

LEANDRO LUIZ BORGES

**ANÁLISE DO PROTEOMA DO FEJJOEIRO EXPRESSO EM  
RESPOSTA À ANTRACNOSE E MANCHA ANGULAR**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012**

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

T

B732a  
2012

Borges, Leandro Luiz, 1984-

Análise do proteoma do feijoeiro expresso em resposta à  
antracnose e mancha angular / Leandro Luiz Borges. –  
Viçosa, MG, 2012.

xi, 94f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Feijão-comum - Melhoramento genético.
2. *Phaseolus vulgaris*. 3. Proteínas. 4. Eletroforese.
5. *Pseudocercospora griseola*. 6. Antracnose.
7. *Colletotrichum lindemuthianum*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 635.65233

LEANDRO LUIZ BORGES

**ANÁLISE DO PROTEOMA DO FEIJOEIRO EXPRESSO EM  
RESPOSTA À ANTRACNOSE E MANCHA ANGULAR**

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

APROVADA: 24 de julho de 2012.



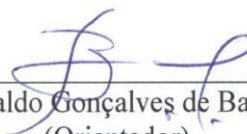
---

Klever Márcio Antunes Arruda



---

Humberto Josué de Oliveira Ramos  
(Coorientador)



---

Everaldo Gonçalves de Barros  
(Orientador)

*À Alzira Borges, minha mãe, pelo seu amor eterno  
e Fabiana, pelo seu carinho e companheirismo...*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por ser a luz que guia os meus caminhos e me deu forças para a conclusão deste trabalho com sucesso.

À minha mãe, Alzira Borges, que sempre me deu muito amor e não mediu esforços para que eu conseguisse chegar até o final dessa jornada vitorioso.

À minha namorada, Fabiana, que com seu amor e carinho me conquistou e sempre esteve ao meu lado em todos os momentos.

Ao professor Everaldo Gonçalves de Barros, pela orientação, ensinamentos, amizade, incentivo e exemplos para minha vida profissional.

Ao professor Humberto Ramos, por sua coorientação, paciência e auxílio na execução dos experimentos.

Ao professor Leandro Licursi de Oliveira pela coorientação e ensinamentos.

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

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

À Fernanda, que me ensinou a técnica de proteômica, e me ajudou em todas as etapas deste trabalho.

À Samila, minha estagiária, que em todos os momentos me auxiliou na condução dos experimentos.

À Edna e à Rita pela ajuda nos assuntos acadêmicos e burocráticos relativos à secretaria da Genética e Melhoramento.

Ao Klever, pela sua ajuda na elaboração deste experimento e participação na banca examinadora.

Ao Daniel e Newton, por aceitarem participar como membros suplentes da banca examinadora.

A todos os companheiros de laboratório: Josiane, Rafael, Arlindo, Mateus, Márcia Carvalho, Márcia Flores, Renato, Carla, Alexandre, Mária Fernanda, Lorêta, Josiê, Marcos, Bianca, Isabela, Pedro, Isadora, Luiz, Leonardo, Demerson, Bruno, Reginaldo e Gláucia, pelas conversas, apoio e ensinamentos.

Aos companheiros do Alojamento Pós Graduando 2211 por todos os momentos inesquecíveis em minha vida.

Aos companheiros de república, Tales, Nilson, Uéder, Rafael, Tiago, Leonardo, Pedro e Misael, por tornarem minha permanência em Viçosa durante minha pós graduação mais agradável.

À família de Fabiana que me acolheu em Viçosa e me apoiou em todos os momentos alegres e difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa, modelo de comprometimento com o ensino, pesquisa e extensão, que forneceu um ambiente favorável para minha qualificação profissional.

À Divisão de Assistência Estudantil (DAE) pela concessão do alojamento e alimentação durante minha graduação na UFV.

Aos professores e funcionários da UFV que além da formação acadêmica também me passaram muitos ensinamentos importantes da vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao GenMelhor, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao Núcleo de Análises de Biomoléculas (NUBIOMOL), pelo uso de suas facilidades.

À FINEP, CNPQ e FAPEMIG, pelo fornecimento de recursos financeiros para a aquisição dos equipamentos do NUBIOMOL.

Aos funcionários do NUBIOMOL, Edvaldo e Nívea, pela paciência, ensino e auxílio para a realização dos experimentos.

Ao Laboratório de Toxinologia-IOC-FIOCRUZ, pelo uso de suas facilidades.

Ao Dr. Jonas Perales, Henk, Richard, Ana Gisele, André, Monique, Viviane e a todos do Laboratório de Toxinologia-IOC-FIOCRUZ pelos ensinamentos e ajuda na conclusão deste trabalho.

A todos meus amigos e familiares que sempre acreditaram que eu seria um vencedor.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar ao fim desta batalha.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

## BIOGRAFIA

Leandro Luiz Borges, filho de Alzira Borges e Vicente de Paula Sousa, nasceu em 21 de fevereiro de 1984 em Divinópolis-MG. Concluiu o ensino fundamental em 1998 e ensino médio em 2001, na Escola Estadual José Manuel, em Araújos-MG.

Em março de 2004, iniciou o curso de graduação em Ciência e Tecnologia de Laticínios na Universidade Federal de Viçosa, tendo transferido para o curso de Ciências Biológicas no segundo semestre de 2006. Em janeiro de 2010 graduou-se em Ciências Biológicas na modalidade de Licenciatura e em julho de 2010 na modalidade Bacharelado.

Em agosto de 2010, iniciou o curso de Pós Graduação em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de dissertação para obtenção do título de *Magister Scientiae*, no dia 24 de julho de 2012.

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. Origem e domesticação do feijoeiro .....	3
2.2. Importância econômica e social do feijoeiro .....	4
2.3. Doenças na cultura do feijoeiro .....	4
2.4. Proteômica .....	6
2.4.1. Eletroforese bidimensional .....	7
2.4.2. Identificação de proteínas por espectrometria de massa .....	9
2.4.3. Busca de proteínas em bancos de dados .....	10
2.5. Proteômica do feijoeiro .....	11
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	14

## CAPÍTULO 1

### **PROTEOMA DIFERENCIAL DO FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO POR *Pseudocercospora griseola***

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
2.1. Material vegetal e inoculação .....	20
2.2. Extração de proteínas .....	20
2.3. Quantificação de proteínas .....	22
2.4. Eletroforese bidimensional (2-DE) .....	22
2.4.1. Reidratação das tiras de gel .....	22
2.4.2. Focalização isoeletrica (IEF) .....	22
2.4.3. Equilíbrio das tiras de gel .....	23
2.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	23
2.5. Coloração dos géis .....	23
2.6. Captura das imagens e análise da expressão .....	24
2.7. Tripsinização das amostras .....	24
2.8. Espectrometria de massas .....	25
2.9. Identificação das proteínas em bancos de dados .....	26
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27

<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	43
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	44

## CAPÍTULO 2

### PROTEOMA DIFERENCIAL DO FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO POR *Colletotrichum lindemuthianum*

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	49
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
2.1. Material vegetal e inoculação .....	50
2.2. Extração de proteínas .....	50
2.3. Quantificação de proteínas .....	52
2.4. Eletroforese bidimensional (2-DE) .....	52
2.4.1. Reidratação das tiras de gel .....	52
2.4.2. Focalização isoeletrica (IEF) .....	52
2.4.3. Equilíbrio das tiras de gel .....	53
2.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	53
2.5. Coloração dos géis.....	53
2.6. Captura das imagens e análise da expressão .....	54
2.7. Tripsinização das amostras.....	54
2.8. Espectrometria de massas.....	55
2.9. Identificação das proteínas em bancos de dados .....	56
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	87
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	88

## RESUMO

BORGES, Leandro Luiz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Análise do proteoma do feijoeiro expresso em resposta à antracnose e mancha angular.** Orientador: Everaldo Gonçalves de Barros. Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Leandro Licursi de Oliveira e Maurílio Alves Moreira.

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos principais componentes da dieta do brasileiro além de ser uma importante fonte primária de proteína e ferro. O Brasil é o maior produtor dessa leguminosa. Um dos fatores que limitam a produtividade brasileira é o grande número de doenças. Dentre as doenças fúngicas da parte aérea destacam-se a mancha angular causada por *Pseudocercospora griseola* e a antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum*. Essas doenças podem causar perdas superiores a 70% dependendo das condições climáticas, suscetibilidade da cultivar e patogenicidade dos isolados. A compreensão de como as plantas respondem ao ataque de patógenos é de fundamental importância para o desenvolvimento de cultivares resistentes que possam garantir a sustentabilidade da produção agrícola. Com este trabalho objetivou-se identificar proteínas diferencialmente expressas pelo genótipo de feijoeiro comum AND 277 em resposta a *P. griseola* e *C. lindemuthianum*. Foram realizados dois experimentos independentes. No primeiro, foram avaliadas amostras de folhas coletadas 12, 24 e 48 horas após a inoculação (h.a.i.) da raça 31.31 de *P. griseola*. No segundo, foram avaliadas amostras de folhas coletadas 12 e 48 h.a.i. da raça 73 de *C. lindemuthianum*. Amostras de proteínas foram extraídas pelo método fenol-SDS e separadas por eletroforese bidimensional. Proteínas diferencialmente expressas entre plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno foram excisadas dos géis, clivadas com tripsina e analisadas por espectrometria de massa. No primeiro experimento, foram identificadas 13 proteínas diferencialmente expressas, sendo que cinco foram detectadas somente nas plantas inoculadas, três apresentaram aumento de expressão e cinco tiveram redução da expressão após inoculação. Essas proteínas estão associadas a processos de defesa, síntese de hormônios, fotossíntese, metabolismo de espécies reativas de oxigênio, respiração celular e síntese de porfirinas. No segundo experimento, foram identificadas 35 proteínas diferencialmente expressas, sendo que 13 estavam presentes somente nas plantas inoculadas e seis somente nas plantas não inoculadas, 10 proteínas tiveram aumento de expressão e seis tiveram redução após a inoculação. Essas proteínas participam de processos de detoxificação celular, defesa contra patógenos, metabolismo de espécies reativas de oxigênio, fotossíntese, respiração celular, biossíntese de proteínas e sinalização. Esses resultados contribuem para um melhor

entendimento do mecanismo de resposta de defesa do feijoeiro comum a esses patógenos. As proteínas identificadas e os genes que as codificam (genes candidatos) poderão auxiliar como ferramentas em programas de melhoramento genético no desenvolvimento de plantas resistentes.

## ABSTRACT

BORGES, Leandro Luiz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2012. **Analysis of the common bean proteome expressed in response to anthracnose and angular leaf spot.** Adviser: Everaldo Gonçalves de Barros. Co-advisers: Humberto Josué de Oliveira Ramos, Leandro Licursi de Oliveira and Maurílio Alves Moreira.

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a major component of the diet in Brazil and an important primary source of protein and iron. Brazil is the largest common bean producer and the yield of this crop in the country could be higher if it were not, among other reasons, for the numerous diseases affecting this crop. Among the fungal diseases affecting the aerial portion of the plant are the angular leaf spot, caused by *Pseudocercospora griseola*, and anthracnose, caused by *Colletotrichum lindemuthianum*. These diseases can cause losses of more than 70% depending on weather conditions, degree of resistance of the cultivar and pathogenicity of the fungal isolates. Understanding how plants respond to pathogen attack is of fundamental importance for the development of resistant cultivars that can ensure the sustainability of agricultural production. This work aimed to identify proteins differentially expressed by the common bean genotype AND 277 in response to *P. griseola* and *C. lindemuthianum*. Two independent experiments were conducted. In the first one, leaf samples were collected and evaluated 12, 24 and 48 hours after inoculation (h.a.i.) with *P. griseola* race 31.31. In the second one, leaf samples were collected and evaluated 12 and 48 h.a.i. of *C. lindemuthianum* race 73 of. Protein samples were extracted by the phenol-SDS method and separated by two-dimensional electrophoresis. Proteins differentially expressed between inoculated and non-inoculated plants were excised from the gels, cleaved with trypsin and analyzed by mass spectrometry. In the first experiment, 13 differentially expressed proteins were identified, five were detected only in inoculated plants, three showed increased expression and five had reduced expression upon inoculation. These proteins are associated with the defense process, hormone synthesis, photosynthesis, metabolism of reactive oxygen species, cellular respiration and porphyrin synthesis. In the second experiment, 35 differentially expressed proteins were identified, 13 of which were present only in inoculated plants and six only in non-inoculated plants, 10 had increased expression and six were reduced upon inoculation. These proteins participate in cellular detoxification processes, defense against pathogens, metabolism of reactive oxygen species, photosynthesis, cellular respiration, protein biosynthesis and signaling. These results contribute for a better understanding of the defense response of common bean to these pathogens. The identified proteins and

their corresponding genes (candidate genes) can be used as tools breeding programs to develop resistant plants.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os feijões (*Phaseolus* spp. L.) são um dos mais antigos cultivos do novo mundo. Junto com o milho e a mandioca, eles têm sido alimento básico em baixas a médias altitudes das Américas por milênios. Os feijões são culturas extremamente diversas quanto a métodos e ambientes de cultivo, usos e variabilidade morfológica. Eles são encontrados desde o nível do mar até 3.000 m de altitude, são cultivados como monoculturas, em associação, ou rotação. Feijões são consumidos como grãos maduros ou imaturos, bem como na forma de vagens ou folhas (BROUGHTON et al., 2003).

