 2012). No entanto, isolados de *P. infestans* suplantaram a resistência conferida por esses genes (Michalska et al., 2016). Resistência do tipo quantitativa foi reportada na espécie *S. habrochaites* (Abreu et al., 2008), mas ainda não tem sido amplamente utilizada, dada a natureza complexa da herança da resistência (Abreu et al., 2008), ou por estar ligada a características agronômicas indesejáveis (Haggard et al., 2015).

Neste contexto, a transferência de genes de resistência presentes em acessos de tomateiro conservados em Bancos de Germoplasma que pertençam à mesma espécie que se deseja melhorar surge como alternativa ao uso dos genótipos silvestres, pois, facilita cruzamentos para transferência de genes (Abreu et al., 2008) e recuperação mais rápida das características agronômicas desejadas (Adalid et al., 2012).

O acesso BGH-2127 utilizado neste estudo, pertence a espécie cultivada

S.lycopersicum e está conservado no Banco de Germoplasma de Hortaliças da Universidade Federal de Viçosa (BGH-UFV). Este acesso foi avaliado e destacou-se quanto ao nível de resistência à requeima (Laurindo et al., 2016). Esta característica diferencial possibilita a utilização deste genótipo em programas de melhoramento, pois, problemas comuns devido ao arraste gênico ocorrido quando genitores silvestres são utilizados em cruzamentos seriam minimizados.

As plantas possuem mecanismos de defesa altamente eficazes, como a resposta induzida, desencadeada pela percepção do agente fitopatogênico (Michelmore et al., 2013). Este mecanismo de defesa inclui a resposta de hipersensibilidade (RH), produção de espécies reativas de oxigênio, produção de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR) (Almagro et al., 2009). As PR são classificadas em 17 famílias segundo propriedades e mecanismos de ação, dentre as quais estão as famílias PR-5 (família taumatina), que possui atividade contra o ataque de oomicetos e PR-9 (peroxidases), importante em respostas rápidas ao ataque de patógenos (van Loon et al., 2006).

Dessa forma, estudos que permitam melhor entender as bases moleculares da interação tomateiro vs requeima são necessários. Genes e proteínas relacionados à defesa de plantas durante o processo de infecção têm sido identificados por meio de estratégias da biologia molecular (Ma et al., 2015; Jung et al., 2015; Zuluaga et al., 2016). Neste contexto, a metodologia da análise proteômica torna-se uma alternativa viável, fornecendo informações e ferramentas para maior entendimento da relação planta-patógeno e obtenção de cultivares resistentes. A proteômica oferece a possibilidade de estudar simultaneamente o conjunto de proteínas presentes numa unidade biológica, sua abundância, variações genótipo-dependentes, respostas às mudanças ambientais, modificações pós-traducionais ou interações com outras entidades moleculares (Gonzales-Fernandes & Jorrin-Novo, 2011). Na cultura do tomateiro, a análise proteômica tem sido utilizada com sucesso na identificação de proteínas em diferentes patossistemas (Vitale et al., 2014; Ghosh et al., 2016; Carmo et al., 2017).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi identificar proteínas relacionadas a resistência à requeima utilizando ferramentas proteômicas em genótipos de tomateiro que possam explicar possíveis mecanismos moleculares de resistência a esta doença.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Recursos fitogenéticos e condução do experimento

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20° 45' 14" S, 42° 52' 53" W, altitude de 648,74 m). O acesso BGH-2127 resistente a requeima (Laurindo et al., 2016), conservado no Banco de Germoplasma de Hortaliças da UFV e o cultivar suscetível Santa Clara (Abreu et al., 2008), ambos pertencentes à espécie *S. lycopersicum* foram avaliados.

A semeadura foi realizada em bandeja de 128 células, que continham substrato comercial para produção de hortaliças, e o transplântio foi realizado para vasos de 10 litros quando as plantas possuíam quatro folhas definitivas. As plantas foram conduzidas em casa de vegetação com uma única haste e tutoradas com fitilho. Os tratamentos culturais foram realizados de acordo com a necessidade da cultura e a utilização de defensivos agrícolas foi suspensa quinze dias antes da inoculação. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. A repetição foi constituída por três vasos contendo uma planta cada.

2.2 Inoculação do patógeno, coleta das amostras para análises moleculares e avaliação da severidade da requeima

A coleta, o preparo e a inoculação dos isolados de *P. infestans* foi realizada segundo metodologia proposta por Abreu et al. (2008), com modificações.

Quarenta e cinco dias após o transplântio, as plantas foram inoculadas com uma mistura de esporângios provenientes de isolados de *P. infestans*, patogênicos a tomateiro, coletados em diferentes regiões da Zona da Mata Mineira, nas cidades de Cajuri, Coimbra, Ervália e Viçosa. Esse procedimento foi realizado para agregar maior número de variantes possíveis do patógeno.

Nos locais de coleta, foram retirados das plantas folíolos infectados por *P. infestans*, que foram colocados dentro de sacos de papel de 1,0 kg previamente identificados com o nome do município em que foram coletados e armazenados em caixas de isopor a 18°C. O inóculo foi multiplicado no Laboratório de Manejo de Recursos Genéticos (LMRG) da UFV. Para isso, transferiram-se os folíolos dos sacos de papel para bandejas de plástico previamente desinfetadas com álcool 70% e forradas com papel toalha umedecido com água destilada, mantidas a 18°C por 24 a 48 horas, de modo a criar um microclima favorável ao desenvolvimento do patógeno e promover maior esporulação.

Após este período, para cada isolado, foi preparada uma suspensão de esporângios, que foi homogeneizada, e realizada a contagem do número de esporângios em um microscópio óptico. Logo após, ajustou-se a concentração em hemacitômetro para 1×10^3 esporângios mL^{-1} . Após a contagem do número de esporângios, a suspensão foi levada à geladeira por 1 hora para estimular a liberação de zoósporos. A inoculação foi realizada com o auxílio de um pulverizador costal manual, tendo-se aplicado 10 ml de suspensão por planta. O tempo decorrido entre o preparo da suspensão de esporângios e a inoculação não excedeu duas horas, para que os zoósporos permanecessem viáveis. No dia posterior a inoculação, com o intuito de garantir alta umidade ao ambiente, as plantas passaram a ser irrigadas por microaspersão.

Os tempos de coleta das amostras de folhas foram pré-estabelecidos com base em busca de respostas rápidas das plantas e no tempo necessário para que o patógeno penetre e colonize os tecidos da planta (Nowicki et al., 2013). Os tratamentos consistiram de plantas de cada genótipo submetidas à inoculação, com folhas coletadas a 0, 2 e 48 horas após a inoculação e plantas de cada genótipo não inoculadas (controle), com folhas coletadas nos mesmos tempos. O tempo 0 (zero) corresponde a coleta das folhas imediatamente após a inoculação. Logo após as coletas, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento do preparo dos extratos vegetais para análises moleculares.

Três dias após a inoculação iniciaram-se as avaliações quanto à severidade da requeima, em intervalos regulares de três dias, totalizando seis avaliações. Notas foram atribuídas às folhas de cada planta, conforme escala diagramática proposta por Corrêa et al. (2009), para estimar a severidade da doença. A nota final de cada planta foi constituída pela média das notas de suas folhas, e posteriormente utilizadas para estimar a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), segundo (Simko & Piepho, 2012), por meio da expressão: $\text{AACPD} = \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} [(y_i + y_{i+1})/2] * (t_{i+1} - t_i) \right\}$, em que: y_i e y_{i+1} é a porcentagem de área foliar lesionada observada na avaliação i e na seguinte $i+1$; t_i e t_{i+1} é o intervalo de tempo entre as avaliações; e n é o número total de avaliações. A análise estatística foi realizada com o auxílio do aplicativo computacional Genes (Cruz, 2013).

2.3 Análise proteômica

2.3.1 Extração e quantificação de proteínas

A extração foi realizada de acordo com Shen et al. (2002), com modificações. Folhas de tomateiro (5g) de cada genótipo foram pulverizadas individualmente em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo. O pó obtido foi homogeneizado com polivinilpolipirrolidona (PVPP) 2% e adicionado de tampão de extração na proporção de 1:4 (amostra:solução, p:v), contendo Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, sacarose 250 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 mM, Triton X-100 1% (p/v), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 1 mM, tiourea 2 mM, benzamidina 1 mM e ditioneitol (DTT) 1 mM. Após agitação por 2h a 4°C, o material foi centrifugado a 20.100 x g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi reservado (sobrenadante 1). Ao precipitado, adicionou-se novamente o tampão de extração na proporção 1:4 (amostra:solução, p:v). Após 1h e 15 min sob agitação a 4°C, o material foi novamente centrifugado a 20.100 x g por 30 min a 4°C. O sobrenadante obtido foi recuperado (sobrenadante 2) e misturado ao anteriormente reservado (sobrenadante 1), formando o extrato proteico solúvel.

As proteínas foram então precipitadas *overnight* a -20°C pela adição de ácido tricloroacético 10% em acetona gelada e DTT 1 mM, na proporção de 1:1,5 (amostra:solução, v:v). Cada amostra foi então centrifugada a 20.100 x g por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado quatro vezes com acetona gelada e uma vez com etanol 80% (v/v) e DTT 1 mM, e seco em sistema *SpeedVac* (Savant SpeedVac, Thermo Scientific, USA).

O pellet proteico obtido foi solubilizado em 600 µL de tampão de solubilização (ureia 7 M, tiourea 2 M, 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 2%, e DTT 0,3%), com a ajuda de um sonicador de banho. O sobrenadante foi removido e quantificado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão.

2.3.2 Eletroforese bidimensional (2-DE)

A focalização isoeletrica (IEF) das proteínas foi realizada utilizando fitas de 24 cm contendo gradiente imobilizado de pH (IPG) entre 3 e 10, em equipamento *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare, USA). Uma alíquota da amostra contendo 1.200 µg de proteína foi acrescida de tampão de reidratação constituído de DTT 40 mM, tampão IPG com pH 3 a 10 e o reagente comercial *DeStreak* (GE Healthcare, USA), em um volume total de 450 µL. As fitas foram focalizadas sob temperatura controlada de 20°C, de acordo com as seguintes etapas: 1) 200 V.h em passo único por 2 horas; 2) 500 V.h em

passo único de 500 volts; 3) 800 V.h em gradiente até 1.000 volts; 4) 16.500 V.h em gradiente até 10.000 volts; 5) 27.500 V.h em passo único de 10.000 volts. A amperagem máxima foi de 50 μ A por fita. Após a focalização, as fitas foram imediatamente armazenadas a -80°C até o momento da utilização para a separação por massa em segunda dimensão.

As proteínas foram reduzidas equilibrando-se as fitas IPG, por 15 min, em tampão DTT (ureia 6 M, glicerol 25,5% (v/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 2%, DTT 1%, azul de bromofenol 0,002% e Tris-HCl 75 mM, pH 8,8). Em seguida foram alquiladas em tampão similar ao tampão DTT, porém contendo iodoacetamida 2,5% por 15 min. As fitas foram colocadas no topo do gel-SDS e fixadas com solução de agarose (agarose 0,5%, azul de bromofenol 0,002%, Tris 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 1%).

A segunda dimensão foi realizada em *SDS-PAGE* a 12,5%T, em cuba tipo *DaltSix* (GE Healthcare, USA), como descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada inicialmente 10 mA por gel e voltagem de 80 V, por 45 min, seguindo-se o uso de corrente de 40 mA por gel e voltagem de 500 V 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. O marcador de massa molecular *Broad Range* (Bio-Rad) foi utilizado. Foram feitos três géis por tratamento, correspondentes a três repetições biológicas.

Ao término da 2ª dimensão, as proteínas foram fixadas com solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) por 12 h, seguindo-se revelação por 72 h em solução contendo sulfato de amônio a 8% (m/v), coomassie blue G-250 0,08% e etanol 20% (v/v). Os géis foram armazenados em solução contendo ácido acético 5% (v/v).

2.3.3 Aquisição e análise de imagens dos géis 2-DE

Os géis foram digitalizados com o auxílio do equipamento *Image Scanner III* (GE Healthcare, USA). As imagens foram analisadas utilizando o *software ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare, USA). Os valores de expressão foram considerados significativos segundo ANOVA a $p < 0,05$. As proteínas em que a abundância variou pelo menos 1,5 vezes foram consideradas diferencialmente abundantes.

2.3.4 Tripsinização das amostras

A tripsinização foi realizada segundo Shevchenko et al. (2006) com modificações. Inicialmente, os *spots* diferencialmente abundantes foram retirados dos

géis e para a remoção de corantes, os pedaços de géis contendo as proteínas foram transferidos para tubos de 500 µl contendo solução de acetonitrila 50% em bicarbonato de amônio 25 mM (v/v) para uma primeira lavagem por 12 horas. Em seguida, procedeu-se uma segunda lavagem na mesma solução por 1 hora, e outra lavagem com solução de metanol 50% em bicarbonato de amônio 25 mM (v/v) por mais 1 hora. A solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila por 5 min por 2 vezes com secagem em *SpeedVac Concentrator Plus* (*Eppendorf*) por 10 min. As proteínas foram reduzidas com DTT 25 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min a 56°C, em banho-maria, e alquiladas com iodoacetamida a 75 mM em bicarbonato de amônio a 100 mM por 30 min, à temperatura ambiente. Os pedaços de gel foram lavados com bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min por 2 vezes, e desidratados em acetonitrila por 5 min com secagem em *SpeedVac Concentrator Plus* (*Eppendorf*) por 10 min.