A produção mundial de feijão (*Phaseolus* spp. L.) excede 23 milhões de toneladas, das quais sete milhões são produzidos na América Latina e África. O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, seguido do México. Grande parte da produção do feijão na América Latina ocorre em pequenas propriedades, muitas vezes em solos com alto declive e baixa fertilidade. No caso do Brasil, cerca de um terço da produção vem de propriedades com menos de dez hectares (ha) de extensão (BROUGHTON et al., 2003).

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um excelente alimento, fornecendo nutrientes essenciais ao ser humano, como proteínas, ferro, cálcio, magnésio, zinco, vitaminas (principalmente do complexo B), carboidratos e fibras. O feijão representa a principal fonte de proteínas das populações de baixa renda constituindo um produto de destacada importância nutricional, econômica e social, além de ser um dos alimentos mais tradicionais na dieta alimentar do brasileiro (MESQUITA et al., 2007).

A área plantada brasileira com o feijoeiro comum na safra 2011/2012, segundo estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), será de 3,8 milhões de hectares, com uma produção de 3,4 milhões de toneladas e uma produtividade média de 894 Kg/ha. O estado brasileiro com maior produção é o Paraná, cerca de 640 mil toneladas/ano; o segundo maior produtor é o estado de Minas Gerais, com cerca de 572 mil toneladas/ano (CONAB, 2012).

No Brasil, apesar da produtividade média do feijoeiro comum ter crescido nos últimos anos, ela ainda é considerada baixa em relação ao potencial de produtividade da cultura. Vários fatores contribuem para esse desempenho, dentre eles os estresses bióticos e abióticos. Dentre os estresses bióticos, as doenças causadas por fungos merecem destaque especial. A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. e a mancha angular, causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Braun e Crous são doenças importantes na cultura do feijoeiro que causam grandes perdas anuais (SILVA et al., 2006).

O manejo integrado é preconizado como a estratégia mais adequada para controle de doenças. Nesse sistema integrado, o uso de cultivares resistentes é considerada uma alternativa prática e econômica. Todavia, no caso da antracnose e mancha angular, a criação de cultivares resistentes é dificultada pela grande capacidade de variação patogênica dos seus agentes causais, o que resulta no aparecimento de grande número de raças fisiológicas ou patótipos (RAVA, 1994).

A genômica e a proteômica podem fornecer importantes informações e ferramentas para um maior entendimento da relação planta-patógeno e para o desenvolvimento de cultivares resistentes (GONZALEZ-FERNANDEZ & JORRIN-NOVO, 2011).

A proteômica oferece a possibilidade de estudar simultaneamente o conjunto de proteínas presentes numa unidade biológica (de uma organela a um ecossistema), juntamente com sua catalogação (proteômica descritiva), sua abundância (proteômica quantitativa), variações genótipo dependentes (proteômica de populações), implicações no desenvolvimento e respostas às mudanças ambientais (proteômica diferencial ou comparativa), modificações pós traducionais ou interação com outras entidades moleculares (interactômica) (GONZALEZ-FERNANDEZ & JORRIN-NOVO, 2011).

A eletroforese bidimensional (2-DE) combinada à espectrometria de massas (MS) constituem ferramentas fundamentais no estudo do proteoma. Apesar da existência de alternativas promissoras ou tecnologias complementares (por exemplo: tecnologias multidimensionais de identificação de proteínas, rotulagem por isótopos estáveis, matrizes de proteínas), a 2-DE é ainda a metodologia mais utilizada para estudar o perfil quantitativo de grandes conjuntos de complexos como o lisado de células inteiras (GÖRG et al., 2004).

As interações planta-patógeno ocorrem largamente por meio de proteínas, sendo assim, a proteômica é uma ferramenta ideal para o estudo dessa interação (RAMPITSCH & BYKOVA, 2012).

Dado à escassez de trabalhos envolvendo a proteômica do feijoeiro comum, a realização de estudos envolvendo a interação planta-patógeno torna-se de grande importância para o entendimento e melhoramento dessa cultura. A identificação de proteínas expressas pelo feijoeiro em resposta à antracnose e mancha angular poderá contribuir substancialmente para o entendimento da biologia dessa interação. As proteínas diferencialmente expressas poderão ser utilizadas como marcadores biológicos para a resposta a essas doenças, ou ainda, possibilitar a identificação de genes que possam ser geneticamente manipulados para o desenvolvimento de plantas resistentes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Origem e domesticação do feijoeiro

Os ancestrais imediatos do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), que é uma espécie diplóide ( $2n=2x=22$ ), são populações selvagens distribuídas do norte do México ao norte da Argentina. A organização atual da diversidade genética no *pool* gênico cultivado do feijoeiro comum é resultado da evolução de condições naturais (anteriores à domesticação) e de cultivo. Antes da domesticação, *P. vulgaris* selvagens já haviam divergido em dois *pools* gênicos principais, distribuídos em duas regiões geográficas distintas localizadas nos Andes e na América Central (GEPTS, 1998).

Singh (1991) descreveu três raças para cada *pool* gênico, sendo as raças Chile, Nueva Granada e Peru, pertencentes ao *pool* gênico Andino, e as raças Durango, Jalisco e Mesoamericano, ao *pool* gênico da América Central. Esses dois *pools* gênicos selvagens podem ser distinguidos morfológicamente (GEPTS & DEBOUCK, 1991) e molecularmente (BECERRA VELÁSQUEZ & GEPTS, 1994). Os dois *pools* gênicos também possuem isolamento reprodutivo, que leva a geração F1 à letalidade em alguns cruzamentos (KOINANGE & GEPTS, 1992). A existência desse isolamento reprodutivo e o nível de divergência molecular entre eles indicam que esses dois *pools* gênicos podem realmente representar duas subespécies (GEPTS, 1998).

No Brasil, a falta de estudos com amostras arqueológicas dificulta a reconstituição da história regional desta espécie, como, por exemplo, quais tipos foram introduzidos, quando, por onde, por quais grupos humanos, entre outros questionamentos (FREITAS, 2006).

Na tentativa de determinar qual foi a origem do feijoeiro no Brasil, Freitas (2006) coletou amostras arqueológicas do feijoeiro numa caverna em Januária-MG, em um local onde supostamente houve ocupação humana há 10.000 anos atrás (PROUS et al., 1984). Amostras modernas e arqueológicas tiveram seu DNA extraído e o gene codificador da proteína faseolina foi amplificado e sequenciado. Os resultados evidenciaram que a amostra encontrada em Januária está mais próxima às variedades de feijão encontradas no norte da América do Sul e México. Além disso, os dados indicam que deve ter ocorrido um único evento de domesticação, provavelmente entre o norte da América do Sul e o México.

## **2.2. Importância econômica e social do feijoeiro**

O feijão é uma das principais culturas produzidas no Brasil e no mundo. Sua importância extrapola o aspecto econômico, dado à sua relevância enquanto fator de segurança alimentar e nutricional e sua importância cultural na culinária de diversos países e culturas. O feijão é, historicamente, um dos principais alimentos consumidos no Brasil e no mundo, sobretudo entre os extratos sociais menos favorecidos (POSSE et al., 2010).

Cultivado por pequenos e grandes produtores, em diversificados sistemas de produção e em todas as regiões brasileiras, o feijoeiro comum reveste-se de grande importância econômica e social. Dependendo da cultivar e da temperatura ambiente, pode apresentar ciclos variando de 65 a 100 dias, o que o torna uma cultura apropriada para compor, desde sistemas agrícolas intensivos irrigados, altamente tecnificados, até aqueles com baixo uso tecnológico, principalmente de subsistência (AIDAR, 2003).

Características técnicas, agronômicas e culturais credenciam a cultura do feijão como excelente alternativa de exploração agrícola para pequenas propriedades. No Brasil, dados do censo agropecuário de 2006 atribuem à agricultura familiar quase 70% da produção nacional de feijão, o que reforça sua vocação para produção em pequena escala (POSSE et al., 2010).

No ano de 2012, a área total plantada com feijão no Brasil será de 3,6 milhões de hectares, segundo estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o que representa uma redução de 1% em relação a 2011. A estimativa de produção total de feijão é de 3,5 milhões de toneladas, representando uma redução de 0,8% em relação a 2011. A produtividade esperada para o ano de 2012 é de 960 Kg/ha, superior em 0,2% em relação a 2011 (IBGE, 2012).

## **2.3. Doenças na cultura do feijoeiro**

O feijoeiro é uma cultura sujeita ao ataque de vários patógenos, sendo essa uma das principais causas da sua baixa produtividade em território brasileiro. Vieira (1988) cita mais de 45 doenças, de maior ou menor importância, causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus. Em geral, as doenças mais importantes, no Brasil, são: a mancha angular, a antracnose, a ferrugem, o mofo branco, a murcha de fusarium, o mosaico dourado e o crestamento bacteriano comum. As demais, apesar da menor importância, podem causar danos severos em condições específicas (VIEIRA, 1988).

A mancha angular e a antracnose merecem destaque entre as doenças fúngicas foliares, porque os fungos causadores dessas doenças apresentam um grande número de formas patogênicas especializadas, o que dificulta a obtenção de cultivares resistentes (ARRUDA, 2009).

A mancha angular do feijoeiro é causada pelo fungo *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Braun e Crous (BRAUN & CROUS, 2006). Segundo Singh e Schwartz (2010), esse patógeno possui alta variabilidade e tem coevoluído com o feijoeiro de tal modo que há distintas raças Andinas e Meso Americanas do fungo. Essa doença era considerada de pouca importância econômica no estado de Minas Gerais até o final da década de 1980. Segundo Vieira (1988), a doença não causava danos apreciáveis porque só aparecia no final do ciclo da cultura. Entretanto, atualmente a mancha angular tem sido apontada como a mais importante doença da parte aérea do feijoeiro, uma vez que aparece logo no início do ciclo da cultura, principalmente nos plantios da seca, quando temperaturas amenas e a ocorrência de orvalho são observadas nas regiões produtoras (PAULA JR. & ZAMBOLIM, 2006).

Sartorato e Alzate-Marin (2004) mostraram, por meio de um levantamento feito na literatura sobre a variabilidade patogênica do fungo *P. griseola*, que no período de 1996 a 2002 foram identificadas 51 raças no Brasil. Ainda, segundo esse levantamento, as raças mais frequentes e amplamente distribuídas no território nacional foram: 31.39, 63.23, 63.31, 63.39, 63.47, 63.55 e 63.63. Todas as raças citadas foram classificadas pela série diferenciadora proposta por Pastor-Corrales e Jara (1995). Outro levantamento feito na literatura por Arruda (2009) em trabalhos não contemplados pelo levantamento de Sartorato e Alzate-Marin (2004) foi verificada a presença de outras nove raças do patógeno. Sendo assim, os levantamentos feitos por Sartorato e Alzate-Marin (2004) e Arruda (2009) totalizam 60 raças distintas do patógeno.

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Scrib., é uma das doenças mais importantes do feijoeiro em Minas Gerais, particularmente nas regiões sul e Zona da Mata, onde ocorrem com frequência altas umidades e temperaturas moderadas. A doença não chega a ser importante em regiões mais secas e quentes, como o norte, o noroeste e o leste do estado (PAULA JR. & ZAMBOLIM, 2006).

A medida mais adequada para o controle da doença é a utilização de variedades resistentes. No entanto, a alta variabilidade do agente causal, expressa por um grande número de raças, dificulta a obtenção de variedades com resistência durável e força os

produtores a proteger suas lavouras com fungicidas, algumas vezes de maneira indiscriminada (DI PIERO & GARDA, 2008).