Para a digestão enzimática, os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (20 µg/mL) em solução de bicarbonato de amônio 40 mM, pH 8,0 e acetonitrila 10%. A solução com enzima (15 µl) (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade, Promega V5280*) foi adicionada fria (4°C) e as amostras foram mantidas em gelo durante 45 min para penetrar no gel. Às amostras foram adicionados 50 µL da solução de bicarbonato de amônio 40 mM em acetonitrila 10% e incubadas a 37°C durante 22 h em banho-maria.

Os pedaços de gel foram submetidos a banho ultrassom por 10 min, agitados a 1.500 x g por 2 min e a solução foi removida para novos tubos. Aos pedaços de gel restantes, em duas etapas sequenciais, foram adicionados de 40 µL da solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% (v/v), para recuperar a maior quantidade de fragmentos trípticos. Foram novamente agitados a 1.500 x g por 2 minutos e as soluções foram removidas e adicionada ao tubo novo.

Após essas etapas toda a solução foi totalmente evaporada em *SpeedVac Concentrator Plus* (*Eppendorf*) e os peptídeos trípticos foram ressuspensos em 2,5 µl de solução contendo ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%. Todas as amostras foram submetidas à dessalinização em coluna de hidrofobicidade C18 (*ZipTip - Eppendorf*), seguindo recomendações do fabricante.

2.3.5 Espectrometria de massas e identificação de proteínas

A identificação das proteínas foi realizada utilizando-se o espectrômetro de massas do tipo *MALDI-TOF/TOF Ultraflex III* (Brucker Daltonics), disponibilizado

pelo Núcleo de Análises de Biomoléculas da UFV. Cerca de 1 µl de cada amostra contendo os peptídeos foi aplicada à placa de aço do espectrômetro de massas juntamente com matriz de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (10 mg ml⁻¹) (Sigma), numa proporção 1:1. As amostras foram analisadas no modo positivo com refletor ativado.

As listas de massas foram confrontadas contra os Bancos de Dados de proteínas do gênero *Lycopersicum* (download em 21/03/16, com 33.950 entradas), da família *Solanaceae* (download em 14/03/2016, com 114.203 entradas) e do grupo *Viridiplantae* (download em 27/04/15, com 2.864.275 entradas), todos obtidos do *UNIPROT*, por meio do uso do aplicativo *MASCOT*, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; permitindo uma tolerância de erro para o íon parental de 0,2 Da e para os fragmentos de 0,5 Da; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

As proteínas identificadas pelo *MASCOT* como “*Uncharacterized*” foram processadas por meio do algoritmo *BLAST* (Altschul et al., 1990). Através desse algoritmo foi possível identificar quais as proteínas constantes do banco de dados depositado no *Phytozome*, cujas sequências apresentaram maior nível de identidade com as sequências das proteínas “*Uncharacterized*”.

O resultado obtido pelo *MASCOT* foi validado pelo aplicativo *SCAFFOLD*, versão 3.6.4 (*Proteome Software INC., Portland, OR*). Para a validação dos peptídeos identificados foi aplicado o algoritmo *Peptide Prophet* (Keller et al., 2002) e para as proteínas o algoritmo *Protein Prophet* (Nesvizhskii et al., 2003), como critério de aceitação foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90% de probabilidade de identificação para ambos, peptídeos e proteínas, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

2.4 Análises de bioinformática

Todas as proteínas identificadas foram funcionalmente categorizadas com auxílio do *software Mapman* (Thimm et al., 2004).

Uma vez listadas as proteínas diferencialmente abundantes para os genótipos BGH-2127 e Santa Clara foi realizada a construção de uma rede interação proteína-proteína com auxílio do *software STRING v. 10.0* (Szklarczyk et al., 2015).

2.5 Extração de RNA total e análise da expressão relativa de proteínas por PCR em tempo real

As amostras de folha de plantas do BGH-2127 inoculadas e não inoculadas (controle) com *P. infestans* foram maceradas em nitrogênio líquido e o RNA total extraído com o uso do reagente *TRIZOL* (Invitrogen), conforme o protocolo do fabricante.

Em aproximadamente 100 mg do material macerado foi adicionado 1 mL do reagente *TRIZOL* e as amostras foram incubadas por 5 minutos. Posteriormente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados ao tubo e após homogeneização por 3 minutos, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, sendo adicionados 500 µL de álcool isopropílico. Após 30 minutos e centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi removido e o *pellet* formado lavado com etanol a 75%. Após nova centrifugação a 9.500 x g por 5 minutos a 4°C, o excesso de etanol foi removido e o *pellet* ressuscitado com água livre de DNases e RNases. O RNA foi quantificado (*SpectraMax M5 microplate/cuvette reader (Molecular Devices)*) e analisado em gel de agarose 1,5 % (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL.

Para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, o RNA total extraído foi tratado com *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega). Para tal, ao RNA total (3 µg) foram adicionados 3 µL de DNase (1u/ µL), 1 µL de *RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer* e água tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC) para completar o volume final de 10 µL. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A enzima foi inativada pela adição de 1µl of *RQ1 DNaseStop Solution* e incubação por 10 minutos a 65°C. Para a realização da transcrição reversa, 500 ng de RNA tratado com DNase foi utilizado na reação e adicionou-se 1 µL de *oligodT* (estoque a 500 µg/mL). O RNA foi desnaturado a 70°C por 5 minutos (seguida de incubação em gelo por 1 minuto) sendo então adicionados ao tubo 4 µL de *5X First-Strand Buffer*, 2 µL de DTT 0,1M, 1 µL de dNTP *mix* (dGTP, dCTP, dATP, dTTP – estoque a 10 mM), 1 µL *RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (40 units/µL), 1 µL da enzima *M-MLV RT* (200 U/µL - Promega) e água DEPC para completar o volume final de 12 µL. As amostras foram incubadas a 42°C por 60 minutos. O cDNA obtido foi quantificado *SpectraMax M5 microplate/cuvette reader (Molecular Devices)*.

Os ensaios de PCR em tempo real foram conduzidos conforme manuais da *Applied Biosystems*. As amostras de cDNA foram diluídas para uma concentração final de 100 ng/µL.

A amplificação dos fragmentos alvo foi realizada utilizando o aparelho *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). O volume total da reação por amostra foi de 10 µL, composta de oligonucleotídeos específicos que codificam as proteínas 2-cis peroxirredoxina BAS1 (FW: 5'-CCTTCTGCTTTTAATGGACTTCGT-3'; RV: 5'-TGAGCAACCCGAGTATTGATTG-3') e taumatina (FW: 5'-GCGGTGGTCGACGTCTTG-3'; RV: 5'-ACCCCATATACGTGCCATCTTAGT-3'), cDNAs de plantas do BGH-2127 inoculadas e não inoculadas (controle) com *P. infestans* e o kit *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em duplicatas empregando placas de 48 poços. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 min, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o *software REST*. Como controle endógeno para normalização dos dados do RT-PCR foi utilizado o *primer* específico actina (FW: 5'-CCTTCAACGTTCCAGCTATG-3'; RV: 5'-TCACCAGAGTCCAACACAATAC-3') (Li & Luan, 2014).

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação fenotípica em resposta à requeima

A análise de variância considerando os genótipos Santa Clara e BGH-2127 evidenciou diferença significativa a 1% de probabilidade pelo teste de F para área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), confirmando diferenças nos padrões de resistência dos genótipos. A avaliação da resistência à requeima foi feita no sentido negativo, ou seja, quanto menor a AACPD maior o nível de resistência. A média de AACPD do BGH-2127 foi igual a 18,67 unidades de área, enquanto o Santa Clara obteve valor igual a 96,33 unidades de área (Figura 1).

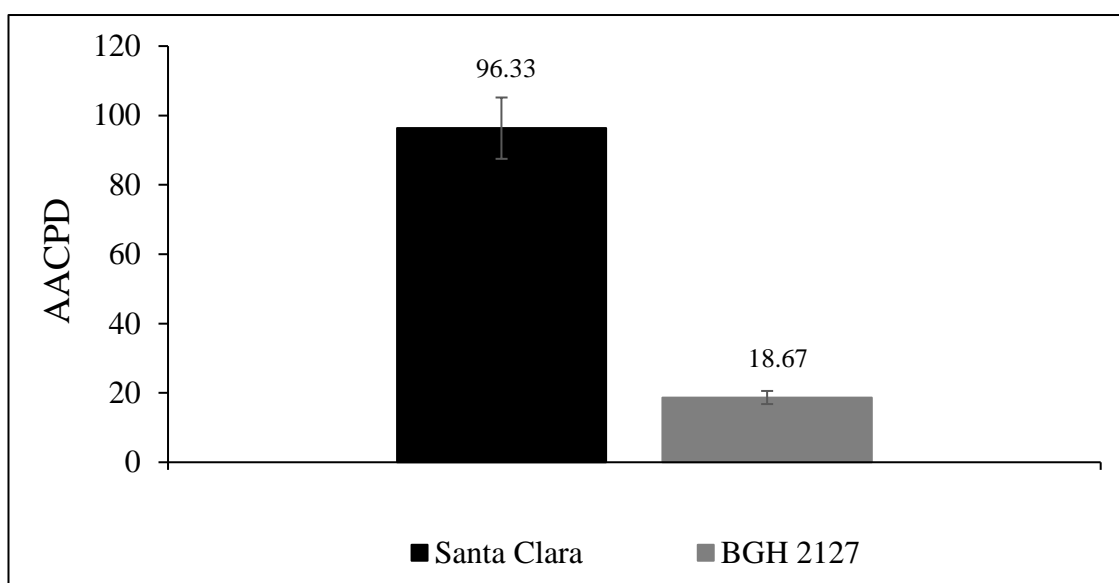


Figura 1. Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o acesso BGH-2127 e para o cultivar Santa Clara, avaliados quanto a resistência à requeima (*Phytophthora infestans*).

3.2 Análise do perfil de proteínas em resposta à requeima

A análise proteômica em gel bidimensional dos genótipos de tomateiro Santa Clara e BGH-2127 considerando os tempos 0, 2 e 48 horas após a inoculação com *P. infestans*, evidenciou 94 spots diferencialmente abundantes, com relação porcentagem volume significativamente modificada em pelo menos 1,5 vezes ($p < 0,05$). Deste total, 56 spots foram identificados por espectrometria de massas, sendo 17 relativos ao Santa Clara (Figura 2A) e 39 ao BGH-2127 (Figura 2B). Apenas 6 spots (19, 28, 122, 132, 188 e 303) diferencialmente abundantes foram comuns aos dois genótipos, evidenciando que diferentes mecanismos são utilizados por estes genótipos frente à infecção da requeima.

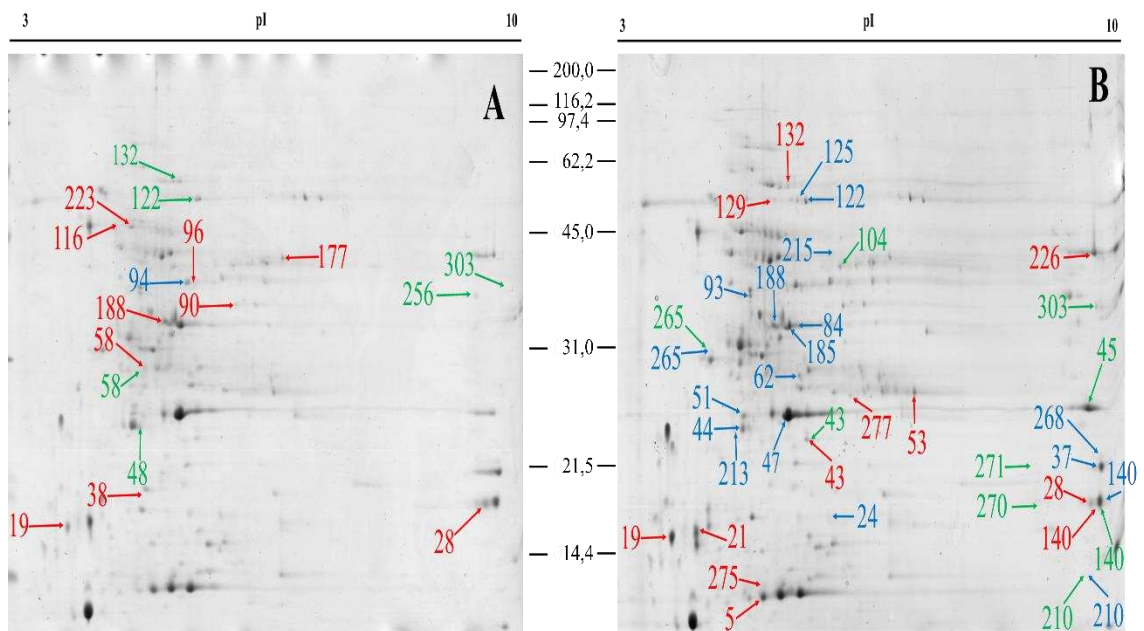


Figura 2. Géis bidimensionais representativos do extrato de folhas de tomateiro em IPG pH 3 a 10 e *SDS-PAGE* 12,5% em gel de 24 cm. Os *spots* diferencialmente abundantes e seus respectivos ID para os genótipos Santa Clara (A) e BGH 2127 (B) nos tempos 0 (azul), 2 (vermelho) e 48 (verde) horas após a inoculação com *P. infestans*. pI: ponto isoelétrico; MM: marcador de massa molecular *Broad Range* (Bio-Rad) em kDa.

As 17 proteínas identificadas no genótipo Santa Clara foram categorizadas em cinco grupos de funções biológicas relacionadas ao metabolismo e energia, fotossíntese, estresse e defesa, transcrição e não caracterizadas. Para o genótipo BGH-2127 seis grupos funcionais de proteínas foram formados referentes a energia e metabolismo, fotossíntese, estresse e defesa, transcrição, outras proteínas e não caracterizadas (Figura 3).

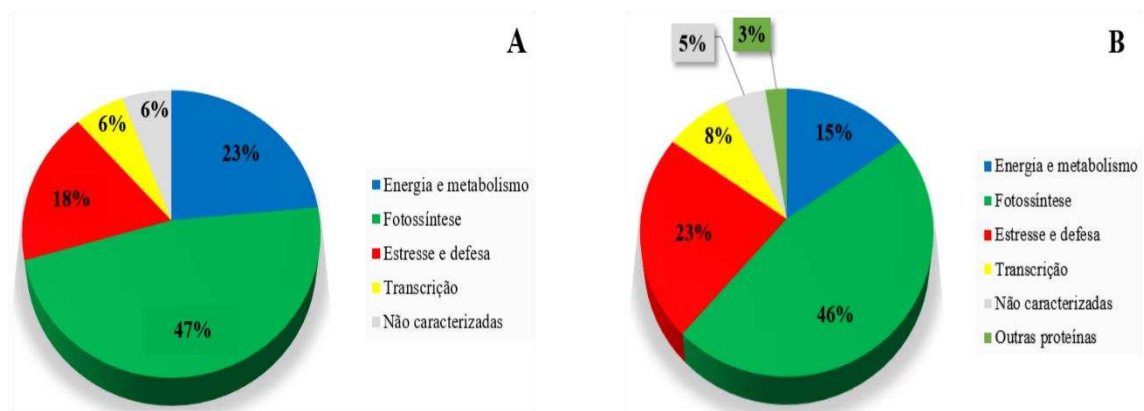


Figura 3. Distribuição das funções biológicas das proteínas diferencialmente abundantes para os genótipos Santa Clara (A) e BGH-2127 (B) de acordo com *software* *Mapman*.

Tabela 1. Proteínas diferencialmente abundantes no genótipo suscetível Santa Clara após inoculação com *P. infestans* identificadas por espectrometria de massas

^a ID (Tempo)	Acesso (UNIPROT)	Proteína (organismo)	^b pI/MM		^c Nível de abundância	Anova (P<0.05)	^d Score	^e Cobertura (%)	^f Peptídeos identificados
			Experimental	Teórico					
Energia e metabolismo									
122 (T48)	Q2MI93	ATP sintase subunidade beta (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,50/54,28	5,28/53,49	+1,74	0,002	183	4,60	AHGGVSVFGGVGER FVQAGSEVSALLGR
132 (T48)	Q2MIB5	ATP sintase subunidade alfa (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,24/59,09	5,14/55,43	-2,27	0,000	147	5,14	EAYPGDVFYLHSR IAQIPVSEAYLGR
223 (T2)	K4AXS2	Glutamina sintetase (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,12/45,00	6,29/46,85	+1,59	0,028	140	3,70	HETASIDQFSWGVANR
256 (T48)	A0A075EZS4	Malato desidrogenase glioxissomal (<i>Nicotiana tabacum</i>)	9,27/35,02	8,40/37,94	-10,84	0,000	64	4,76	TGAEVYQLGPLNEYER
Fotossíntese									
*19 (T2)	K4D1V7	Ferredoxina-1 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	3,54/15,67	4,60/15,74	-1,58	0,001	31	14,60	LITPEGPFEDCPDDVSILDR
*28 (T2)	K4CU43	Subunidade IV A do centro de reação do FSI (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,58/17,57	9,77/14,86	+1,59	0,043	173	14,30	VNYANVSTNNYALDEVEEVK
*58 (T2)	K4B876	Clorofila de ligação a/b (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,68/26,48	5,15/28,20	+2,04	0,010	42	4,91	SAPSSSPWYGPDR
*58 (T48)	K4B876	Clorofila de ligação a/b (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,68/26,48	5,15/28,20	+1,95	0,001	42	4,91	SAPSSSPWYGPDR
90 (T2)	K4B3P9	Frutose bifosfato aldolase (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,99/35,11	6,07/42,87	-1,64	0,028	44	2,53	SAAYYQQGAR
94 (T0)	K4B6C3	Frutose bifosfato aldolase (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,43/37,24	6,07/42,87	-2,08	0,046	70	2,53	SAAYYQQGAR
96 (T2)	K4B6C3	Frutose bifosfato aldolase (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,33/38,01	6,07/42,88	-1,75	0,040	87	2,53	SAAYYQQGAR
188 (T2)	P23322	Proteína envolvida no enriquecimento de oxigênio 1 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,03/32,87	5,91/35,16	+1,81	0,023	86	2,72	VPFLFTIK

Estresse e defesa

48 (T48)	K0I7G7	Thioredoxina peroxidase (<i>Nicotiana tabacum</i>)	4,70/24,67	8,25/39,97	+2,24	0,016	90	5,19	SYNVLIPDQGIALLR
116 (T2)	A0A0G2SJC2	N2-acetilornitina desacetilase (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,55/46,27	4,79/48,30	-1,94	0,042	79	5,07	ATEEVVGYVEPYSITGSLPLIR
303 (T48)	Q01413	β -1,3 endo glucano-glucosidase B (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,76/35,56	7,85/39,75	+1,70	0,027	150	6,67	LYDPNHGALNALR WFTDPIVGFLR

Transcrição

*177 (T2)	K4C945	Proteína de ligação do cloroplasto de 41 Kda (<i>Solanum lycopersicum</i>)	6,64/40,87	7,67/42,60	-1,94	0,036	213	8,71	FIGVFLSR EGHQVTLFTR AGGFPEPELVHYNPK
-----------	--------	---	------------	------------	-------	-------	-----	------	---

Não caracterizada

38 (T2)	A3A0W3	Proteína não caracterizada (<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>)	4,90/19,24	10,36/29,68	+1,52	0,018	76	8,99	SSWNSPYYDTSSYGAGSGGGGGGGR
---------	--------	---	------------	-------------	-------	-------	----	------	---------------------------

^aID representa o número de identificação das proteínas identificadas nos géis bidimensionais. (T0), (T2) e (T48) tempo no qual o *spot* foi diferencialmente abundante.

^bPontos isoelétricos (pI) e massas moleculares (MM) experimentais e teóricos.

^cNível de abundância representados pela % de volume dos spots: os sinais (+) e (-) indicam maior (*up-regulada*) e menor (*down regulada*) abundância da proteína, respectivamente.

^dPorcentagem de cobertura.

^eScore Mascot.

^fPeptídeos identificados e confirmados com mais de 90% de certeza pelo *software Scaffold*.

*BLAST realizado a partir da sequência obtida pelo UNIPROT no Phytozome.

Tabela 2. Proteínas diferencialmente abundantes no genótipo resistente BGH-2127 após inoculação com *P. infestans* identificadas por espectrometria de massas

^a ID (Tempo)	Acesso (UNIPROT)	Proteína (organismo)	^b pI/MM		^c Nível de abundância	Anova (P<0.05)	^d Score	^e Cobertura (%)	^f Peptídeos identificados
			Experimental	Teórico					
Energia e metabolismo									
*24 (T0)	K4ASU4	ATP sintase subunidade beta (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,77/16,41	5,30/14,57	+3,45	0,001	169	19,50	IGNNEITVLVNDAEK TLNLSVLTPNR
62 (T0)	M0ZMS6	Triose fosfato isomerase (<i>Solanum tuberosum</i>)	5,37/27,83	6,89/35,06	+1,95	0,006	359	17,20	FFVGGNWK GGAFTGEISVEQVK TFDVCFQQLK VASPEQAQEVHVAVR WVILGHSER
122 (T0)	Q2MI93	ATP sintase subunidade beta (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,50/54,28	5,28/53,49	+2,85	0,003	180	4,60	AHGGVSVFGGVGER FVQAGSEVSALLGR
125 (T0)	Q2MI93	ATP sintase subunidade beta (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,39/54,21	5,28/53,50	+2,33	0,003	57	2,30	AHGGVSVFGGVGER
129 (T2)	Q2MIB5	ATP sintase subunidade alfa (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,99/55,60	5,14/55,43	-1,82	0,004	180	5,13	EAYPGDVFYLHSR IAQIPVSEAYLGR
132 (T2)	Q2MIB5	ATP sintase subunidade alfa (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,24/59,09	5,14/55,43	-4,04	0,036	147	5,14	EAYPGDVFYLHSR IAQIPVSEAYLGR
Fotossíntese									
5 (T2)	A9S3R8	Ribulose bifosfato carboxilase subunidade menor(<i>Physcomitrella patens subsp. patens</i>)	4,81/11,80	8,20/20,16	-1,57	0,028	178	6,63	ENNSSPGYYDGR
*19 (T2)	K4D1V7	Ferredoxina-1 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	3,54/15,67	4,60/15,74	-1,72	0,028	31	14,60	LITPEGPFEFDPCDDVSILDR
*21 (T2)	K4C6T7	Proteína H3do sistema de clivagem de glicina (<i>Solanum lycopersicum</i>)	3,89/15,93	4,73/17,66	+2,28	0,024	40	5,52	YASSHEWVK
*28 (T2)	K4CU43	Subunidade IV do centro de reação do FSI (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,58/17,57	9,77/14,86	-2,58	0,002	173	14,30	VNYANVSTNNYALDEVEEVK
37 (T0)	P12372	Subunidade II do centro de reação FSI (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,77/20,61	9,71/22,96	+17,49	0,005	101	3,37	INYQFYR
43 (T2)	K4CEP4	Proteína envolvida no enriquecimento de oxigênio 2 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,45/22,97	7,63/27,86	+2,45	0,015	185	9,30	EYYLSQLTR SITDYGSPPEFLSK

43 (T48)	K4CEP4	Proteína envolvida no enriquecimento de oxigênio 2 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,45/22,97	7,63/27,86	+1,82	0,038	185	9,30	EYYYLSVLTR SITDYGSPPEFLSK
47 (T0)	K4CEP4	Proteína envolvida no enriquecimento de oxigênio 2 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,19/24,58	7,63/27,86	+1,59	0,038	71	3,88	EYYYLSVLTR
53 (T2)	A0A061FWJ7	Ribulose 3-fosfato epimerase (<i>Theobroma cacao</i>)	6,99/26,08	6,96/26,28	-2,46	0,043	165	14,30	AGADIVSVHCEQSSSTIHLHR GVNPWIEVDGGVGP
140 (T0)	P12372	Subunidade II do centro de reação FSI (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,73/17,98	9,71/22,96	+12,44	0,006	50	3,37	INYQFYR
140 (T2)	P12372	Subunidade II do centro de reação FSI (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,73/17,98	9,71/22,96	-2,10	0,045	50	3,37	INYQFYR
140 (T48)	P12372	Subunidade II do centro de reação FSI (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,73/17,98	9,71/22,96	+1,51	0,032	50	3,37	INYQFYR
185 (T0)	P23322	Proteína envolvida no enriquecimento de oxigênio 1 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,23/32,50	5,91/35,15	+2,23	0,014	81	2,43	VPFLFTIK
188 (T0)	P23322	Proteína envolvida no enriquecimento de oxigênio 1 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,03/32,87	5,91/35,16	+2,04	0,026	86	2,72	VPFLFTIK
*226 (T2)	K4CGI6	Peroxisomal (S) Glo5 2-hidroxi-ácido oxidase (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,64/37,34	8,98/40,64	-6,57	0,001	48	2,70	IPVFLDGGVR
268 (T0)	P12372	Subunidade II do centro de reação FSI (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,76/21,56	9,71/22,96	+3,84	0,004	48	3,37	INYQFYR
271 (T48)	P12372	Subunidade II do centro de reação FSI (<i>Solanum lycopersicum</i>)	8,63/19,23	9,71/22,96	-2,08	0,023	40	3,37	INYQFYR
275 (T2)	P05349	Ribulose bifosfato carboxilase subunidade menor 3B	4,79/12,22	6,72/20,21	-2,38	0,020	243	13,90	AYPQAWVR IIGFDNVR KAYPQAWVR SPGYDGR