Alzate-Marin e Sartorato (2004), em levantamento feito na literatura sobre a variabilidade patogênica do fungo *C. lindemuthianum*, mostraram que no período de 1994 a 2002 foram identificadas 50 raças desse fungo no Brasil. As raças 65, 73, 81 e 87 foram as mais frequentes e amplamente distribuídas no país (ARRUDA, 2009). A série diferenciadora desenvolvida por Pastor-Corrales (1992) foi utilizada para classificar todas as raças. Arruda (2009) realizou outro levantamento na literatura em trabalhos não contemplados no estudo feito por Alzate-Marin e Sartorato (2004) e verificou a presença de outras nove raças de *C. lindemuthianum*. Com isso, outras nove raças foram acrescentadas ao levantamento de Alzate-Marin e Sartorato (2004), totalizando 59 raças distintas.

#### **2.4. Proteômica**

Proteômica é o estudo do proteoma, o complemento proteico do genoma. O termo “proteômica” e “proteoma” foram propostos por Marc Wilkins e colaboradores no início da década de 1990 e espelhavam os termos “genômica” e “genoma”, que descrevem a coleção completa de genes em um organismo (LIEBLER, 2002).

Muitas informações não podem ser obtidas somente pelo estudo dos genes uma vez que são as proteínas, não os genes, as responsáveis diretas pelo fenótipo das células e dos organismos. (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

Com o uso da proteômica, os pesquisadores desejam responder as perguntas: como, onde, quando e quais são as centenas de milhares de proteínas individuais produzidas em um organismo vivo. Como essas proteínas interagem entre si para comandar o programa de desenvolvimento e de resposta desse organismo ao seu ambiente de vida (GONZALEZ-FERNANDEZ & JORRIN-NOVO, 2011).

A proteômica permite conhecer o produto final da expressão de um gene, suas propriedades químicas e locais de atuação na célula, o que é mais difícil prever a partir de sequências de DNA devido às etapas de processamento que ocorrem após a transcrição ou mesmo, tradução (glicosilação, fosforilação, acetilação, etc.) que modulam a atividade de uma proteína. Por outro lado, um produto gênico muitas vezes não atua isoladamente, estando com frequência envolvido em interações com os produtos de outros genes para a formação de complexos moleculares funcionais. Desta maneira, para os estudos de expressão gênica fazem-se necessárias estratégias que desvendem a regulação da funcionalidade das proteínas e sua influência no metabolismo

da planta, permitindo esclarecer se a regulação de um determinado gene ocorre durante as etapas de transcrição e tradução (VAN WIJK, 2001).

A proteômica tem se tornado uma ferramenta relevante na pesquisa de diversos patossistemas. A proteômica pretende identificar os produtos gênicos com papéis-chaves na patogenicidade e virulência. Esses estudos podem fornecer informações úteis à pesquisa ao identificar quais são as proteínas alvo para o desenvolvimento de agroquímicos, que podem abrir novos caminhos para a diagnose de doenças e proteção das lavouras contra os patógenos (GONZALEZ-FERNANDEZ & JORRIN-NOVO, 2011).

#### **2.4.1. Eletroforese bidimensional**

A eletroforese de proteínas tem suas origens na década de 1970 que, naquela época, já dispunha de duas formas de separação. A técnica de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*) desenvolvida por Laemmli (1970) e a focalização isoeletrica, descrita por Gronow e Griffith (1971). A primeira tentativa de unir as duas técnicas foi feita por MacGillivray e Rickwood (1974), que não obtiveram sucesso.

No ano seguinte, O'Farrel (1975) obteve sucesso na união das duas técnicas identificando centenas de *spots* (pontos proteicos) distintos. A nova técnica desenvolvida ficou conhecida como eletroforese bidimensional (2-DE). No mesmo ano, Klose (1975) também obteve resultados semelhantes aos de O'Farrel.

Atualmente, a 2-DE é realizada em tiras de gradiente de pH imobilizado (IPG) o que tem revolucionado essa técnica (GORG et al., 1988). Essas tiras possuem muitas vantagens em relação aos anfólitos carreadores descritos por O'Farrel (1975), como: reprodutibilidade dos géis, fácil manuseio, resolução e separação de proteínas muito ácidas ou muito básicas (GÖRG et al., 2004).

Apesar da limitação de trabalho em larga escala, comparada à LC-MS (*liquid chromatography-mass spectrometry*), a 2-DE é capaz de resolver um grande número de *spots*, entre 500 e 2.500. Além disso, em um laboratório equipado e com experiência, géis 2-DE são facilmente manuseados e com o custo acessível o suficiente para a realização de análises rotineiras. A 2-DE é a escolha preferida para muitos estudos comparativos (VALLEDOR & JORRÍN, 2011).

O conceito básico de 2-DE sugere um processo de dois passos, como comentado anteriormente. Porém, o processo inteiro pode ser dividido em cinco passos conforme mostrado na Figura 1 a seguir.

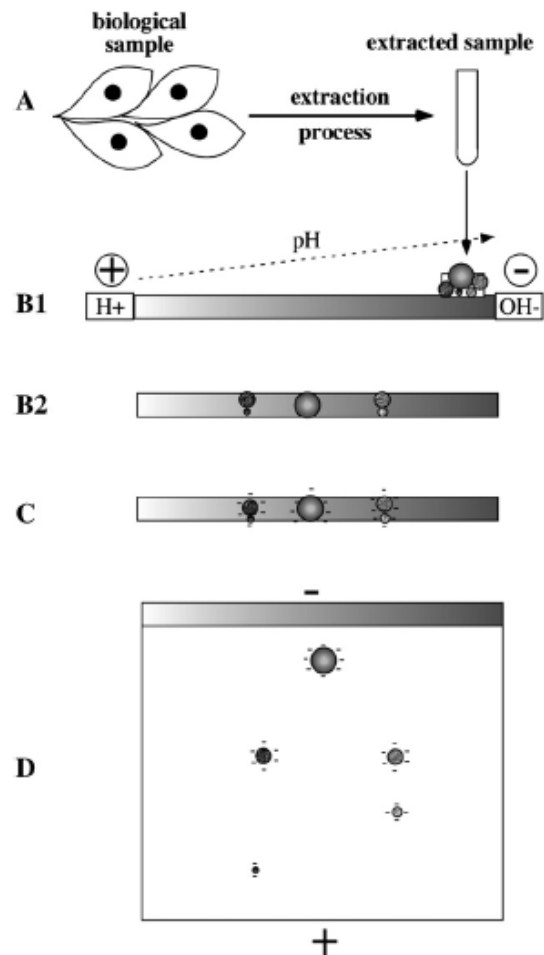


Figura 1: Esquema do princípio da eletroforese bidimensional detalhado em etapas. A) Extração das proteínas do material biológico. B1) Adição das proteínas nas tiras IPG, o gradiente de pH está orientado com a porção acídica no anôdo e a porção básica no catodo. B2) Após a IEF a proteína fica imobilizada num gradiente de pH correspondente ao seu PI; C) A tira IPG é equilibrada com um tampão específico que deixa as proteínas negativamente carregadas; D) As proteínas são separadas de acordo com sua massa molecular. Fonte: Rabilloud e Lelong (2011).

Dependendo do tamanho do gel e do gradiente de pH utilizado, a 2-DE pode resolver mais de 5.000 proteínas simultaneamente (~2.000 rotineiramente), e pode detectar quantidades inferiores a um ng de proteína por *spot*. Além disso, a 2-DE também proporciona um mapa de proteínas intactas, que pode refletir em mudanças nos níveis de expressão dessas proteínas, isoformas ou mudanças pós traducionais (GÖRG et al., 2004).

## 2.4.2. Identificação de proteínas por espectrometria de massa

Após a separação das proteínas por 2-DE é necessário a identificação dessas proteínas. A espectrometria de massas (MS) tem se tornado o método de escolha para a análise de amostras complexas de proteínas (AEBERSOLD & MANN, 2003). Isto se deve principalmente pela sensibilidade do método, baixas quantidades exigidas (fentomoles a atomoles) e o bom rendimento das amostras (GÖRG et al., 2004). Além disso, a espectrometria de massas não exige a purificação prévia das proteínas ou peptídeos por cromatografia líquida e não apresenta problemas na identificação de proteínas com extremidades bloqueadas ou modificadas, como no caso do sequenciamento de Edman (STEEN & MANN, 2004).

Em linhas gerais, a MS é uma técnica capaz de determinar a relação entre massa e carga ( $m/z$ ) de espécies ionizadas em fase gasosa. Um espectrômetro de massas é um instrumento constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. As fontes de ionização empregadas em MS aplicada à análise proteômica são *Electrospray* (ESI) e *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) tendo a função de ionizar (de maneira suave, preservando assim a estrutura polipeptídica) e transferir as espécies a serem analisadas para a fase gasosa. Os analisadores de massas, como o próprio nome indica, têm como função básica separar os íons formados de acordo com suas relações  $m/z$ . Diversos analisadores de massas, tais como, quadrupolos, *ion-traps* (tridimensionais e lineares), *time-of-flight* (TOF), *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR), *orbitrap*, entre outros, são comercialmente disponíveis e cada um possui aspectos positivos e negativos, de acordo com o experimento planejado e o resultado experimental requerido (CANTÚ et al., 2008).

Nos últimos anos grandes avanços foram trazidos pelos métodos de ionização branda, como a ESI (FENN et al., 1989) e MALDI (TANAKA, 1988). Pela sua simplicidade, excelente acurácia na determinação da massa, alta resolução e sensibilidade, MALDI-TOF é ainda muito usado para identificar proteínas pelo mapeamento de peptídeos conhecido como *peptide mass fingerprint* (PMF). Neste método, as proteínas são identificadas confrontando-se uma lista de massas de peptídeos obtidos experimentalmente, com uma lista de todos os peptídeos calculados pela digestão hipotética de todas as proteínas de um banco de dados (AEBERSOLD & MANN, 2003).

O uso do PMF é muito eficiente para identificar proteínas de espécies cujo genoma é relativamente pequeno, completamente sequenciado e bem anotado, mas não

é adequado para espécies cujo genoma ainda não está completo. Um segundo problema refere-se às mudanças pós traducionais nas proteínas que pode dificultar a limitar a identificação desse peptídeo modificado. Um terceiro problema, é que em um mesmo *spot* pode haver mais de uma proteína, comprometendo a análise (GÖRG et al., 2004).

Segundo Cantú et al. (2008), nesses casos é essencial obter a informação da sequência de aminoácidos. Nesse processo, os peptídeos detectados durante o PMF são submetidos à fragmentação por colisão com um gás inerte (hélio, argônio, nitrogênio), processo conhecido como *collision induced dissociation* (CID). Outra possibilidade de fragmentação dos peptídeos é pelo método *post-source decay* (PSD).

Na espectrometria de massas com ionização por dessorção a laser e análise por tempo de voo (MALDI-TOF), uma grande fração de íons do analito sofre deterioração durante o voo após o desligamento da fonte de laser, processo conhecido como *post-source decay* (PSD). Por meio de um *reflectron* de dois estágios, o espectro obtido de peptídeos de tamanho médio (até 2.800 Da) é rico em informações de sequência, apesar do padrão de clivagem ser diferente daquele obtido por dissociação induzida por colisão (CID). O mecanismo de ativação parece ser determinado por eventos de colisão entre os íons e as moléculas neutras no campo de aceleração. Essa técnica de sequenciamento ficou conhecida como PSD, e só pode ser usada em equipamentos do tipo MALDI-TOF (KAUFMANN et al., 1993). MALDI-PSD tem sido amplamente usado principalmente pela sua alta sensibilidade para quantidades de amostra entre 30-100 fmol, alta tolerância quanto a impurezas e ausência de homogeneidade nas amostras (SPENGLER, 1997).

O espectro obtido da fragmentação dos peptídeos é chamado de MS/MS, ou espectro de fragmentação. Ao final, os resultados de PMF (também chamado de MS1) e MS/MS (também chamado de MS2) são usados para “localizar” as proteínas nos bancos de dados. Os *softwares* mais conhecidos e comumente empregados para essa busca são o Mascot (PERKINS et al., 1999) e o Sequest (ENG et al., 1994).