Estresse e defesa

*44 (T0)	K4D389	2-cis peroxiredoxina BAS1 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,53/23,80	6,00/29,73	+1,67	0,006	155	14,2	AYNVLPDQGIALR VNTEILGVSVDVFSHLAWVQTER
*45 (T48)	K4CP63	Família thaumatina (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,65/24,73	6,67/27,60	+3,35	0,012	119	8,13	GQTWVINAPR TNCNFDGAGR
51 (T0)	I0CC94	2-cis peroxiredoxina (<i>Tamarix hispida</i>)	4,54/24,84	6,90/30,02	+1,95	0,021	91	6,60	TVIDESLVAGFTIR
*84 (T0)	K4BX60	Domínio N-terminal rico em repetição de leucina (<i>Solanum lycopersicum</i>)	5,44/32,71	6,23/78,66	+1,63	0,032	34	1,12	VVSVSIPR
93 (T0)	K4CAF9	Carboxipeptidase (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,66/36,59	5,84/56,02	+1,64	0,038	260	7,03	HYAGYVNIDESHGK NLYYYFVESER WFEIYPEFLK
*210 (T0)	K4BJU1	Inibidor de protease e tripsina (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,13/21,57	7,48/24,99	-2,79	0,026	85	5,43	LFNIQFDIPTFR

*210 (T48)	K4BJU1	Inibidor de protease e tripsina (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,13/21,57	7,48/24,99	-3,07	0,008	85	5,43	LFNIQFDIPTFR
*213 (T0)	K4D389	2-Cis peroxiredoxina BAS1 (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,40/23,81	6,00/29,73	+1,56	0,017	229	11,20	AYNVLIPDQGIALLR EGVIQHSTINNLGIGR
303 (T48)	Q01413	β -1,3 endo glucano-glicosidase B (<i>Solanum lycopersicum</i>)	9,76/35,56	7,85/39,75	-6,32	0,005	150	6,67	LYDPNHGALNALR WFTDPIVGFLR
Transcrição									
*265 (T0)	K4BK45	Fator de <i>splicing</i> 3B, subunidade IV (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,14/30,61	4,68/27,23	+3,33	0,013	104	4,73	IYVGNIPWDIDDAR
*265 (T48)	K4BK45	Fator de <i>splicing</i> 3B, subunidade IV (<i>Solanum lycopersicum</i>)	4,14/30,61	4,68/27,23	+1,51	0,043	104	4,73	IYVGNIPWDIDDAR
270 (T48)	K4BVX5	Peptidil-prolil cis-trans-isomerase (<i>Solanum lycopersicum</i>)	8,67/17,14	6,75/24,73	-5,24	0,034	303	18,80	SGDTVVVDWDGYTIGYYGR VGSQEVIPAFEEAITGIALGGIR
Outras proteínas									
277 (T2)	Q8RZX3	Os01g0915900 protein (<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>)	6,05/26,02	8,75/23,33	-2,36	0,036	65	8,99	SSWNSPYDTSYAGSGGGGGGGR
Não caracterizadas									
104 (T48)	A3A0W3	Proteína não caracterizada (<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>)	5,98/40,08	10,36/29,68	+1,52	0,027	59	8,99	SSWNSPYDTSYAGSGGGGGGGR
215 (T0)	A3A0W3	Proteína não caracterizada (<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>)	6,14/43,16	10,36/29,68	+2,76	0,002	70	8,99	SSWNSPYDTSYAGSGGGGGGGR

^aID representa o número de identificação das proteínas identificadas nos géis bidimensionais. (T0), (T2) e (T48) tempo no qual o spot foi diferencialmente abundante.

^bPontos isoelétricos (pI) e massas moleculares (MM) experimentais e teóricos em kDa.

^cNível de abundância representados pela % de volume dos spots: os sinais (+) e (-) indicam maior (*up-regulada*) e menor (*down regulada*) abundância da proteína, respectivamente.

^dPercentagem de cobertura.

^e*Score Mascot*.

^fPeptídeos identificados e confirmados com mais de 90% de certeza pelo *software Scaffold*.

**BLAST* realizado a partir da sequência obtida pelo *UNIPROT* no *Phytozome*.

Das 17 proteínas identificadas no genótipo Santa Clara após a inoculação com *P. infestans*, 8 foram *down-reguladas* enquanto 9 foram *up-reguladas* (Tabela 1). Aumentos na abundância relativa de proteínas envolvidas no processo de estresse e defesa e para proteína não caracterizada foram observados. Proteínas relacionadas ao metabolismo e energia, assim como às relacionadas à fotossíntese, obtiveram modificações nos níveis de abundância equilibrados. Para proteína relacionada à transcrição foi observada redução na abundância relativa (Figura 4).

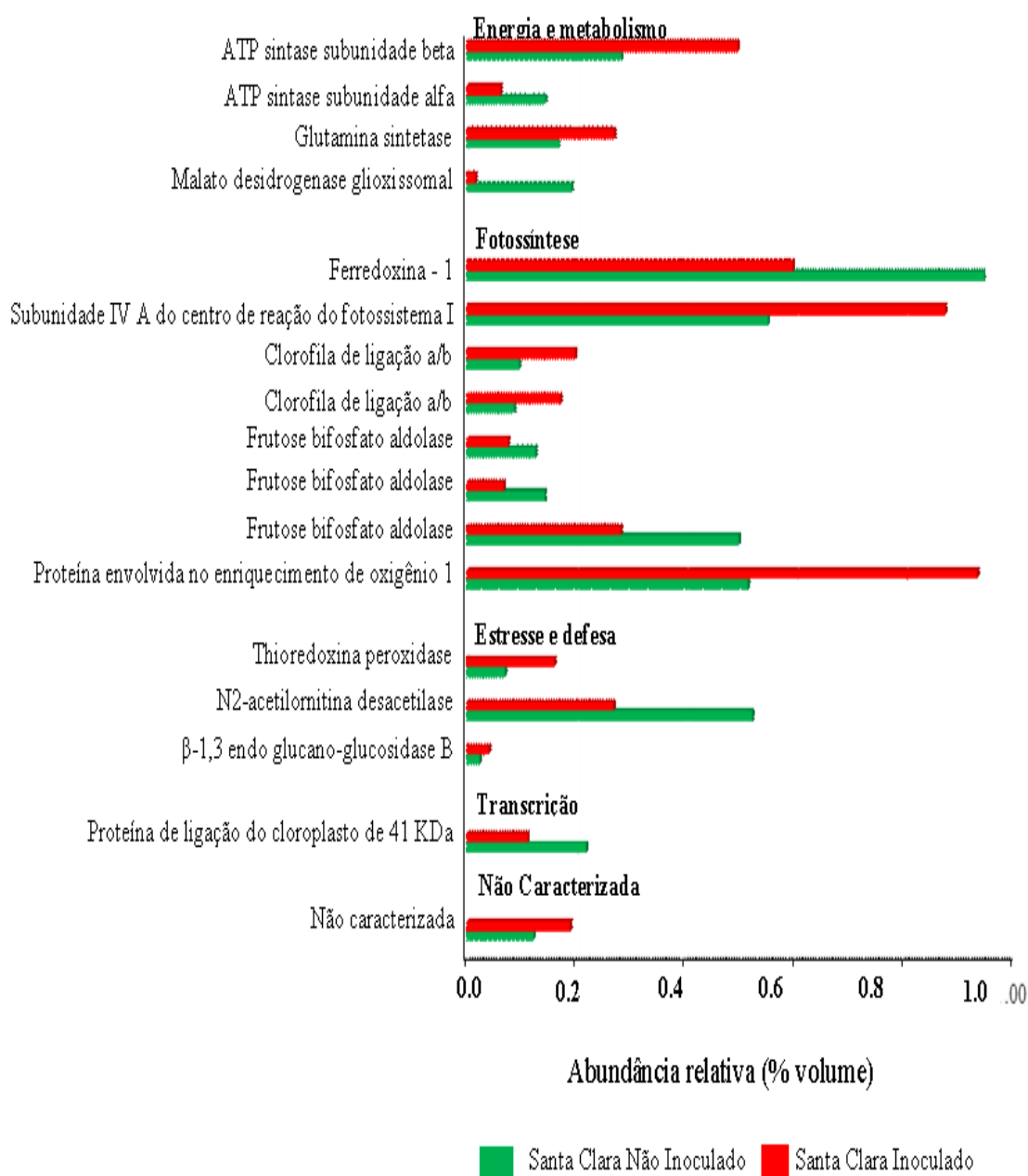


Figura 4. Abundância relativa (% volume) das proteínas diferencialmente abundantes considerando tratamentos inoculados e não inoculados com *P. infestans* no genótipo Santa Clara.

Para o genótipo BGH-2127, entre 39 proteínas identificadas após a inoculação com *P. infestans*, 15 foram *down-reguladas* e 24 *up-reguladas* (Tabela 2). Ocorreu aumento na abundância relativa da maior parte das proteínas envolvidas nos processos de energia e metabolismo, fotossíntese, estresse e defesa, além das proteínas não caracterizadas. A maior parte de proteínas relacionadas a transcrição e outras proteínas tiveram abundância relativa reduzida após a inoculação (Figura 5).

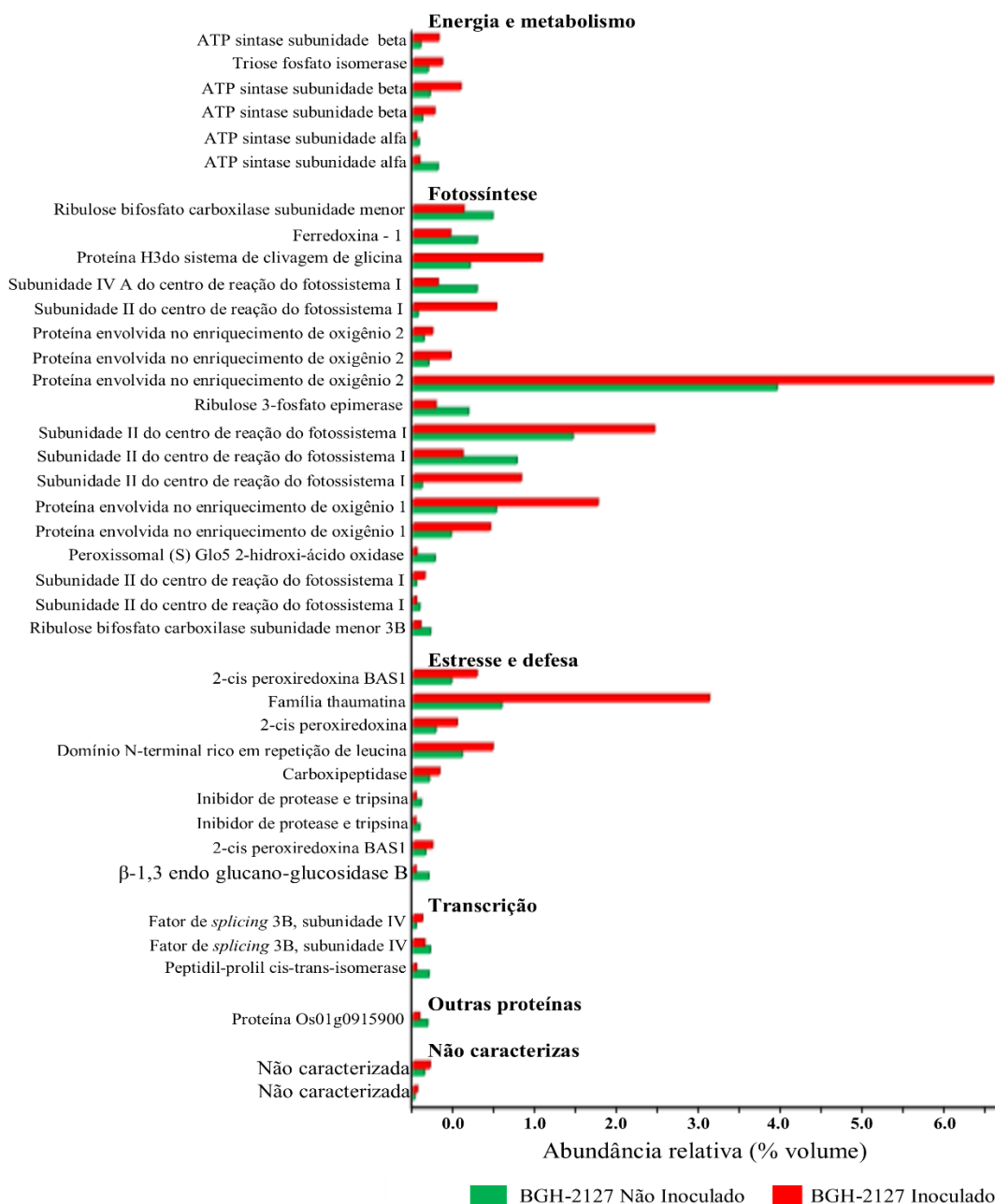


Figura 5. Abundância relativa (% volume) das proteínas diferencialmente abundantes considerando tratamentos inoculados e não inoculados com *P. infestans* no genótipo BGH-2127.