### **2.4.3. Busca de proteínas em bancos de dados**

Os *softwares* desenvolvidos para busca de proteínas em bancos de dados com o uso de espectros de PMF ou MS/MS funcionam de uma maneira similar. As massas dos peptídeos obtidos experimentalmente são comparadas com as massas teóricas dos peptídeos derivados da digestão enzimática *in silico* das proteínas de um banco de dados específico (análise de PMF). Em seguida, realiza-se a análise MS/MS, na qual o subconjunto de peptídeos teóricos com massas similares ao do banco de dados (dentro

de um limite de massa tolerado pelo usuário) são posteriormente fragmentados e o espectro obtido também é comparado com os espectros teóricos dos peptídeos do banco de dados que sofreram fragmentação *in silico* (WEATHERLY et al., 2005).

No *software* Mascot a busca pela proteína nos bancos de dados, numa primeira etapa, baseia-se no cálculo da massa de fragmentos teoricamente preditos para todos os peptídeos de um banco de dados. Os valores de  $m/z$  dos fragmentos preditos são comparados com os fragmentos experimentais sendo que, primeiramente, a comparação se inicia com base nos íons  $-b$  e  $-y$  mais intensos. A probabilidade de o valor de  $m/z$  de um fragmento teoricamente obtido coincidir, de maneira randômica, com o valor de  $m/z$  de um fragmento obtido experimentalmente é calculada e expressa como sendo o negativo do logaritmo desse número (*score*). Assim, quanto maior for o valor obtido, menor é a probabilidade de que este resultado seja fruto de uma "coincidência". Esse *software* fornece para cada busca submetida um valor limite (dependendo das condições usadas para a busca) a partir do qual o valor obtido indica que a determinação possui probabilidade inferior a 5% de ser um evento randômico (CANTÚ et al., 2008).

O modelo de probabilidade usado pelo Mascot é baseado no algoritmo MOWSE (PAPPIN et al., 1993). O Mascot calcula a probabilidade da massa de cada peptídeo da amostra, que tem um correspondente no banco de dados, ser um evento randômico, o que indica a significância estatística para o espectro de MS/MS. Após agrupar os peptídeos em proteínas, o MASCOT combina os *scores* individuais e mostra o *score* acumulado para a proteína (WEATHERLY et al., 2005).

O Mascot também pode usar algumas observações empíricas sobre a intensidade dos fragmentos e a continuidade da série de íons. A descrição exata de como o processo é realizado não está disponível na literatura e, portanto, o algoritmo não pode ser descrito em detalhes. Mesmo assim, o MASCOT é um dos programas de pesquisa em bancos de dados mais amplamente utilizados (SADYGOV et al., 2004).

## **2.5. Proteômica do feijoeiro**

Os trabalhos de proteômica do feijoeiro estão na sua infância e poucas publicações são encontradas na literatura a esse respeito. Marsolais et al. (2010) analisaram géis bidimensionais de um genótipo selvagem de feijoeiro (SARC1) e outro genótipo mutante (SMARC 1N-PN1). No genótipo mutante ocorre um grande aumento de proteínas contendo aminoácidos sulfurados, o que desperta o interesse para o seu uso em programas de melhoramento para o aumento da qualidade proteica do grão. As proteínas da semente foram separadas por 2-DE e identificadas por LC-MS/MS. Foi

verificado que o genótipo mutante apresentou ausência de faseolina, fitohemaglutinina e arcelina; e o genótipo selvagem apresentou uma única isoforma de faseolina (tipo  $\alpha$ ), seis isoformas de arcelina e uma isoforma de fitohemaglutinina. No genótipo mutante, a deficiência das principais proteínas de reserva foi compensada com o aumento da quantidade de lectinas residuais, particularmente a subunidade  $\beta$  do inibidor de  $\alpha$ -amilase (aumento de 20 vezes no total de peptídeos), proteínas semelhantes ao inibidor de  $\alpha$ -amilase (56 vezes), manose lectina FRIL (80 vezes) e fitohemaglutinina leucoaglutinante. Os autores concluíram que as mutações causadoras da redução das principais proteínas de reserva tiveram um efeito pleiotrópico, levando a um aumento nos níveis de aminoácidos sulfurados, mostrando a potencialidade do uso desse genótipo em programas de melhoramento para melhoria da qualidade nutricional do grão de feijão.

De La Fuente et al. (2011) compararam três metodologias de extração de proteínas do grão do feijoeiro comum. Os métodos utilizados eram a extração feita com TCA-acetona, fenol-SDS e um kit comercial. Para demonstrar a qualidade dos géis 2-DE, os autores fizeram uma amostragem de 50 *spots* e identificaram essas proteínas por espectrometria de massas. Cada método de extração forneceu um perfil diferente do proteoma da semente e as proteínas identificadas foram agrupadas em categorias funcionais. As extrações feitas com ácido tricloroacético (TCA) e acetona e o kit comercial extraíram grandes quantidades de proteínas de reserva e defesa, enquanto que o método baseado na extração com fenol foi mais eficiente em extrair proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos. Diferenças marcantes também foram encontradas quanto à capacidade de extração de proteínas glicosiladas das metodologias de TCA-acetona e o kit comercial em relação à metodologia baseada na extração com fenol. No entanto, o método do fenol foi mais eficiente em extrair proteínas mais ácidas e com menor peso molecular.

Um dos primeiros trabalhos de proteômica relacionados às doenças do feijoeiro foi desenvolvido por Cooper et al. (2006). Neste trabalho, os autores estudaram as proteínas expressas por uredósporos assexuados do fungo causador da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces appendiculatus*). Para tal fim, a tecnologia de identificação multidimensional de proteínas (MudPIT) foi utilizada, produzindo espectros MS/MS no equipamento 2-D *nanoflow* LC-MS/MS. Os resultados mostraram a presença de vários grupos de proteínas homólogas nos uredósporos. Por exemplo, foram encontradas 77 proteínas relacionadas ao choque térmico, 19 proteínas homólogas de actina, 10  $\beta$ -tubulinas, muitos fatores de alongação da tradução dentre outras proteínas envolvidas

principalmente na síntese proteica. A presença de muitas proteínas envolvidas na tradução e de constituintes do citoesqueleto está relacionada principalmente ao processo de infecção dos uredósporos que formam um tubo germinativo e um apressório durante a colonização do hospedeiro.

Em outro trabalho, Cooper et al. (2007) objetivaram identificar proteínas expressas pelos uredósporos de *U. appendiculatus* durante a germinação e seu acúmulo comparado com uredósporos em estado inativo. Os esporos em processo de germinação tiveram suas proteínas extraídas com TCA-acetona e analisados num equipamento LC-MS/MS. No total foram encontradas 461 proteínas, das quais 240 foram identificadas de uma biblioteca de cDNA também preparada no trabalho. As proteínas identificadas estavam envolvidas na glicólise, metabolismo da acetil Co-A, ciclo do ácido cítrico, transporte de elétrons, subunidades da ATPase, translocação ADP:ATP e gliconeogênese. Em geral, essas proteínas estão envolvidas em processos de produção de energia e ciclo celular. Essas mudanças são indicativas da transição metabólica da dormência para germinação e são apoiados por modelos citológicos e de desenvolvimento que estudam o progresso da germinação.

Lee et al. (2009) realizaram um trabalho para identificar quantitativamente as proteínas expressas pelo feijoeiro inoculado por um fungo avirulento e virulento causador da ferrugem do feijoeiro (*U. appendiculatus*). As proteínas das folhas foram extraídas por meio de centrifugação diferencial precipitadas com TCA-acetona e os peptídeos analisados por LC-MS/MS. Cerca de 1.400 proteínas foram identificadas em cada tratamento, sendo o número total de 3.000, somando os resultados falsos positivos. As proteínas identificadas foram categorizadas nas seguintes classes no tempo 24 h: defesa/doenças (11%), energia (16%), metabolismo (19%), endereçamento e armazenamento de proteínas (14%), síntese proteica (15%). Já no tempo 72 h, as proteínas identificadas foram: defesa/doenças (7%), metabolismo (14%), energia (22%), endereçamento e armazenamento de proteínas (17%). Os autores concluíram que algumas proteínas de defesa basais são reguladores potenciais de defesa do fungo e que os genes R modulam proteínas semelhantes àquelas do sistema de defesa basal.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6922, p. 198-207, 2003.

AIDAR, H. Características da cultura. In. AIDAR, H. (Ed.) **Cultivo do Feijoeiro comum**. Sistemas de Produção, 2. ISSN 1679-8869. Versão eletrônica. EMBRAPA Arroz e Feijão, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/#feijao>>. Acesso em: 28 Mai. 2012.

ALZATE-MARIN, A. L.; SARTORATO, A. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 47, p. 241-242, 2004.

ARRUDA, K. M. A. **Piramidação de genes de resistência à Antracnose, Ferrugem e Mancha Angular e estudos de alelismo em feijão comum**. 2009. 129 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

BECERRA VELÁSQUEZ, V. L.; GEPTS, P. RFLP diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genome**, v. 37, n. 2, p. 256-263, 1994.

BRAUN, U.; CROUS, P. W. Proposal to conserve the name *Pseudocercospora* against *Stigmina* and *Phaeoisariopsis*. **Taxon**, v. 55, n. 3, p. 803, 2006.

BROUGHTON, W. J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, 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, 2008.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Séries históricas. Feijão 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> safras. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos>>. Acesso em: 13 Mai. 2012.

COOPER, B.; GARRETT, W. M.; CAMPBELL, K. B. Shotgun identification of proteins from uredospores of the bean rust *Uromyces appendiculatus*. **Proteomics**, v. 6, n. 8, p. 2477-2484, 2006.

COOPER, B.; NEELAM, A.; CAMPBELL, K. B.; LEE, J.; LIU, G.; GARRETT, W. M.; SCHEFFLER, B.; TUCKER, M. L. Protein accumulation in the germinating *Uromyces appendiculatus* uredospore. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 7, p. 857-866, 2007.

DE LA FUENTE, M.; BORRAJO, A.; BERMÚDEZ, J.; LORES, M.; ALONSO, J.; LÓPEZ, M.; SANTALLA, M.; DE RON, A. M.; ZAPATA, C.; ALVAREZ, G. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 2, p. 262-267, 2011.

DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, 2008.

ENG, J. K.; MCCORMACK, A. L.; YATES III, J. R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 5, n. 11, p. 976-989, 1994.

FENN, J.; MANN, M.; MENG, C.; WONG, S.; WHITEHOUSE, C. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.

FREITAS, F. O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1199-1203, 2006.

GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. **HortScience**, v. 33, n. 7, p. 1124-1130, 1998.

GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: SCHOONHOVEN, A. V.; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**. Wallingford: CAB/CIAT, 1991. p. 7-53.

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.

GÖRG, A.; POSTEL, W.; GÜNTHER, S. Two-dimensional electrophoresis. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 9, n. 9, p. 531-546, 1988.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-3685, 2004.

GRAVES, P. R.; HAYSTEAD, T. A. J. Molecular Biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 39-63, 2002.

GRONOW, M.; GRIFFITH, G. Rapid isolation and separation of non-histone proteins of rat liver nuclei. **FEBS Letters**, n. 15, n. 5, p. 340-344, 1971.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>>. Acesso em: 20 Mar. 2012.

KAUFMANN, R.; SPENGLER, B.; LÜTZENKIRCHEN, F. Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix-assisted laser desorption ionization. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 7, n. 10, p. 902-910, 1993.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Human Genetics**, v. 26, n. 3, p. 231-243, 1975.

KOINANGE, E. M. K.; GEPTS, P. Hybrid weakness in wild *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Heredity**, v. 83, n. 2, p. 135-139, 1992.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEE, J.; FENG, J.; CAMPBELL, K. B.; SCHEFFLER, B. E.; GARRETT, W. M.; THIBIVILLIERS, S.; STACEY, G.; NAIMAN, D. Q.; TUCKER, M. L.; PASTOR-CORRALES, M. A.; COOPER, B. Quantitative proteomic analysis of bean plants infected by a virulent and avirulent obligate rust fungus. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 19-31, 2009.

LIEBLER, D. C. **Introduction to proteomics: tools for new biology**. Totowa: Humana Press, 2002. 210 p.

MACGILLIVRAY, A. J.; RICKWOOD, D. The heterogeneity of mouse-chromatin nonhistone proteins as evidenced by two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis and ion-exchange chromatography. **European Journal of Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 181-190, 1974.

MARSOLAIS, F.; PAJAK, A.; YIN, F. Q.; TAYLOR, M.; GABRIEL, M.; MERINO, D. M.; MA, V.; KAMEKA, A.; VIJAYAN, P.; PHAM, H.; HUANG, S. Z.; RIVOAL, J.; BETT, K.; HERNANDEZ-SEBASTIA, C.; LIU, Q. A.; BERTRAND, A.; CHAPMAN, R. Proteomic analysis of common bean seed with storage protein deficiency reveals up-regulation of sulfur-rich proteins and starch and raffinose metabolic enzymes, and down-regulation of the secretory pathway. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 8, p. 1587-1600, 2010.