Várias proteínas foram identificadas em mais de um *spot* no mesmo gel. Os 17 *spots* indentificados no Santa Clara corresponderam a 14 proteínas (Tabela 1), enquanto que os 39 *spots* relativos ao BGH-2127 corresponderam a 24 proteínas (Tabela 2). Três *spots* foram identificados como diferentes formas da proteína frutose bifosfato aldolase (90, 94 e 96) no Santa Clara (Tabela 1). Para o genótipo BGH-2127, dois *spots* foram identificados como ATP sintase subunidade alfa (122 e 125), três como ATP sintase subunidade beta (24, 129 e 132), quatro como subunidade II do centro de reação do fotossistema I (37, 140, 268 e 271), dois como proteínas envolvidas no enriquecimento de oxigênio 1 (185 e 188) e dois como proteínas envolvidas no enriquecimento de oxigênio 2 (43 e 47) (Tabela 2).

Um ponto importante observado foi que uma mesma proteína representada por diferentes *spots*, possuir níveis de abundância opostos. Este fato foi observado nos *spots* 37, 140, 268 e 271 identificados como subunidade II do centro de reação do fotossistema I para o BGH-2127 (Tabela 2). Os *spots* 37 e 268 foram *up-regulados*, enquanto o 271 foi *down-regulado*. Cabe ressaltar ainda que o *spot* 140, diferencialmente abundante nos três tempos avaliados, foi *up-regulado* nos tempos 0 e 48 horas após a inoculação e *down-regulado* no tempo 2 horas após a inoculação (Tabela 2).

3.3 Correlação entre mRNA e abundância de proteínas

Os níveis de transcritos (mRNA) dos genes que codificam as proteínas de 2-cis peroxirredoxina BAS1 (*spot* 44) e taumatina (*spot* 45) avaliados para o BGH-2127 não tiveram correlação com os níveis de abundância das respectivas proteínas. A expressão do gene que codifica 2-cis peroxirredoxina BAS1 diminuiu significativamente no tempo 0 (zero) para o tratamento inoculado, enquanto que a sua proteína correspondente teve maior abundância. Para taumatina (*spot* 45), não houve diferença no nível de expressão do gene que codifica essa proteína no tempo 48 horas após a inoculação, no entanto, a abundância da respectiva proteína foi maior. A abundância relativa de proteínas podem ou não ser proporcionais aos níveis de mRNA, pois, após o mRNA ser sintetizado podem ocorrer diferentes processos regulatórios como modificações pós-transcricional, pós-traducional e ainda degradação proteica, que atuam no controle da abundância de proteínas.

3.4 Análise de redes da interação proteína-proteína

As interações observadas entre as proteínas identificadas no genótipo Santa Clara ocorreram entre aquelas relacionadas ao processo fotossintético, assim como também entre proteínas de metabolismo e energia. As proteínas tioredoxina peroxidase (*spot48*), N2-acetilornitina desacetilase (*spot 116*), β -1,3 endo glucano-glucosidase B (*spot 303*) e glutamina sintetase (*spot 223*) não tiveram relação funcional entre si, ou com outras proteínas da rede de interação (Figura 6).

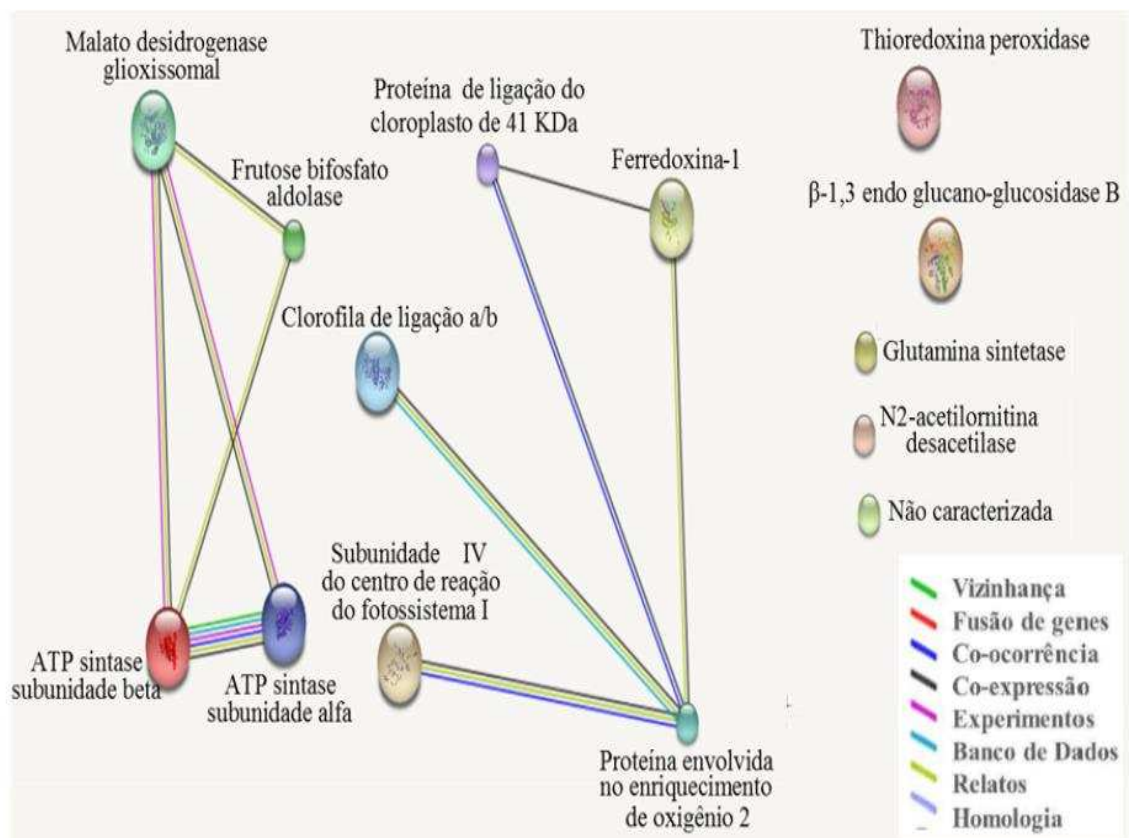


Figura 6. Rede de interação proteína-proteína analisadas pelo *software String* a partir de proteínas diferencialmente abundantes para o genótipo Santa Clara inoculado e não inoculado. Linhas de diferentes cores representam evidências de associações, conforme legenda.

Na rede de interação de proteínas do genótipo BGH-2127, para proteína domínio N-terminal rico em repetição de leucina (*spot 84*), relacionada ao estresse e defesa foi observada interação com a proteína ribulose 3-fostato epimerase (*spot 53*), que por sua vez interagiu com as proteínas ribulose bifosfato carboxilase subunidade menor (*spot 5*) e ribulose bifosfato carboxilase subunidade menor 3B (*spot 275*). Outras duas redes de interações observadas ocorreram entre proteínas relacionadas ao processo fotossintético e também entre proteínas de energia e metabolismo. Para as demais proteínas relacionadas a estresse e defesa, transcrição e outras proteínas não foram observadas nenhum tipo de relação funcional (Figura 6).

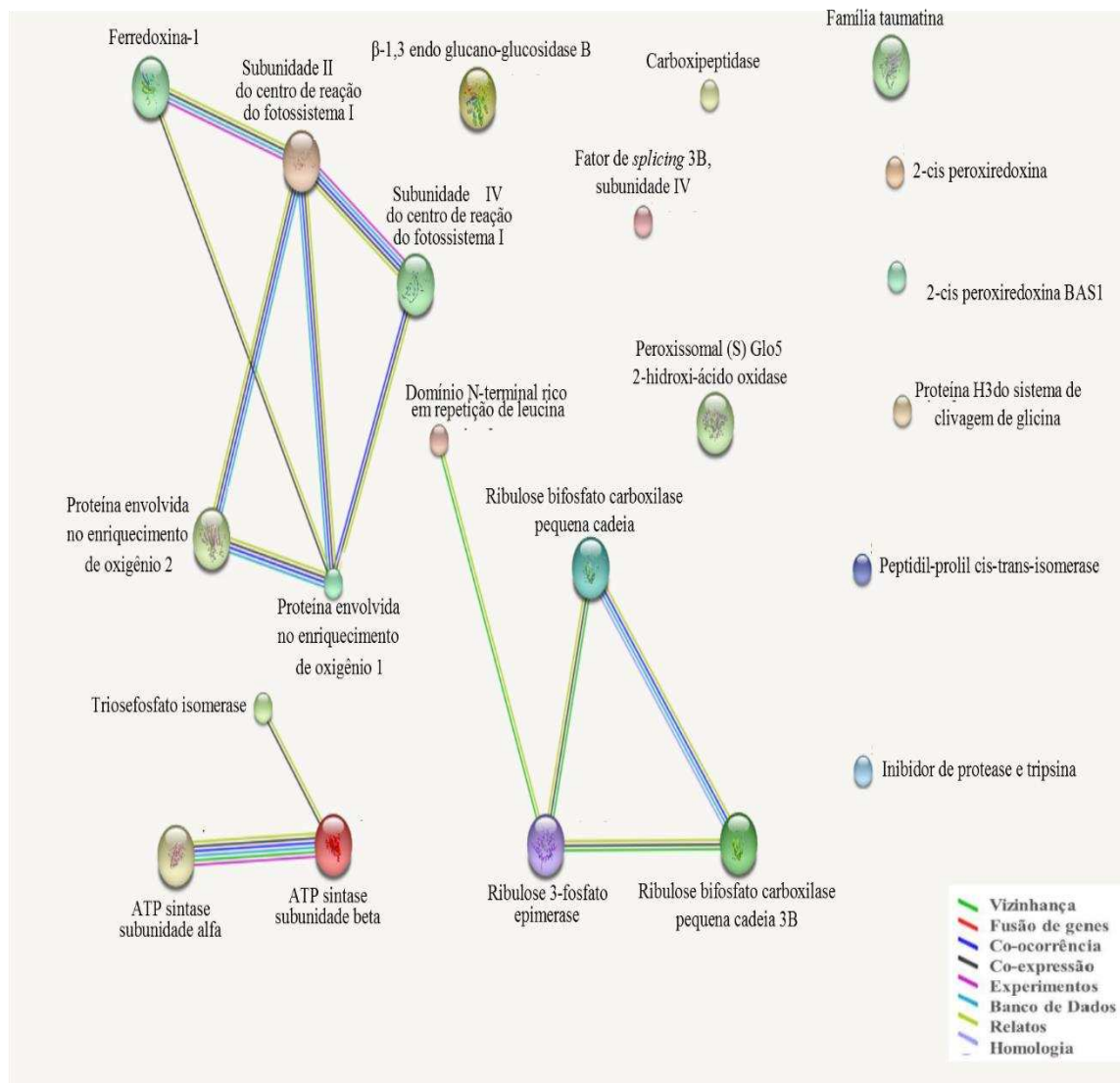


Figura 7. Rede de interação proteína-proteína analisadas pelo *software String* a partir de proteínas diferencialmente abundantes para o genótipo BGH-2127 inoculado e não inoculado. Linhas de diferentes cores representam evidências de associações, conforme legenda.

4. DISCUSSÃO

4.1 Avaliação fenotípica da resistência a requeima

Os resultados da avaliação da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) confirmaram a resistência do BGH-2127 e suscetibilidade do cultivar Santa Clara frente a infecção da requeima. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados anteriormente com estes genótipos (Laurindo et al., 2016).

P. infestans, agente etiológico da requeima do tomateiro foi classificada do ponto de vista científico e econômico, como a espécie de maior relevância entre oomicetos que atacam plantas (Kamoun et al., 2015). Mesmo diante da importância que esta doença representa, poucos cultivares de tomateiro resistentes estão disponíveis no mercado, o que reflete a dificuldade de trabalhar com esse patógeno em programas de melhoramento (Abreu et al., 2008). Fonte de resistência à requeima foi identificada em espécie silvestre de tomateiro (Ohlson & Foolad, 2016). No entanto, quando estes genótipos são utilizados em programas de melhoramento, problemas comuns ao arraste gênico ocorrem, pois, QTL's relacionadas a resistência à requeima afetam características morfoagronômicas de interesse (Haggard et al., 2015). Uma alternativa para reverter esse problema é a utilização de fontes de resistência que pertençam a mesma espécie a ser melhorada, como o acesso BGH-2127, pertencente à espécie cultivada *S. lycopersicum* (Laurindo et al., 2016). A característica diferencial que este genótipo possui proporcionará a recuperação mais rápida das características agronômicas desejadas.

4.2 Respostas proteômicas de genótipos contrastantes quanto a resistência à requeima

Com base nas variações da abundância diferencial de proteínas identificadas em diferentes tempos (0, 2 e 48 horas) após a inoculação foram consideradas suas relações com diferentes processos biológicos, visando demonstrar as possíveis contribuições para a resistência à requeima do acesso BGH-2127. A infecção pela requeima induziu maior mudança no número de proteínas com abundância diferencial no genótipo BGH-2127 em relação ao Santa Clara.

As proteínas identificadas foram classificadas em diferentes grupos de funções biológicas, confirmando que a resistência de plantas a patógenos resulta de vários fatores fisiológicos e, ou, mecanismos bioquímicos (Galmés et al., 2011). Para ambos genótipos, os grupos de classificações de funções biológicas foram praticamente os mesmos, sendo estes relacionados a processos de energia e metabolismo, fotossíntese,

estresse e defesa, transcrição e não caracterizadas. A excessão foi o grupo de outras proteínas referente ao genótipo BGH-2127. No entanto, apenas seis proteínas diferencialmente abundantes foram comuns aos dois genótipos. Entre estas proteínas, a ferredoxina-1 e a ATP sintase subunidade alfa foram *down-regulas*, a ATP sintase subunidade beta e a proteína envolvida no enriquecimento de oxigênio 2 foram *up-reguladas*, enquanto a subunidade IV do centro de reação do fotossistema I e a β -1,3 endo glucano-glucosidase B obtiveram padrões opostos em ambos genótipos. A variabilidade entre proteínas com abundância diferencial durante a infecção pela requeima evidencia respostas distintas entre os genótipos avaliados.

Entre as proteínas exclusivas de cada genótipo, algumas foram identificadas em mais de um *spot* em mesmo gel. Para o genótipo Santa Clara os *spots* 90, 94 e 96 foram identificados como a proteína frutose bifosfato aldolase. No genótipo BGH-2127, dois *spots* foram identificados como ATP sintase subunidade alfa (122 e 125), três como ATP sintase subunidade beta (24, 129 e 132), quatro como subunidade II do centro de reação do fotossistema I (37, 140, 268 e 271), dois como proteínas envolvidas no enriquecimento de oxigênio 1 (185 e 188) e dois como proteínas envolvidas no enriquecimento de oxigênio 2 (43 e 47). Esses resultados indicam *spots* com diferentes valores de massa molecular (MM) e ponto isoelétrico (pI) para uma mesma proteína, que ocorrem devido a alterações no proteoma e podem ser atribuídas à modificações pós-traducionais, ou a presença de diferentes formas da mesma proteína de uma determinada família funcional (Wu et al., 2013). As modificações pós-traducionais são consideradas processos importantes, pois, influenciam a atividade e função das proteínas por meio da ligação destas com outros grupos funcionais (Liu et al., 2016).

Proteínas representadas pelos *spots* 37, 140, 268 e 271 identificados como subunidade II do centro de reação do fotossistema I tiveram níveis de abundância opostos (alguns *spots up-regulados* e outros *down-regulados*). Uma hipótese para este fenômeno é que as diferentes formas da proteína desempenham funções moleculares distintas e também são responsáveis pela regulação de mecanismos complexos durante a infecção do patógeno (Wu et al., 2013).

4.3 Proteínas relacionadas à energia e metabolismo

Em plantas muitas proteínas estão envolvidas em vias metabólicas e energéticas, sendo consideradas importantes na resposta à infecção (Cipriano et al., 2016), pois, mobilizam altos custos metabólicos para superar o ataque dos patógenos (Swarbrick et al., 2006). Variações significativas de proteínas relacionadas à energia e metabolismo

entre tratamentos inoculados e não inoculados com *P. infestans* foram evidentes. Diferenças na regulação das proteínas deste grupo funcional podem contribuir para resistência à requeima do BGH-2127 quando comparado ao Santa Clara. Aproximadamente 67% das proteínas envolvidas neste processo para o genótipo BGH-2127 tiveram o nível de abundância relativa aumentado após a inoculação, enquanto que para o genótipo Santa Clara, somente metade destas proteínas aumentaram. O aumento da abundância de proteínas relacionadas a energia e metabolismo em plantas infectadas pode ser justificado pelo fato destas plantas possuírem maior demanda de energia para superar o ataque do patógeno, que geralmente ocorre pelo aumento da respiração (Berger et al., 2007).

Entre as proteínas que tiveram níveis de abundância aumentados após a inoculação do patógeno para o genótipo BGH-2127, destaca-se aquelas que fazem parte do complexo ATP sintase, que é constituído por várias subunidades e utilizam o gradiente de prótons transmembrana para biosíntese de ATP celular (Millar et al., 2011). Considerando a resistência de plantas a patógenos, o ATP celular possui papel importante como molécula de sinalização em respostas ao estresse, incluindo os causados por patógenos (Cao et al., 2014).

A trifosfato isomerase é uma proteína chave da via glicolítica, que catalisa a interconversão entre o gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato. Esta proteína tem sido frequentemente identificada como alvo potencial tanto da glutatiónionilação como da nitrosilação em estudos proteômicos, sugerindo que sua atividade pode ser regulada sob condições de estresse (Zaffagnini et al., 2014). Em estudos de estágios de desenvolvimento do oomiceto fitopatogênico *Phytophthora capsici*, a proteína trifosfato isomerase foi *up-regulada* na presença da hifa do patógeno (Pang et al., 2013).

4.4 Proteínas relacionadas à fotossíntese

A fotossíntese é um processo metabólico importante que contribui amplamente para o estado geral de energia celular, para o equilíbrio redox ao fornecer NADPH, ATP e esqueletos de carbono que suportam o crescimento da planta. Além disso, estimulam o início e a manutenção de respostas contra fatores de estresse externos (Kangasjärvi et al., 2014), o que torna o seu papel fundamental durante a defesa do hospedeiro, sendo um dos principais processos afetados (Scharte et al., 2005). Plantas quando submetidas a algum tipo de estresse, geralmente respondem com diminuição na síntese de proteínas celulares e aumento na síntese específica de proteínas envolvidas em mecanismos de defesa (Gulen & Eris, 2004). Isso indica que, durante o ataque de patógenos, a

biossíntese de compostos relacionados à defesa é uma prioridade para a planta, enquanto outras atividades celulares são reduzidas, como no caso da fotossíntese, até que o crescimento patogênico seja interrompido (Berger et al., 2007; Bolton, 2009).

P. infestans é um patógeno hemibiotrófico, e a infecção de plantas por este patógeno envolve a transição de uma fase inicial biotrófica assintomática, até um estado necrotrófico, caracterizado pela morte celular (Zuluaga et al., 2016). Neste contexto, a manutenção da fotossíntese seria vantajosa para o desenvolvimento da requeima. Assim, a redução da fotossíntese é benéfica para o hospedeiro como parte da defesa da planta e pode privar o patógeno dos nutrientes (Garavaglia et al., 2010).

Para o genótipo BGH-2127, após a inoculação com *P. infestans*, ocorreu aumento na abundância relativa de maior parte das proteínas envolvidas no processo fotossintético, sendo 10 *up-reguladas* e 8 *down-reguladas*. No entanto, nota-se que aproximadamente 88% das proteínas *down-reguladas* (*spots* 5, 19, 28, 53, 140, 226 e 275) foram diferencialmente abundantes no tempo 2 horas após a inoculação, que corresponde à fase biotrófica de infecção da requeima (Zuluaga et al., 2016). Para o genótipo Santa Clara, ocorreu equilíbrio entre os níveis de abundância relativa das proteínas identificadas no tempo 2 horas após a inoculação, com 50% destas *down-reguladas* (*spots* 19, 90 e 96). Estes resultados também indicam que a fotossíntese é afetada de forma diferente entre os genótipos avaliado durante a infecção pela requeima.

Outro ponto relevante observado em relação ao BGH-2127 foi que duas formas da proteína subunidade II do centro de reação do fotossistema I, no tempo 0 após a inoculação, tiveram níveis de abundância relativa aumentados. Esses valores foram iguais a +17,49 e +12,44 para os *spots* 37 e 140, respectivamente, quando comparado ao tratamento não inoculado. Mesmo diante do desafio do patógeno, a capacidade do BGH-2127 em elevar os níveis destas proteínas é um fator importante, pois, o poder redutor produzido pelo fotossistema I possui uma função central no metabolismo do cloroplasto e, portanto, possui um papel crucial nas redes metabólicas e respostas fisiológicas das plantas (Chitnis, 2001).

4.5 Proteínas relacionadas ao estresse e à defesa

As respostas de estresse e defesa de um organismos, inclusive em plantas, possui papel importante durante o desenvolvimento celular, frente a infecção por patógenos (Wu et al., 2013). Entre as proteínas identificadas para os genótipos BGH-2127 e Santa Clara, 20,5% e 17,6%, respectivamente, pertencem ao grupo de estresse e defesa. Somente a proteína β -1,3 endo glucano-glucosidase B (*spot* 303), diferencialmente

abundante no tempo 48 horas após a inoculação foi comum aos dois genótipos. No entanto, foram observados níveis de abundância relativo opostos para estas proteínas, com valores iguais a -6,32 para o BGH 2127 e +1,70 para o Santa Clara, sugerindo que esta proteína não é a principal envolvida na resistência do BGH-2127 e que diferentes mecanismos de defesa são utilizados por estes genótipos.

Outra proteína que teve níveis de abundância relativa reduzida no acesso BGH-2127 foi a proteína inibidora de protease (*spot* 210), diferencialmente abundante nos tempos 0 e 48 horas após a inoculação. Durante o processo de infecção, o patógeno produz enzimas que visam as células do hospedeiro, que em contrapartida, codificam proteínas com atividade inibidora de protease para suprimir a atividade enzimática do patógeno (Valueva & Mosolov, 2004). Devido a redução dos níveis desta proteína frente a infecção da requeima, fica evidente que a proteína inibidora de protease também não seja o principal mecanismo de defesa utilizado pelo genótipo resistente.

Duas proteínas relacionadas ao estresse oxidativo tiveram os níveis de abundância relativa aumentados no tempo 0 após a inoculação para o genótipo BGH-2127, a 2-cis peroxirredoxina BAS1 (*spots* 44 e 213) e a 2-cis peroxirredoxina (*spot* 51) (Figura 8).

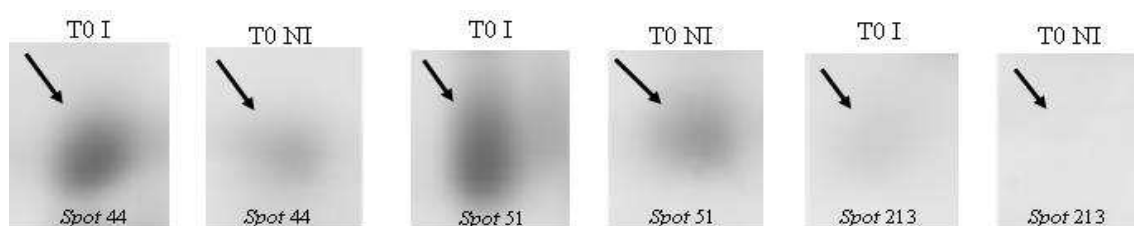


Figura 8. *Spots* das proteínas 2-cis peroxirredoxina BAS1 (*spots* 44 e 213) e 2-cis peroxirredoxina (*spot* 51) diferencialmente abundantes no genótipo BGH-2127 no tempo 0 horas após a inoculação (T0 I) e controle não inoculado (T0 NI).

Em plantas, o ataque de patógenos tem como uma das consequência a rápida formação de espécies reativas do oxigênio, que podem degradar proteínas (Lehmann et al., 2015). Espécies reativas do oxigênio podem ser eliminadas por uma rede de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que incluem as peroxirredoxinas (Awad et al., 2015), justificando o aumento na abundância relativa destas proteínas no acesso BGH-2127 imediatamente após a inoculação. As peroxirredoxinas fazem parte de subfamílias em que as peroxidases são subdivididas (Koua et al., 2009). Quando atuam na defesa das células contra a explosão oxidativa, as peroxidases consomem peróxido de hidrogênio no citosol, vacúolo, parede celular e espaço extracelular. Também estão ligadas a processos metabólicos, formação de lignina e suberina, estruturação e

alongamento da parede celular e às reações de hipersensibilidade, dificultando a invasão da planta pelo patógeno (Almagro et al., 2009; Karuppanapandian et al., 2011).

O *spot* 45 diferencialmente abundante no acesso BGH-2127 no tempo 48 horas após a inoculação foi identificado como uma proteína da família taumatina. Proteínas desta família estão envolvidas no sistema de defesa de plantas contra os estresses biótico e abiótico (Petre et al., 2011), atuando em funções importantes na resistência a patógenos, tolerância ao frio, salinidade e resistência à seca (Liu et al., 2010). O nível de abundância da taumatina foi +3,45 vezes maior quando comparado o tratamento inoculado ao não inoculado (Figura 9). Este resultado permite inferir sobre a importância desta proteína para resistência do genótipo BGH-2127, pois, a presença de taumatina tem sido associada à atividade contra oomicetos (van Loon et al., 2006).