MESQUITA, F. R.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; LIMA, R. A. Z.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1114-1121, 2007.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

PAPPIN, D. J. C.; HOJRUP, P.; BLEASBY, A. J. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. **Current Biology**, v. 3, n. 6, p. 327-332, 1993.

PASTOR-CORRALES, M. A. Variación patogênica de *Colletotrichum lindemuthianum*, el agente causal de la antracnosis del frijol y una propuesta para su estandarización. In: PASTOR-CORRALES, M. A. (ed). **La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en América Latina**. Cali, Colômbia, 1992. p. 212-239. (Doc. de trabajo, 113).

PASTOR-CORRALES, M. A.; JARA, C. E. La evolucion de *Phaeoisariopsis griseola* com el frijon comum em América Latina. **Fitopatologia Colombiana**, v. 19, p. 15-22, 1995.

PAULA JR., T. J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JR., T. J.; BORÉM, A. (Ed.) **Feijão**. 2. Ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 359-414.

PERKINS, D. N.; PAPPIN, D. J.; CREASY, D. M.; COTTRELL, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-3567, 1999.

POSSE, S. C. P.; RIVA-SOUZA, E. M.; SILVA, G. M.; FASOLO, L. M.; SILVA, M. B.; ROCHA, M. A. M. (Coord.). **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira: 2009-2011**. Vitória: Incaper, 2010. 245 p. (Incaper. Documentos, 191).

PROUS, A.; JUNQUEIRA, P. A.; MALTA, I. M. Arqueologia do alto médio São Francisco. Região de Januária e Montalvânia. **Revista de Arqueologia**, v. 2, p. 59-72, 1984.

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

RAMPITSCH, C.; BYKOVA, N. V. Proteomics and plant disease: advances in combating a major threat to the global food supply. **Proteomics**, v. 12, n. 4-5, p. 673-690, 2012.

RAVA, C.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 167-172, 1994.

SADYGOV, R. G.; COCIORVA, D.; YATES, J. R. Large-scale database searching using tandem mass spectra: Looking up the answer in the back of the book. **Nature Methods**, v. 1, n. 3, p. 195-202, 2004.

SARTORATO, A.; ALZATE-MARIN, A. L. Analysis of the pathogenic variability of the *Phaeoisariopsis griseola* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 47, p. 235-236, 2004.

SILVA, M. G. M.; SANTOS, J. B.; ABREU, A. F. B. Seleção de famílias de feijoeiro resistente à antracnose e à mancha-angular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1499-1506, 2006.

SINGH, S. P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus Vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, v. 45, n. 3, p. 379-396, 1991.

SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199-2223, 2010.

SPENGLER, B. Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 32, n. 10, p. 1019-1036, 1997.

STEEN, H.; MANN, M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 699-711, 2004.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y.; AKITA, S.; YOSHIDA, Y.; YOSHIDA, T.; MATSUO, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151-153, 1988.

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.

VAN WIJK, K. J. Challenges and prospects of plant proteomics. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 501-508, 2001.

VIEIRA, C. **Doenças e Pragas do Feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, Imprensa Universitária, 1988. 231 p.

WEATHERLY, D. B.; ATWOOD, J. A.; MINNING, T. A.; CAVOLA, C.; TARLETON, R. L.; ORLANDO, R. A heuristic method for assigning a false-discovery rate for protein identifications from mascot database search results. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 762-772, 2005.

## CAPÍTULO 1

### PROTEOMA DIFERENCIAL DO FEJJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO POR *Pseudocercospora griseola*

#### 1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem aproximadamente quatro milhões de hectares plantados com variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), com uma produção anual maior que três milhões de toneladas. Economicamente, o feijão é a mais importante cultura para muitos agricultores brasileiros cujas propriedades possuem menos que 10 hectares. Em muitas partes do mundo, incluindo o Brasil, o feijão constitui fonte primária de proteínas, carboidratos e minerais, como o ferro (BROUGHTON et al., 2003). A produção brasileira de feijão é limitada pelo grande número de doenças que acometem a cultura.

A mancha angular do feijoeiro comum, cujo agente causal é o fungo *Pseudocercospora griseola*, é uma das principais doenças dessa leguminosa (SARTORATO, 2006). Segundo Singh e SCHWARTZ (2010) as perdas potenciais de rendimento no campo ocasionadas por essa doença podem chegar a 80%.

Para o desenvolvimento de cultivares resistentes a doenças, o conhecimento da interação planta-patógeno é de fundamental importância. Técnicas de proteômica têm sido utilizadas para o entendimento de doenças complexas. A forma mais comum é a comparação de proteínas expressas na condição patológica e no estado normal do tecido em que os níveis ou formas das proteínas é modificado, indicando assim a potencial causa da doença (HOLMES et al., 2005).

Uma das metodologias mais usadas em proteômica é a eletroforese bidimensional (2-DE). A 2-DE é a combinação de dois diferentes tipos de separação. Na primeira etapa, as proteínas são separadas com base no ponto isoelétrico e na segunda, as proteínas focalizadas são separadas de acordo com as suas massas moleculares. (LIEBLER, 2002).

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho, a identificação de proteínas diferencialmente expressas pelas folhas do feijoeiro comum em resposta à inoculação de *P. griseola*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal e inoculação**

O cultivar de feijão utilizado neste experimento (AND 277) foi disponibilizado pelo Banco Ativo de Germoplasma do Feijoeiro (BAG) do BIOAGRO, UFV – MG. AND 277 é um feijão andino, possuidor do alelo *Phg-1*, que confere resistência a diversas raças do fungo *P. griseola*, conforme relatado por Arruda (2009). Três sementes da cultivar AND 277 foram semeadas em cada um dos 18 vasos de 2,5 L contendo uma mistura de solo e esterco curtido na proporção de 4:1. Os vasos foram mantidos em casa da vegetação até o momento da inoculação. Quando as plantas atingiram o estágio fenológico V3, aproximadamente 15 dias após a emergência, foram inoculadas com esporos da raça 31.31 de *P. griseola* suspensos em água, na concentração de  $2,0 \times 10^4$  esporos/mL. Foi utilizado neste trabalho o isolado 97-2 caracterizado por Nietzsche et al. (2001), que é incompatível com AND 277. A cultura desse isolado é mantida na micoteca do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV. A inoculação foi realizada na face adaxial e abaxial dos trifólios utilizando um atomizador De Vilbiss nº 15 acionado por compressor elétrico. Após a inoculação, as plantas foram mantidas na câmara de nevoeiro a  $20 \pm 2$  °C sob fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa superior a 95 %. Foi coletado um trifólio de cada uma das três plantas por vaso para constituir cada uma das três repetições nos tempos de coleta 12, 24 e 48 horas após inoculação (h.a.i.). Para cada tempo de inoculação foi utilizado um controle não inoculado (apenas borrifado com água). Assim, foram analisados ao todo seis tratamentos, sendo três repetições para cada tratamento. Apenas com o propósito de certificar a avirulência do isolado, plantas do cultivar suscetível Rudá foram inoculadas. As folhas coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o momento da extração das proteínas.

### **2.2. Extração de proteínas**

Foi utilizado o protocolo baseado na extração proposta por Sarma et al. (2008), com algumas modificações. As amostras foram pulverizadas em gral de porcelana na presença de nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido. O pó obtido foi transferido para tubos Falcon de 50 mL previamente resfriados com N<sub>2</sub> líquido. Foram adicionados 8 mL de solução tampão gelada contendo: fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) 1 mM; Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 10 mM, ditioneitol (DTT) 50 mM, inibidor de protease (código P9599, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e água

ultrapura q.s.p. 8 mL. Para a obtenção de um pó ainda mais fino, as amostras foram trituradas com o auxílio de um *Polytron homogenizer* (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY, EUA) por um min. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 8.000 x g por 20 min, a 4 °C. As demais centrifugações foram realizadas sob as mesmas condições. A fase aquosa foi coletada e transferida para novos tubos de 50 mL, enquanto que o *pellet* foi descartado.

Foram adicionados 5 mL de fenol tamponado pH 8,0 à fase aquosa e os tubos foram agitados por 30 min em um agitador. Após essa fase, o líquido foi transferido para tubos de 15 mL e esses tubos foram centrifugados por 20 min, a 4 °C. Posteriormente, a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo de 50 mL e o procedimento anterior foi repetido, porém, com a adição de 3 mL de fenol. A fase orgânica inferior obtida nas duas etapas anteriores foi transferida para um tubo de 50 mL e foram adicionados 25 mL de acetato de amônio 0,1 M em metanol 100% (v/v) gelado acrescido de DTT 10 mM. Os tubos foram deixados a -80 °C *overnight* para a precipitação das proteínas.

Após a precipitação das proteínas, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com acetato de amônio 0,1 M em metanol 100% (v/v) gelado por duas vezes, agitados em *vortex* e, depois, centrifugados. As amostras foram também lavadas com acetona 80% (v/v) e etanol 90% (v/v), uma vez com cada solução, agitados em *vortex* e, depois, centrifugadas.

Após as lavagens, o *pellet* foi mantido à temperatura ambiente para a evaporação completa do etanol. O tempo aproximado de secagem foi de duas horas. O *pellet* final foi ressuspensionado em tampão contendo ureia 7 M, tiourea 2 M e 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato (CHAPS) 4% (m/v) e agitado em um banho seco (Mixing Bloc MB-102 BIOER) na velocidade de 1.500 rpm.

Por fim, as amostras foram sonicadas em sonicador da marca *UltraSonic Processor* (Modelo GE 50), por 5 s, por três vezes, até a completa solubilização das proteínas. A potência utilizada foi de 10% da potência máxima do aparelho e as amostras permaneceram em gelo durante o processo. Depois de solubilizadas, as amostras foram clarificadas com centrifugação a 10.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e armazenados a -80 °C.

### **2.3. Quantificação de proteínas**

A quantificação das proteínas totais foi realizada utilizando o método de Bradford (1976), tendo a albumina sérico bovina como padrão.

### **2.4. Eletroforese bidimensional (2-DE)**

#### **2.4.1. Reidratação das tiras de gel**

Foram utilizadas tiras de 18 cm com gradiente linear de pH de 4,0 a 7,0 (código 17-1233-01, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). A reidratação foi realizada durante 18 h em aparato de reidratação *reswelling tray* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) utilizando solução de reidratação *DeStreak* (código 17-6003-19, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) e tampão IPG 2% (v/v) (código 17-6000-86, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). Foi aplicado 1 mg de proteína para cada tira, sendo o volume final de 340  $\mu$ L (GE HEALTHCARE, 2010).

#### **2.4.2. Focalização isoelétrica (IEF)**

A focalização Isoelétrica (IEF) foi realizada no equipamento *IPGphor III* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). O programa *Ettan IPGphor III Control Software* foi utilizado para monitoramento e programação dos parâmetros da corrida eletroforética nas tiras de gel, com as seguintes etapas: 1) 200 V em passo único por 14 h; 2) 500 V em passo único por 1 h; 3) 800 Vxh em gradiente até 1.000 V; 4) 16.500 Vxh em gradiente até 10.000 V; 5) 18.200 Vxh em passo único de 10.000 V; 6) 5.000 V em passo único por 5 h (GE HEALTHCARE, 2010). A corrente utilizada foi no máximo de 75  $\mu$ A para cada tira. As tiras contendo as amostras foram cobertas usando cerca de 8 mL de *Immobiline DryStrip Cover Fluid* (código 17-1335-01, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) para cada caneta do *manifold*. Após a focalização as tiras foram imediatamente armazenadas a -80 °C para posterior utilização.

### **2.4.3. Equilíbrio das tiras de gel**

Após a IEF, as tiras foram equilibradas sob constante agitação em 10 mL de tampão de equilíbrio, contendo Tris-HCl 75 mM pH 8,8, ureia 6 M, glicerol 30% (v/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,002% (m/v) (GE HEALTHCARE, 2010). Foram realizadas duas etapas de equilíbrio de 30 min cada. Durante a primeira etapa foi adicionado 1,5% (m/v) de DTT ao tampão de equilíbrio e na segunda, 2,5% (m/v) de iodoacetamida. Após os dois passos de equilíbrio, as tiras foram submersas por alguns segundos em tampão de corrida e, em seguida, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

### **2.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A segunda dimensão da eletroforese foi efetuada com base na metodologia descrita por Laemmli (1970), em gel de separação na concentração de 12,5% (m/v) de poliacrilamida, em cuba tipo DaltSix (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). A corrida foi feita em uma primeira etapa com uma corrente de 10 mA/gel, voltagem de 80 V e potência de 1 W/gel por 60 min e, em seguida, a uma corrente de 40 mA/gel, voltagem de 500 V e potência de 13 W/gel, até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel (GE HEALTHCARE, 2010). A temperatura foi mantida a 8 °C por meio de refrigeração com circulador termostático.