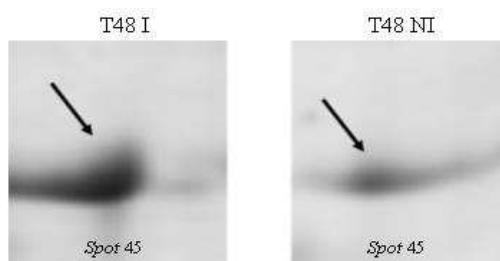


Figura 9. Spots da proteína taumatina diferencialmente abundantes no genótipo BGH-2127 no tempo 48 horas após a inoculação (T48 I) e controle não inoculado (T48 NI).

As proteínas relacionadas à patogênese (PR) são classificadas em 17 famílias segundo propriedades e mecanismos de ação, com as proteínas da família taumatina classificadas no grupo 5 (PR-5) (van Loon et al., 2006). Taumatinas agem inibindo o crescimento de hifas e reduzindo a germinação de esporos, provavelmente pela permeabilização da membrana e, ou, pela interação com receptores dos patógenos (Thompson et al., 2006). As PR-5 possui forte afinidade e atividade hidrolítica por 1,3- β glucano (Osmond et al., 2001), que devido a presença de um domínio quinase e um potencial transmembranar, detectam de forma extracelular fragmentos de 1,3- β glucano (van Loon et al., 2006). A relevante capacidade da taumatina de degradar 1,3- β glucano é um forte indício do principal mecanismos associado a resistência do acesso BGH-2127, pois, a parede celular de oomicetos é composta principalmente por este polímero (Latijnhouwers et al., 2003). Em estudos moleculares envolvendo o patossistema *Zingiber zerumbet* vs *Pythium aphaniderm* para a proteína ZzPR5 pertencente a família das taumatinas foi observado que os aminoácidos constituintes da proteína hidrolisam 1,3- β glucano, sugerindo uma potencial atividade antioomiceto (Nair et al., 2010). No caso específico do oomiceto *P. infestans*, ensaios de resistência em batata transgênica

elucidaram o potencial de taumatinas contra o patógeno, uma vez que não há métodos de controle eficiente ou cultivares resistentes. A superexpressão de genes de taumatina foram responsáveis pelo aumento substancial da resistência ao patógeno (Acharya et al., 2013).

A carboxipeptidase (*spot 93*) é uma proteína proteolítica envolvida em vários processos celulares (Jamet et al., 2008). Ela é responsável pelo metabolismo proteico e hidrolizam peptídeos agindo nas extremidades da proteína (Gomes et al., 2011). O aumento observado na abundância relativa dessa proteína pode contribuir para resistência do BGH-2127, uma vez que carboxipeptidases estão envolvidas na regulação da defesa contra a infecção por agentes patogênicos e estresse oxidativo (Liu et al., 2008).

O *spot 84* foi identificado como a proteína Domínio N-terminal rico em repetição de leucina. A maioria dos genes R dominantes codificam para proteínas desta classe, que possuem uma estrutura composta por um domínio N-terminal, um domínio central com ligações de nucleotídeos e um domínio C-terminal rico em repetição de leucina (Ashikawa, 2012). Esta proteína funciona como um receptor intracelular que detecta proteínas efetoras de patógenos, ativando um conjunto de respostas de defesa associadas à morte celular programada (Qi & Innes, 2013). A imunidade desencadeada por efetores é uma resposta rápida da planta ao ataque do patógeno, por isso é possível inferir sobre o aumento de +1,63 vezes da abundância relativa da proteína domínio N-terminal rico em repetição de leucina no tempo 0 horas após a inoculação no acesso BGH-2127. Na cultura do tomateiro, uma proteína rica em repetição de leucina (CC-NBS-LRR) confere resistência a *P. infestans* (Zhang et al., 2014).

4.6 Proteínas relacionadas à transcrição

Duas proteínas relacionadas à transcrição foram diferencialmente abundante no genótipo BGH-2127. A proteína fator de *splicing* 3b, subunidade 4 (*spot 265*) foi diferencialmente abundante nos tempos 0 e 48 horas após a inoculação, sendo *up-regulada* em ambos os tempos. O *splicing* é um processo que remove os íntrons e une os éxons após a transcrição do RNA. Neste contexto, proteínas fator de *splicing* são importantes para manter o processamento eficiente do RNA sob condições de estresse. Mecanismos pós-transcricionais à base de *splicing* regulam a ativação de moléculas pré-existentes para garantir uma resposta imediata ao estresse (Mazzucotelli et al., 2008). A segunda proteína identificada referente à transcrição foi a peptidil-prolil-cis-trans isomerase (*spot 270*), diferencialmente acumulada no tempo 48 horas após a inoculação.

Esta proteína é considerada parte do sistema inume da planta, que catalisa a isomerização de ligações peptídicas em resíduos de prolina para regular especificamente as alterações de conformação da proteína (Jing et al., 2015). Peptil-prolil-cis-trans isomerases são conhecidas por interagir com outras unidades biológicas para facilitar o dobramento de proteínas, regular processos de desenvolvimento, certos aspectos relacionados à respostas de estresse e morte celular (Kromina et al., 2008). Existem crescentes evidências que apontam para funções associadas à defesa de plantas contra patógenos exercida por proteínas membros da família de peptidil-prolil-cis-trans isomerase (Ünal & Steinert, 2014).

4.7 Rede de interação proteína-proteína

Proteínas não atuam como unidades individuais nas células, mas sim em conjunto com outras proteínas formando redes de interações (Wu et al., 2011). Para determinar como a requeima interage com proteínas do tomateiro e afetam funções celulares, as proteínas diferencialmente abundantes foram analisadas por meio de redes de interações proteína-proteína. As diferentes interações que ocorrem entre proteínas estão no centro do processamento celular e sua caracterização sistemática ajuda a contextualizar essas proteínas no sistema molecular biológico (Szklarczyk et al., 2015). Esse fato pode ser verificado no genótipo Santa Clara para proteínas relacionadas ao processo fotossintético, assim como entre proteínas de metabolismo e energia. Na rede de interação de proteínas do genótipo BGH-2127, interações ocorreram entre proteínas relacionadas ao processo fotossintético e também entre proteínas de energia e metabolismo. Outra rede de interação ocorreu entre a proteína domínio N-terminal rico em repetição de leucina (*spot 84*) com a proteína ribulose 3-fostato epimerase (*spot 53*), que por sua vez interagiu com as proteínas ribulose bifosfato carboxilase subunidade menor (*spot 5*) e ribulose bifosfato carboxilase subunidade menor 3B (*spot 275*). As interações da proteína ribulose 3-fostato epimerase (*spot 53*) com grupos funcionais distintos são de grande interesse, pois, de maneira geral, cada “comunidade proteica” representa um processo celular distinto, assim, uma proteína que é membro de mais de uma “comunidade” participa de vários processos e pode ser considerada uma conexão entre estes (Jonsson & Bates, 2006). A conectividade de proteínas observadas nesta rede biológica sugere que pode haver importantes alterações fisiológicas na regulação funcional dos mecanismos celulares envolvidos na resistência do genótipo BGH-2127 à requeima.

5. CONCLUSÕES

Proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (PR-9) e família taumatina (PR-5) possuem papel importante no mecanismo de defesa do acesso BGH-2127 resistente a requeima do tomateiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, F. B.; SILVA, D. J. H.; CRUZ, C. D.; MIZUBUTI, E. S. G. Inheritance of resistance to *Phytophthora infestans* (Peronosporales, Pythiaceae) in a new source of resistance in tomato (*Solanum* sp.) formerly *Lycopersicon* sp.) Solanales, Solanaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 2, p. 493-497, 2008.
- ACHARYA, K.; PAL, A. K.; GULATI, A.; KUMAR, S.; SINGH, A. K.; AHUJA, P. S. Overexpression of *Camellia sinensis* thaumatin-like protein, CsTLP in potato confers enhanced resistance to *Macrophomina phaseolina* and *Phytophthora infestans* infection. **Molecular biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 609-622, 2013.
- ADALID, A. M.; ROSELLO, S.; VALCARCEL, M.; NUEZ, F. Analysis of the genetic control of b-carotene and L-ascorbic acid accumulation in an orange-brownish wild cherry tomato accession. **Euphytica**, v. 184, n. 2, p. 251–263, 2012.
- ALMAGRO, L.; GÓMEZ-ROS, L. V.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; ROSBARCELO, A.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 377-390, 2009.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ASHIKAWA, I. Regions outside the leucine-rich repeat domain determine the distinct resistance specificities of the rice blast resistance genes Pik and Pik-m. **Molecular breeding**, v. 30, n. 3, p. 1531-1535, 2012.
- AWAD, J.; STOTZ, H. U.; FEKETE, A.; KRISCHKE, M.; ENGERT, C.; HAVAUX, M.; BERGER, S.; MUELLER, M. J. 2-cysteine peroxiredoxins and thylakoid ascorbate peroxidase create a water-water cycle that is essential to protect the photosynthetic apparatus under high light stress conditions. **Plant physiology**, v. 167, n. 4, p. 1592-1603, 2015.
- BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant - pathogen interactions. **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 15-16, p. 4019-4026, 2007.
- BOLTON, M. D. Primary metabolism and plant defense - fuel for the fire. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 5, p. 487-497, 2009.
- 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. 7, p. 248-254, 1976.

CAO, Y.; TANAKA, K.; NGUYEN, C. T.; STACEY, G. Extracellular ATP is a central signaling molecule in plant stress responses. **Current opinion in plant biology**, v. 20, p. 82-87, 2014.

CARMO, L. S.; MURAD, A. M.; RESENDE, R. O.; BOITEUX, L. S.; RIBEIRO, S. G.; JORRÍN-NOVO, J. V.; MEHTA, A. Plant responses to tomato chlorotic mottle virus: Proteomic view of the resistance mechanisms to a bipartite begomovirus in tomato. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 284-292, 2017.

CHITNIS, P. R. Photosystem I: function and physiology. **Annual review of plant biology**, v. 52, n. 1, p. 593-626, 2001.

CIPRIANO, A. K.; GONDIM, D. M.; VASCONCELOS, I. M.; MARTINS, J. A.; MOURA, A. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; MELO, J. G. O.; CARDOSO, J. E.; PAIVA, A. L. S.; OLIVEIRA, J. T. Proteomic analysis of responsive stem proteins of resistant and susceptible cashew plants after *Lasiodiplodia theobromae* infection. **Journal of proteomics**, v. 113, p. 90-109, 2015.

CORRÊA, F. M.; BUENO FILHO, J. S. S.; CARMO, M. G. F. Comparison of three diagrammatic keys for the quantification of late blight in tomato leaves. **Plant Pathology**, n. 58, n. 6, p. 1128–1133, 2009.

FAINO, L.; CARLI, P.; TESTA, A.; CRISTINZIO, G.; FRUSCIANTE, L.; ERCOLANO, M. R. Potato R1 resistance gene confers resistance against *Phytophthora infestans* in transgenic tomato plants. **European journal of plant pathology**, v. 128, n. 2, p. 233-241, 2010.

FOOLAD, M. R.; SULLENBERGER, M. T.; OHLSON, E. W.; GIGINO, B. K. Response of accessions within tomato wild species, *Solanum pimpinellifolium* to late blight. **Plant Breeding**, v. 133, n. 3, p. 1-11, 2014.

FRY, W. E.; BIRCH, P. R. J.; JUDELSON, H. S.; GRÜNWARD, N. J.; DANIES, G., EVERTS, K. L.; GEVENS, A. J.; GUGINO, B.K.; JOHNSON, D. A.; JOHNSON, S. B.; MCGRATH, M. T.; MYERS, K. L.; RISTAINO, J. B.; ROBERTS, P. D.; SECOR, G.; SMAR, C. D. Five reasons to consider *Phytophthora infestans* a reemerging pathogen. **Phytopathology**, v. 105, n. 7, p. 966-981, 2015.

GALMES, J.; CONESA, M. A.; OCHOGAVÍA, J.; PERDOMO, J. A.; FRANCIS, D. M.; RIBAS-CARBÓ, M.; SAVÉ, R.; FLEXAS, J.; MEDRANO, H.; CIFRE, J. Physiological and morphological adaptations in relation to water use efficiency in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*. **Plant, cell & environment**, v. 34, n. 2, p. 245-260, 2011.

GARAVAGLIA, B. S.; THOMAS, L.; GOTTIG, N.; ZIMARO, T.; GAROFALO, C. G.; GEHRING, C.; OTTADO, J. Shedding light on the role of photosynthesis in pathogen colonization and host defense. **Communicative & integrative biology**, v. 3, n. 4, p. 382-384, 2010.

GE Healthcare. **2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients – Principles and Methods**. Code number: 80-6429-60, 2002.

GHOSH, S.; NARULA, K.; SINHA, A.; GHOSH, R.; JAWA, P.; CHAKRABORTY, N.; CHAKRABORTY, S. Proteometabolomic analysis of transgenic tomato overexpressing oxalate decarboxylase uncovers novel proteins potentially involved in defense mechanism against *Sclerotinia*. **Journal of proteomics**, v. 143, p. 242-253, 2016.