### **2.5. Coloração dos géis**

Após o término da 2ª dimensão, os géis foram fixados com uma solução contendo ácido fosfórico 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) por aproximadamente 12 h. Posteriormente, essa solução foi retirada e a solução de coloração contendo sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v), *Coomassie blue* G-250 0,08% (v/v) e etanol 20% (v/v) (GE HEALTHCARE, 2010). A solução de coloração foi mantida em contato com os géis por 48 h e depois descartada. Em seguida, uma solução de descoloração contendo ácido acético 5% (v/v) foi adicionada e os géis foram estocados com essa mesma solução até a retirada dos *spots* para tripsinização.

## 2.6. Captura das imagens e análise da expressão

As imagens dos géis foram digitalizadas usando o *Image Scanner III* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) no modo de escaneamento transparente, resolução de 300 dpi, filtro de cor vermelho e com fórmula de calibração atualizada. As imagens foram calibradas com o *software Labscan* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). As análises comparativas das imagens digitais obtidas foram efetuadas utilizando o software *Image Master 2D Platinum 7.1* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). A comparação foi feita entre os géis das plantas inoculadas e não inoculadas para cada tempo de inoculação, considerando três repetições biológicas para cada tratamento. Nas análises foram considerados *spots* diferencialmente expressos aqueles que apresentaram uma variação de sobreposição de medidas (*ratio*) acima de 1,5 e ANOVA com p valor menor que 0,05. Para os *spots* diferencialmente expressos foi calculada uma porcentagem de seu volume e a comparação desses valores indicou a diferença de expressão entre os tratamentos.

## 2.7. Tripsinização das amostras

Os *spots* correspondentes as proteínas diferencialmente expressas foram retirados dos géis e submetidos à digestão com tripsina no gel, segundo o protocolo de Shevchenko et al. (2007), com algumas modificações. Os pedaços de gel foram transferidos para uma placa de polipropileno de 96 poços MicroAmp<sup>®</sup> (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) previamente lavada em dois banhos de metanol. A descoloração das proteínas no gel foi feita com uma solução contendo acetonitrila 50% (v/v) e bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 por duas vezes, sendo uma lavagem durante a noite e outra de 1 h no dia seguinte, todas elas incubadas à temperatura de 25 °C e agitação a 1.400 rpm em banho seco. Duas lavagens também foram feitas com uma solução contendo metanol 50% (v/v) e ácido acético 5% (v/v) por duas horas sob as mesmas condições citadas acima.

A seguir, a solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila pura por 10 min e secos em *Speed Vac Concentrator Plus* (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Alemanha) por 15 min. As proteínas foram, então, reduzidas com DTT a 20 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0 por 30 min a 56 °C, em banho seco, a 500 rpm. Após esta etapa, as proteínas foram alquiladas com iodoacetamida 75 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0 por 30 min, a 25 °C, na ausência de luz, e incubadas em banho seco a 500 rpm.

Sequencialmente, os pedaços de gel foram, por duas vezes, lavados em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0 por 10 min, desidratados em acetonitrila pura por 5 min e secos em *Speed Vac Concentrator Plus* por 15 min.

A digestão foi realizada utilizando tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade, Promega V5280, Madison, WI, EUA). A enzima (100 µg) foi ressuspensa em 100 µL de ácido acético 50 mM. A solução de clivagem foi feita a partir da solução estoque da tripsina (1.000 ng/µL) acrescentando um volume da solução de bicarbonato de amônio 40 mM acetonitrila 10% pH 8,0, de modo que a concentração final da enzima ficasse a 25 ng/µL. Para cada amostra, foram aplicados 20 µL de solução de clivagem de forma a cobrir os pedaços de gel. As amostras foram mantidas em gelo por 45 min para que a enzima pudesse penetrar no gel sem que se iniciasse a digestão. Após este período, 50 µL da solução de bicarbonato de amônio 40 mM/acetonitrila 10% (v/v), pH 8,0, foram adicionados a cada tubo. As amostras foram, então, incubadas a 37 °C por 16 h (*overnight*) em banho seco a 500 rpm.

Após a digestão, a placa com os pedaços de gel foi colocada num banho de ultrassom (Branson Ultrasonic BV Co., CT, EUA) por 10 min, em seguida agitadas em banho seco a 1.400 rpm por 2 min e toda a solução dessa placa foi removida para uma nova placa. A cada pedaço de gel restante, em duas etapas sequenciais, foram adicionados 30 µL da solução de ácido fórmico 5% (v/v) acetonitrila 50% (v/v), sendo submetidos à agitação por 2 min a 1.400 rpm e incubados por 15 min em repouso a temperatura ambiente, 10 min no banho ultrassom e mais 2 min no banho seco a 750 rpm. Toda a solução foi removida e adicionada à solução da nova placa. As amostras, contendo os peptídeos trípticos, foram concentradas até a secagem completa em *Speed Vac Concentrator Plus*. Os peptídeos foram posteriormente ressuspensos em solução de ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) e, posteriormente dessalinizados em coluna de hidrofobicidade C18 (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Alemanha).

## **2.8. Espectrometria de massas**

A identificação de proteínas foi realizada utilizando um espectrômetro de massas do tipo AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) disponibilizado pelo Núcleo de Proteoma do Laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ). Para isso, as amostras de 0,3 µL juntamente com 0,3 µL de matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (código C2020, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) foram aplicadas em uma placa de aço. Após a secagem da preparação, os fragmentos resultantes da digestão tríptica foram analisados para a obtenção das listas

de massas dos peptídeos e seus fragmentos. A ionização dos peptídeos para a fase gasosa foi feita a técnica de MALDI e o método de detecção das massas obtida por detector do tipo TOF/TOF. A fragmentação foi realizada pelo método PSD para os 15 peptídeos mais intensos de cada amostra.

## **2.9. Identificação das proteínas em bancos de dados**

A identificação das proteínas foi feita pela busca no banco de dados público do Phytozome, onde se encontram as sequências obtidas pelo sequenciamento do genoma do feijoeiro comum (PHYTOZOME, 2012). Os dados do MS/MS *ion search* foram utilizados para a busca das proteínas pelo *software* Mascot versão 2.2.07 (MATRIX SCIENCE, 2012) num sistema de busca local, considerando os seguintes parâmetros: duas clivagens perdidas, erro de 0,1 Da para identificação de peptídeos e proteínas e as modificações variáveis nos peptídeos e aminoácidos foram: carbamidometilação da cisteína, oxidação da metionina e deaminação da asparagina e glutamina. Como o genoma do feijoeiro ainda encontra-se em fase de anotação das suas sequências, após a identificação das proteínas do feijoeiro e confirmação com o *software* Scaffold (Proteome Software, Inc., Portland, OR, EUA), foi realizada uma busca por similaridades de sequências utilizando o algoritmo BlastP (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados não redundante do NCBI para a identificação das proteínas (NCBI, 2012).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cultivares AND 277 e Rudá apresentaram diferentes respostas quando inoculadas com a raça 31.31 de *P. griseola*. Quinze dias após a inoculação, plantas da cultivar AND 277 não mostraram sintomas da doença enquanto que a cultivar Rudá apresentou sintomas típicos da doença como lesões nas folhas delimitadas pelas nervuras (manchas angulares), bem como o amarelecimento e queda prematura das folhas. Portanto, a raça 31.31 é avirulenta a cultivar AND 277 e virulenta a cultivar Rudá. Logo a interação AND 277 x *P. griseola* é incompatível enquanto que a interação Rudá x *P. griseola* é compatível.

Nos géis bidimensionais contendo proteínas de plantas inoculadas e não inoculadas com esporos de *P. griseola* foram detectadas 28 proteínas diferencialmente expressas pelo feijoeiro em resposta ao patógeno. Sete dessas proteínas foram detectadas 12 h.a.i., sendo quatro delas identificadas por MS/MS. No tempo 24 h.a.i. foram detectadas 15 proteínas diferencialmente expressas, sendo que oito puderam ser identificadas. Dois *spots* distintos desse tempo corresponderam à mesma proteína (chaperonina 60 KDa subunidade  $\alpha$ ). Seis proteínas foram detectadas 48 h.a.i. e somente uma delas pôde ser identificada. Na Tabela 1 são mostradas as proteínas diferencialmente expressas por AND 277, *match ID* dessas proteínas, espécie na qual a proteína foi identificada, número GI, *E value*, ponto isoelétrico (PI) e massa molecular (MM) experimental (Exp.) e teórico, cobertura da sequência (%) e os peptídeos identificados por MS/MS. Na tabela 2 são apresentadas as médias de % de volume de cada *spot* e o desvio padrão nas plantas inoculadas e não inoculadas com *P. griseola* e o nível de expressão dessa proteína. Na figura 1 são mostradas imagens dos *spots* referentes às proteínas diferencialmente expressas por AND 277 em resposta a *P. griseola*.

A enzima glicina desidrogenase foi diferencialmente expressa 12 h.a.i., sendo mais expressa na planta inoculada com *P. griseola* em relação ao controle (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Esta enzima possui o nome sistemático glicina:lipoilproteína oxidoreductase (*decarboxylating and acceptor-amino-methylating*) e possui nomes similares como: glicina desidrogenase com atividade de descarboxilação, glicina descarboxilase, glicina descarboxilase proteína P, entre outros (SCHOMBURG & SCHOMBURG, 2005). Essa enzima está presente nas mitocôndrias e tem um importante papel nos vegetais atuando na degradação da glicina gerada durante a fotorespiração.

Tabela 1. Proteínas diferencialmente expressas nas folhas do genótipo AND 277 de feijoeiro comum em resposta à inoculação de *Pseudocercospora griseola*.

Match ID	Proteína <sup>1</sup>	Espécie	Acesso (GI) <sup>2</sup>	E value	PI/MM		Cobertura <sup>3</sup> (%)	Peptídeo identificado
					Exp.	Teórico		
2074	Glicina desidrogenase	<i>Glycine max</i>	356552354	0,0	6,40/103.147	6,65/115.198	11	RLENYYPVLF GVNGTVAHEFIIDLR NSPYLTHPIFNTYQTEHELLR GNINIEELR VHGLAGAFALGLK
2502	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase	<i>Phaseolus vulgaris</i>	3037047	0,0	5,04/44.035	5,00/53.177	13	HLPESEVDPDLVDEYRK DMDWESTFHLR HLPESEVDPDLVDEYR
2504	Uroporfirinogênio descarboxilase	<i>Glycine max</i>	356540042	0,0	6,82/45.247	7,67/42.710	26	EFVPEESVPYVGEALTILR SHPNLPLILYASGSGGLLR STAAAEPLLLNAVR GPVIFDPIHTDAQVNQVR VGTPEENVAHFFEVAK
2507	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase subunidade C	<i>Glycine max</i>	351723699	0,0	6,75/48.010	6,40/31.564	29	GILGYTEDDVVSTDFVGDSR VPTVDVSVVDLTVR YDSVHGQWK
1578	Tioredoxina-like	<i>Medicago truncatula</i>	357443639	2 e <sup>-64</sup>	4,87/13.460	9,12/19.497	14	FEGALTADQLIER IEALPTFIMFK
1398	Chaperonina 60 kDa subunidade β	<i>Glycine max</i>	356525839	0,0	5,32/64.832	5,64/62.961	21	DLFNILEDAIR AAVEEGIVVGGGCTLLR IQIEAAEQDYER SQYLDDIAILTTGGTVIR KSQYLDDIAILTTGGTVIR GYISPYFVTDSEK

Continuação

Match ID	Proteína <sup>1</sup>	Espécie	Acesso (GI) <sup>2</sup>	E value	PI/MM		Cobertura <sup>3</sup> (%)	Peptídeo identificado
					Experimental	Teórico		
1396	Chaperonina 60 kDa subunidade $\alpha$	<i>Glycine max</i>	356542646	0,0	4,85/64.540	5,12/61.543	21	AIELPDAMENAGAALIR LADAVGLTLGPR GYISPFVVTNPEK
1392	Chaperonina 60 kDa subunidade $\alpha$	<i>Glycine max</i>	356542646	0,0	4,80/64.745	5,12/61.543	21	AIELPDAMENAGAALIR LADAVGLTLGPR GYISPFVVTNPEK
1263	Rubisco ativase	<i>Glycine max</i>	10720248	0,0	5,40/48.137	6,49/48.208	12	VPIIVTGNDFSTLYAPLIR HPGQSIDFFGALR GLAYDVSDDQQDITR
2395	Proteína 1 de evolução do oxigênio	<i>Pisum sativum</i>	131384	0,0	5,62/22.195	5,18/21.706	21	DGIDYAAVTVQLPgger NAPLEFQNTK
2414	Isopentenil pirofosfato isomerase	<i>Pueraria montana</i> var. <i>lobata</i>	35186998	5 e <sup>-180</sup>	4,95/31.988	5,75/34.150	23	ESELIEENALGVR LDELGIPAEDVPVDQFTSLGR
1478	Glicil-tRNA sintetase 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	18397278	0,0	6,49/86.009	6,68/80.892	9	VFTPSVIEPSFGIGR GIVNNETLGYFIGR
78	Peroxirredoxina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	11558242	4 e <sup>-163</sup>	4,63/24.093	5,17/28.615	42	SYDVLIPDQGIALLR EGVIQHSTINNLAIGR SGGLGDLNYPLISDVTK TLQALQYVQENPDEVCPAGWKPGK GLFIIDKEGVIQHSTINNLAIGR YAEFEALNTEILGVSVDVFSHLAWVQTDR

<sup>1</sup> Todas as proteínas tiveram uma confirmação com 100% de certeza no *software* Scaffold (Proteome Software, Inc., Portland, OR).