GOMES, M. T. R.; OLIVA, M. L.; LOPES, M. T. P.; SALAS, C. E. Plant proteinases and inhibitors: an overview of biological function and pharmacological activity. **Current protein and peptide science**, v. 12, n. 5, p. 417-436, 2011.

GONZALEZ-FERNANDEZ, R.; JORRIN-NOVO, J. V. Contribution of proteomics to the study of plant pathogenic fungi. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 1, p. 3-16, 2011.

GULEN, H.; ERIS, A. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. **Plant Science**, v. 166, n. 3, p. 739-744, 2004.

HAGGARD, J. E.; JOHNSON, E. B.; CLAIR, D. A. St. Multiple QTL for horticultural traits and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* linked on *Solanum habrochaites* chromosome 11. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v. 5, n. 2, p. 219-233, 2015.

HU, C. H.; PEREZ, F. G.; DONAHOO, R.; MCLEOD, A.; MYERS, K.; IVORS, K.; SECOR, G.; ROBERTS, P. D.; DEAHL, K. L.; FRY, W. E.; RISTAINO, J. B. Recent genotypes of *Phytophthora infestans* in the eastern United States reveal clonal populations and reappearance of mefenoxam sensitivity. **Plant Disease**, v. 96, p. 1323-1330, 2012.

JAMET, E.; ALBENNE, C.; BOUDART, G.; IRSHAD, M.; CANUT, H.; PONT-LEZICA, R. Recent advances in plant cell wall proteomics. **Proteomics**, v. 8, n. 4, p. 893-908, 2008.

JING, H.; YANG, X.; ZHANG, J.; LIU, X.; ZHENG, H.; DONG, G.; NIAN, J.; FENG, J.; XIA, B.; QUIAN, Q.; LI, J.; ZUO, J. Peptidyl-prolyl isomerization targets rice Aux/IAAs for proteasomal degradation during auxin signalling. **Nature communications**, v. 6, 2015.

JONSSON, P. F.; BATES, P. A. Global topological features of cancer proteins in the human interactome. **Systems biology**, v. 22, n. 18, p. 2291–2297, 2006.

JUNG, J.; KIM, H. J.; LEE, J. M.; OH, C. S.; LEE, H. J.; YEAM, I. Gene-based molecular marker system for multiple disease resistances in tomato against Tomato yellow leaf curl virus, late blight, and verticillium wilt. **Euphytica**, v. 205, n. 2, p. 599-613, 2015.

KAMOUN, S.; FURZER, O.; JONES, J. D. G.; JUDELSON, H. S.; ALI, G. S.; DALIO, R. J. D.; ROY, S. G.; SCHENA, L.; ZAMBOUNIS, A.; PANABIÈRES, F.; CAHILL, D.; RUOCCO, M.; FIGUEIREDO, A.; CHEN, X. R.; HULVEY, J.; STAM, R.; LAMOUR, K.; GIJZEN, K.; TYLER, B.M.; GRÜNWALD, N.L.; MUKHTAR, M. S.; TOMÉ, D. F. A.; TÖR, M.; ACKERVEKEN, G. V. D.; MCDOWELL, J.; DAAYF, F.; FRY, W. E.; LINDQVIST-KREUZE, H.; MEIJER, H. J. G.; PETRE, B.; RISTAINO, J.; YOSHIDA, K.; BIRCH, P. R. J.; GOVERS, F. G. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. **Molecular plant pathology**, v. 16, n. 4, p. 413-434, 2015.

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J. C.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709, 2011.

KANGASJÄRVI, S.; TIKKANEN, M.; DURIAN, G.; ARO, E. M. Photosynthetic light reactions—An adjustable hub in basic production and plant immunity signaling. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 81, p. 128-134, 2014.

KELLER, A.; NESVIZHSKII, A. I.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 20, p.383-5392, 2002.

KOUA, D.; CERUTTI, L.; FALQUET, L.; SIGRIST, C. J.; THEILER, G.; HULO, N.; DUNAND, C. PeroxiBase: a database with new tools for peroxidase family classification. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 1, p. 261-266, 2009.

KROMINA, K. A.; IGNATOV, A. N.; ABDEEVA, I. A. Role of peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerases in pathologic processes. **Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology**, v. 2, n. 3, p. 195-202, 2008.

KUSHALAPPA, A. C.; GUNNAIAH, R. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 9, p. 522-531, 2013.

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

- LATIJNHOUWERS, M.; DE WIT, P. J.; GOVERS F. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. **TRENDS in Microbiology**, v.11, n.10, p. 462-469, 2003.
- LAURINDO, B. S.; LAURINDO, R. D. F.; NICK, C.; CARNEIRO, P. C. S.; MIZUBUTI, E. S. G.; SILVA, D. J. H. Potencial de hibridação entre acessos de tomateiro para pré melhoramento quanto à resistência à requeima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 1, p. 27-34, 2016.
- LEHMANN, S.; SERRANO, M.; L'HARIDON, F.; TJAMOS, S. E.; METRAUX, J. P. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. **Phytochemistry**, v. 112, p. 54-62, 2015.
- LI, J.; LUAN, Y. Molecular cloning and characterization of a pathogen-induced WRKY transcription factor gene from late blight resistant tomato varieties *Solanum pimpinellifolium* L3708. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 87, p. 25-31, 2014.
- LIU, J.; QIAN, C.; CAO, X. Post-translational modification control of innate immunity. **Immunity**, v. 45, n. 1, p. 15-30, 2016.
- LIU, J. J.; STURROCK, R.; EKRAMODDOULLAH, A. K. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. **Plant cell reports**, v. 29, n. 5, p. 419-436, 2010.
- LIU, H.; WANG, X.; ZHANG, H.; YANG, Y.; GE, X.; SONG, F.A. Rice serine carboxypeptidase-like gene OsBISCPL1 is involved in regulation of defense responses against biotic and oxidative stress. **Gene**, v. 420, n. 1, p.57-65, 2008.
- MA, L.; HOUTERMAN, P. M.; GAWEHNS, F.; CAO, L.; SILLO, F.; RICHTER, H.; CLAVIJO-ORTIZ, M. J.; SCHMIDT, S. M.; BOEREN, S.; VERVOORT, J.; CORNELISSEN, B. J. C.; REP, M.; CORNELISSEN, B. J. The AVR2–SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. **New Phytologist**, v. 208, n. 2, p. 507-518, 2015.
- MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A. M.; CROSATTI, C.; GUERRA, D.; STANCA, A. M.; CATTIVELLI, L. Abiotic stress response in plants: when post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Science**, v. 174, n. 4, p. 420-431, 2008.
- MICHALSKA, A. M.; SOBKOWIAK, S.; FLIS, B.; ZIMNOCH-GUZOWSKA, E. Virulence and aggressiveness of *Phytophthora infestans* isolates collected in Poland from potato and tomato plants identified no strong specificity. **European Journal of Plant Pathology**, v. 144, n. 2, p. 325-336, 2016.
- MICHELMORE, R. W.; CHRISTOPOULOU, M.; CALDWELL, K. S. Impacts of

resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 291-319, 2013.

MILLAR, A. H.; WHELAN, J.; SOOLE, K. L.; DAY, D. A. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. **Annual review of plant biology**, v. 62, 79-104, 2011.

MUNDT, C.C. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 27, p. 446-455, 2014.

NAIR, R. A.; KIRAN, A. G.; SIVAKUMAR, K. C.; THOMAS, G. Molecular characterization of an oomycete-responsive PR-5 protein gene from *Zingiber zerumbet*. **Plant molecular biology reporter**, v. 28, n. 1, p.128-135, 2010.

NESVIZHSHKII, A. I.; KELLER, A.; KOLKER, E.; ABERSOLD, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646-4658, 2003.

NICOT, N.; HAUSMAN, J. F.; HOFFMANN, L.; EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **Journal of experimental botany**, v. 56, n. 421, p. 2907-2914, 2005.

NOWICKI, M.; KOZIK, E. U.; FOOLAD, M. R. Late blight of tomato. **Translational genomics for crop breeding**: John Wiley & Sons Ltd, p. 241-265, 2013.

NOWICKI, M.; FOOLAD, M. R.; NOWAKOWSKA, M.; KOZIK, E. U. Potato and Tomato Late Blight Caused by *Phytophthora infestans*: An Overview of Pathology and Resistance Breeding. **Plant Disease**, v. 96, n. 1, p. 4-17, 2012.

OHLSON, E. W.; FOOLAD, M. R. Genetic analysis of resistance to tomato late blight in *Solanum pimpinellifolium* accession PI 163245. **Plant Breeding**, v. 135, n. 3, p. 391-398, 2016.

OSMOND, R. I.; HRMOVA, M.; FONTAINE, F.; IMBERTY, A.; FINCHER, G. B. Binding interactions between barley thaumatin-like proteins and (1,3)- β -D-glucans. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 15, p. 4190-4199, 2001.

PAN, X.; ZHU, B., LUO, Y.; FU, D. Unraveling the protein network of tomato fruit in response to necrotrophic phytopathogenic *Rhizopus nigricans*. **PloS one**, v. 8, n. 9, e73034, 2013.

PANG, Z.; SRIVASTAVA, V.; LIU, X.; BULONE, V. Quantitative proteomics links metabolic pathways to specific developmental stages of the plant-pathogenic oomycete *Phytophthora capsici*. **Molecular plant pathology**, p. 1 – 13, 2016.

PETRE, B.; MAJOR, I.; ROUHIER, N.; DUPLESSIS, S. Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2011.

QI, D.; INNES, R. W. **Recent advances in plant NLR structure, function, localization, and signaling**. 2013.

SCHARTE, J.; SCHÖN, H.; WEIS, E. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. **Plant, Cell & Environment**, v. 28, n. 11, p. 1421-1435, 2005.

SHEN, S.; MATSUBAE, M.; TAKAO, T. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. **The Journal of Biochemistry**, v. 132, n. 4, p. 613-620, 2002.

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

SIMKO, I.; PIEPHO, H. P. The area under the disease progress stairs: calculation, advantage, and application. **Phytopathology**, v. 102, n. 4, p. 381-389, 2012.

SWARBRICK, P. J.; SCHULZE-LEFERT, P. A. U. L.; SCHOLENBERG, J. D. Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. **Plant, Cell & Environment**, v. 29, n. 6, p. 1061-1076, 2006.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D.; HUERTA-CEPAS, J.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; SANTOS, A.; TSAFOU, K. P.; KUHN, M.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; VON MERING, C. STRING v10: protein–pÜNAL, C. M.; STEINERT, M. Microbial peptidyl-prolyl cis/trans isomerases (PPIases): virulence factors and potential alternative drug targets. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 544-571, 2015.

THIMM, O.; BLÄSING, O.; GIBON, Y.; NAGEL, A.; MEYER, S.; KRÜGER, P.; SELBIG, J.; MULLER, L. A.; RHEE, S. Y.; STITT, M. Mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **The Plant Journal**, v. 37, n. 6, p. 914-939, 2004.

THOMPSON, C. E.; FERNANDES, C. L.; DE SOUZA, O. N.; SALZANO, F. M.; BONATTO, S. L.; FREITAS, L. B. Molecular modeling of pathogenesis-related proteins of family 5. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 44, n. 3, p. 385-394, 2006.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 11, p. 1305-1309, 2004.

van LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VITALE, A.; ROCCO, M.; ARENA, S.; GIUFFRIDA, F.; CASSANITI, C.; SCALONI, A.; LOMAGLIO, T.; GUARNACCIA, V.; POLIZZI, G.; MARRA, M.; LEONARDI, C. Tomato susceptibility to *Fusarium* crown and root rot: Effect of grafting combination and proteomic analysis of tolerance expression in the rootstock. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 83, p. 207-216, 2014.

WU, L.; HAN, Z.; WANG, S.; WANG, X.; SUN, A.; ZU, X.; CHEN, Y. Comparative proteomic analysis of the plant-virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. **Journal of proteomics**, v. 89, p. 124-140, 2013.

ZAFFAGNINI, M.; MICHELET, L.; SCIABOLINI, C.; DI GIACINTO, N.; MORISSE, S.; MARCHAND, C. H.; TROST, P.; FERMANI, S.; LEMAIRE, S. D. High-resolution crystal structure and redox properties of chloroplastic triosephosphate isomerase from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Molecular plant**, v. 7, n.1, p.101-120, 2014.

ZHANG, C.; LIU, L.; WANG, X.; VOSSEN, J.; LI, G.; LI, T.; ZHENG Z.; GAO, J.; GUO, Y.; VISSER, R. G. F.; LI, J.; BAI, Y.; DU, Y. The Ph-3 gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 127, n. 6, p. 1353-1364, 2014.

ZULUAGA, A. P.; VEGA-ARREGUÍN, J. C.; FEI, Z.; MATAS, A. J.; PATEV, S.; FRY, W. E.; ROSE, J. K. Analysis of the tomato leaf transcriptome during successive hemibiotrophic stages of a compatible interaction with the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular plant pathology**, v. 17, n.1, p. 42-54, 2016.