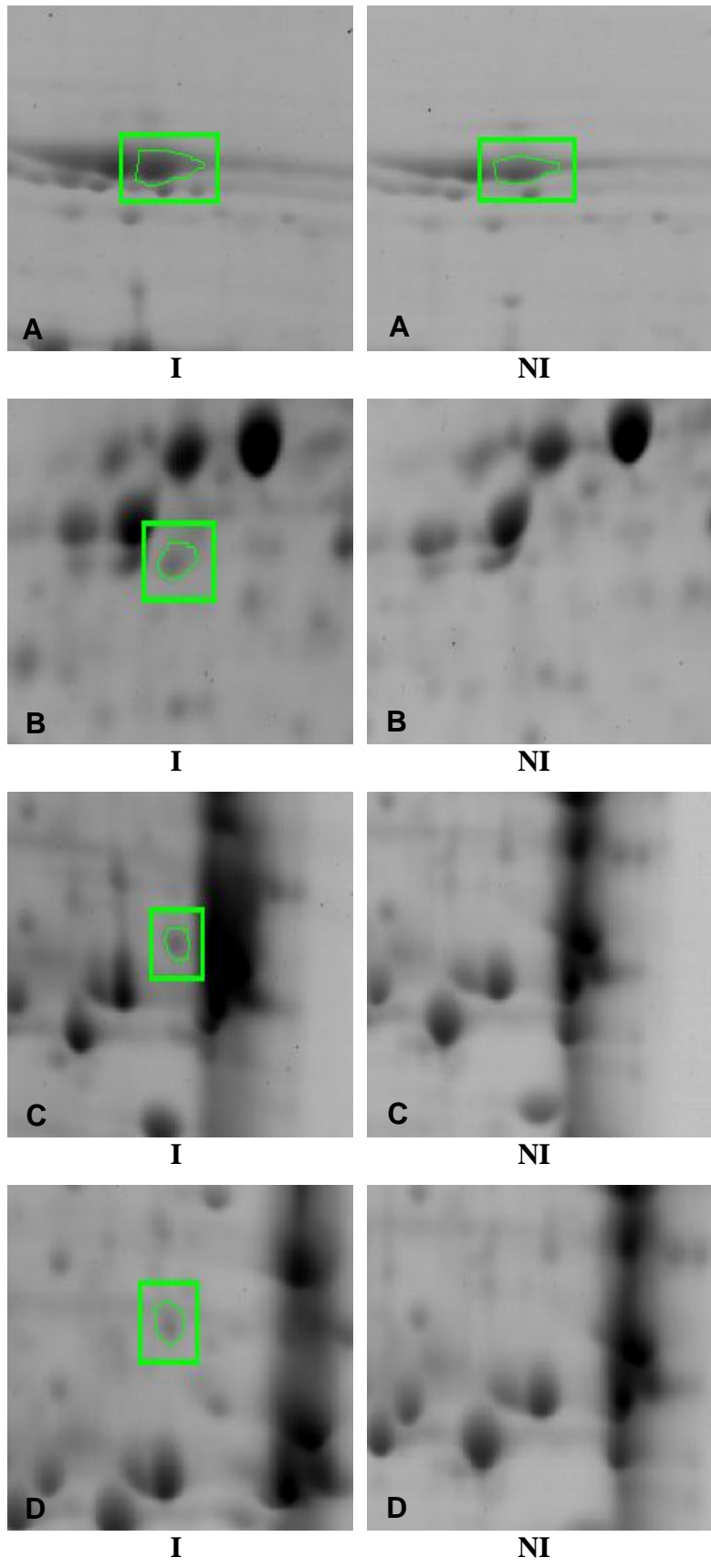
<sup>2</sup> GenInfo Identifier (GI) – número de acesso no GenBank – NCBI.

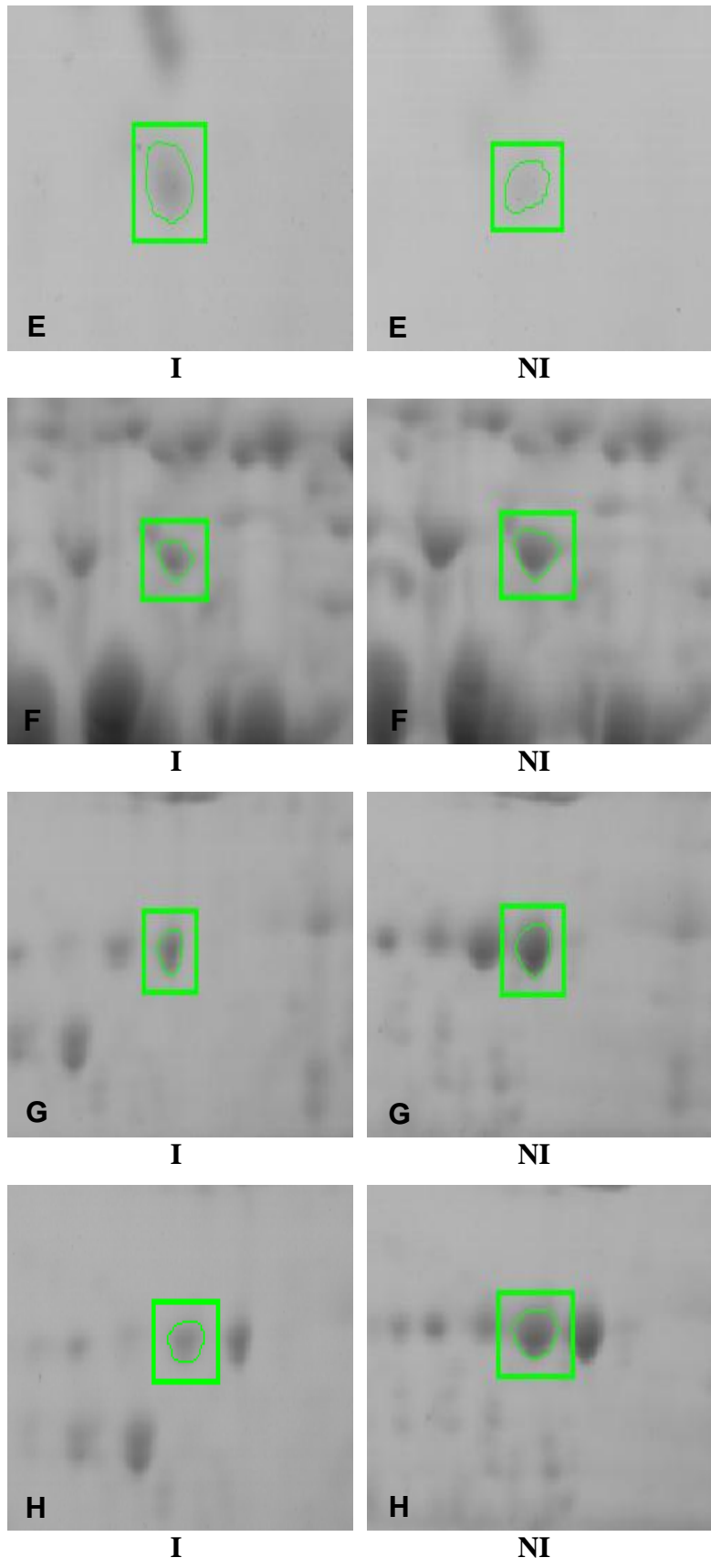
<sup>3</sup> Porcentagem obtida no *software* Mascot (Matrix Science Ltd., London, Reino Unido).

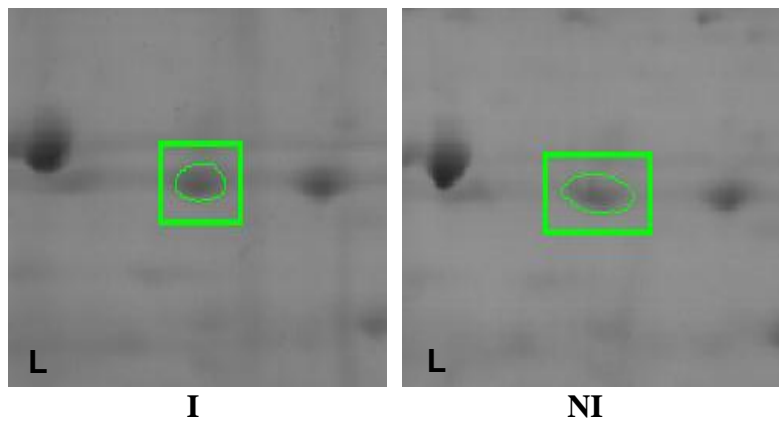
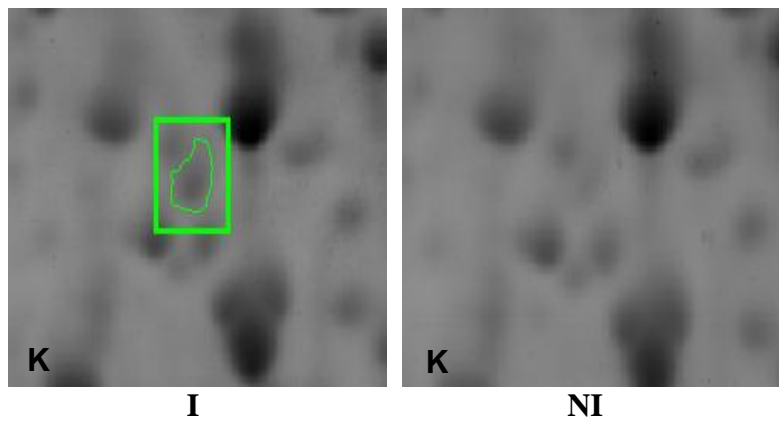
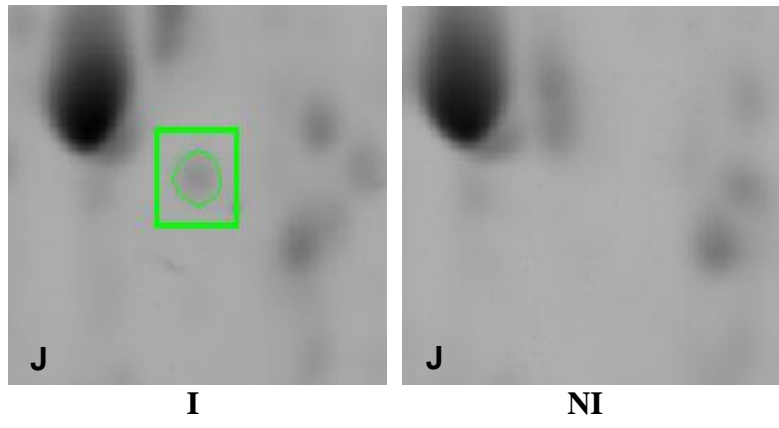
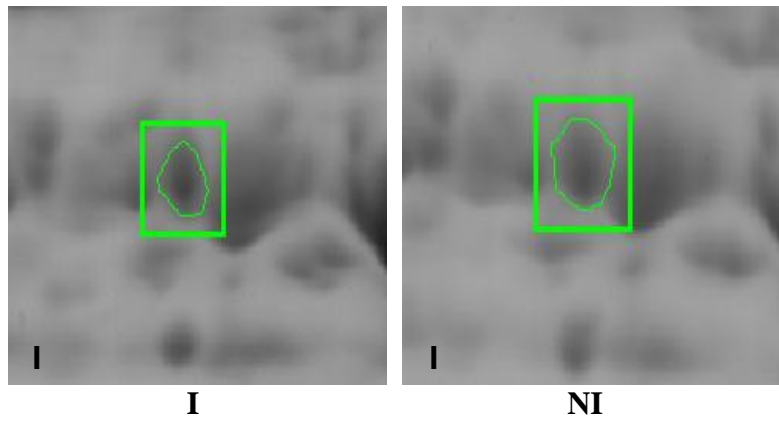
Tabela 2. Nível de expressão relativa das proteínas baseada na média de % de volume das plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI).

Match ID	Proteína	Média da % de volume $\pm$ DP		Tempo (h)	Nível de expressão
		I	NI		
2074	Glicina desidrogenase	0,2703 $\pm$ 0,0323	0,1408 $\pm$ 0,0084	12	(+) 1,92
2502	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase	0,0251 $\pm$ 0,0066	ND	12	NA
2504	Uroporfirinogênio descarboxilase	0,0403 $\pm$ 0,0213	ND	12	NA
2507	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase subunidade C	0,0385 $\pm$ 0,0133	ND	12	NA
1578	Tioredoxina-like	0,0548 $\pm$ 0,0103	0,0246 $\pm$ 0,0069	24	(+) 2,22
1398	Chaperonina 60 kDa subunidade $\beta$	0,0162 $\pm$ 0,0089	0,0600 $\pm$ 0,0240	24	(-) 3,70
1396	Chaperonina 60 kDa subunidade $\alpha$	0,0351 $\pm$ 0,0176	0,0954 $\pm$ 0,0203	24	(-) 2,71
1392	Chaperonina 60 kDa subunidade $\alpha$	0,0295 $\pm$ 0,0176	0,0911 $\pm$ 0,0307	24	(-) 3,08
1263	Rubisco ativase	0,1171 $\pm$ 0,0140	0,2329 $\pm$ 0,0360	24	(-) 1,98
2395	Proteína 1 de evolução do oxigênio	0,0191 $\pm$ 0,0060	ND	24	NA
2414	Isopentenil pirofosfato isomerase	0,0202 $\pm$ 0,0060	ND	24	NA
1478	Glicil-tRNA sintetase 1	0,0201 $\pm$ 0,0007	0,0337 $\pm$ 0,0015	24	(-) 1,68
78	Peroxirredoxina	0,4534 $\pm$ 0,1031	0,2175 $\pm$ 0,0202	48	(+) 2.08

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







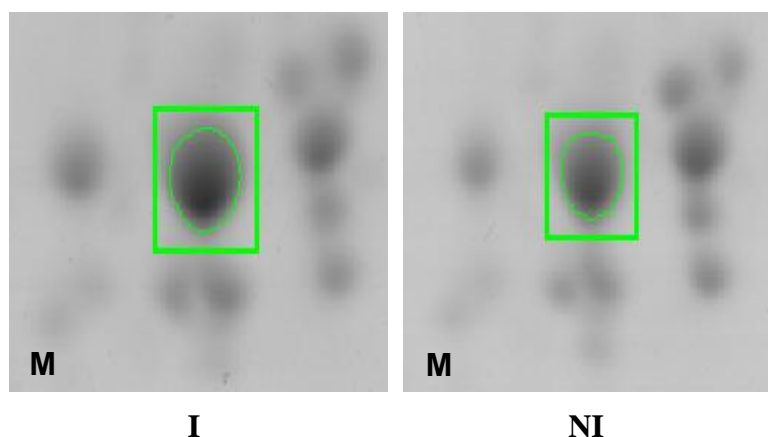


Figura 1. *Spots* diferencialmente expressos no genótipo AND 277 inoculado (I) com esporos de *P. griseola* e não inoculado (NI). **A**, glicina descarboxilase; **B**, ácido 1-aminociclopropano-carboxílico oxidase; **C**, uroporfirinogênio descarboxilase; **D**, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase subunidade C; **E**, tioredoxina-like; **F**, chaperonina 60 KDa subunidade  $\beta$ ; **G**, chaperonina 60 KDa subunidade  $\alpha$ ; **H**, chaperonina 60 KDa subunidade  $\alpha$ ; **I**, rubisco ativase; **J**, proteína 1 de evolução do oxigênio; **K**, isopentenil pirofosfato isomerase; **L**, glicil-tRNA sintetase 1; **M**, peroxirredoxina.

Chandok et al. (2003) demonstraram que a enzima responsável pela síntese do óxido nítrico (NO) em *Arabidopsis thaliana* era uma forma variante da glicina descarboxilase, o que indica que essa proteína pode ter um papel importante na defesa de plantas contra o ataque de patógenos. Em plantas, o NO desempenha um importante papel nas reações de defesa das plantas. A suplementação exógena de NO induz a expressão de genes de defesa e/ou a produção de compostos conhecidos como fitoalexinas (MODOLO et al., 2002), e genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de espécies reativas de oxigênio que atuam na resposta hipersensitiva de plantas à invasão por patógenos (DE STEFANO, 2005).

Navarre e Wolpert (1995) mostraram que uma toxina produzida pelo fungo *Cochliobolus victoriae*, causador da ferrugem em aveia (*Avena sativa*), era um potente inibidor *in vivo* da atividade da glutamina descarboxilase, o que indica que a interação compatível entre patógeno e hospedeiro depende da inibição da atividade da glutamina descarboxilase e conseqüentemente da diminuição dos níveis de NO na planta.

Neste trabalho foi observada a presença da enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase (ACC oxidase) apenas nos géis das plantas inoculadas com esporos de *P. griseola* às 12 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Essa enzima possui um papel primordial na via bioquímica de biossíntese de etileno (Figura 2).

O etileno é um hormônio vegetal gasoso que regula muitos processos durante o crescimento e desenvolvimento da planta e atua como um importante mediador de resposta da planta aos estresses bióticos e abióticos (WANG et al., 2002). Nas plantas superiores, as reações limitantes para produção do etileno são a conversão da S-adenosilmetionina (S-AdoMet) em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela ACC sintase e conversão do ACC em etileno pela ACC oxidase (CHEN et al., 2003).

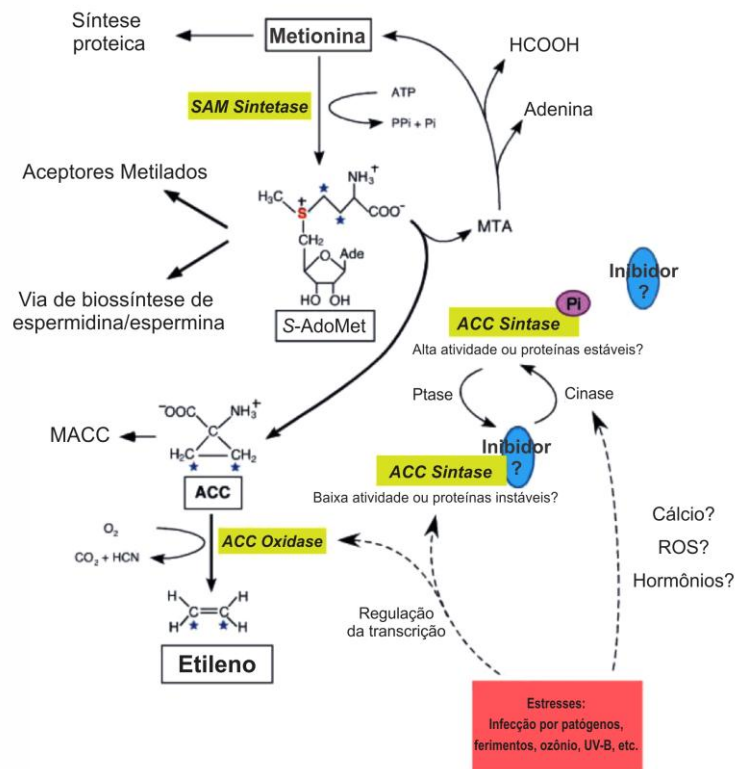


Figura 2. Via biosintética e de regulação do etileno. SAM sintetase, S-adenosil metionina sintetase; S-AdoMet, S-adenosilmetionina; ACC sintase, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintase; ACC oxidase, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase; ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; MACC, 1-malonil-ACC; MTA, 5-metiladenosina; ROS, espécies reativas de oxigênio. Fonte: Modificada de Wang et al. (2002).

Em geral, o nível basal de atividade da ACC oxidase é muito baixo nos tecidos que não produzem quantidades significantes de etileno. A produção de etileno estimulada por estresse é associada a um rápido aumento da atividade da ACC oxidase. Essa enzima possui atividade constitutiva em muitos tecidos, sendo a principal enzima regulatória da via de biossíntese de etileno induzida por estresse (LIU & ZHANG, 2004). A ativação da ACC oxidase ocorre por fosfatases e cinases ativadas por

condições de estresse (WANG, 2002). Esse fato foi demonstrado por Liu e Zhang (2004) que comprovaram que a ativação da ACC oxidase ocorreu por uma fosforilação de uma cinase chamada MPK6 (*mitogen-activated protein*).

Há uma forte correlação entre o aumento da produção de etileno durante a infecção e o desenvolvimento de sintomas cloróticos, necróticos e de murcha (ELAD, 1990). Em um trabalho realizado por Chen et al. (2003) com tabaco (*Nicotiana tabacum*) inoculada com o fungo hemibiotrófico *Colletotrichum destructivum* foram observados dois picos de produção de etileno, correspondendo às fases biotróficas e necrotróficas. Nesse mesmo trabalho, também foi observado que houve variação nos níveis de expressão de diferentes isoformas de ACC oxidase durante os picos de produção de etileno, sendo visto que três isoformas tiveram aumento e diminuição nesse período. Em *Nicotiana benthamiana*, a expressão do gene que codifica a ACC oxidase tem um aumento de três vezes após a inoculação com o fungo *Colletotrichum orbiculare* e esse aumento chega a seis vezes após 96 h de inoculação. Shan e Goodwin (2006) silenciaram o gene da ACC oxidase 1, o que resultou na diminuição da expressão desse gene de 7 a 9% em relação aos controles e mostrou que ocorreu uma significativa diminuição nos níveis de fatores de transcrição responsivos ao etileno e de duas glutatona S-transferase.

A enzima uroporfirinogênio descarboxilase foi encontrada apenas nas plantas inoculadas com *P. griseola* 12 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Essa enzima codificada pelo gene *HEME1* catalisa o quinto passo da biossíntese da porfirina (tetrapirrol) transformando uroporfirinogênio III em coproporfirinogênio III, que depois é oxidado a protoporfirinogênio IX (proto IX) (TANAKA & TANAKA, 2007). Cerca de 2% das proteínas codificadas por *A. thaliana* ligam-se a tetrapirróis, o que indica o importante papel desses compostos no metabolismo vegetal. A regulação da biossíntese de tetrapirróis é regulada, principalmente, em dois passos, sendo que um desses passos é a produção de proto IX, no qual a uroporfirinogênio descarboxilase atua. O proto IX é usado tanto para a produção de clorofila, quanto para a produção do composto heme (YURINA et al., 2012). Enzimas que participam ativamente no processo de detoxificação causada por espécies reativas de oxigênio, como catalase e peroxidase, possuem um grupo heme prostético (YURINA et al., 2012). Portanto, o aumento da expressão da uroporfirinogênio descarboxilase pode ser devido ao aumento da expressão dessas enzimas de detoxificação, o que necessitaria de mais grupos hemes para que essas enzimas possam atuar normalmente.

Foi observada a presença da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase subunidade C apenas nos géis das plantas inoculadas com esporos de *P. griseola* às 12 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Laxalt et al. (1996) ao realizar ensaios de *northern blot* observaram um aumento no acúmulo de transcritos para a subunidade C da GAPDH citosólica (GAPDHc) em folhas e caules de batata (*Solanum tuberosum*) quando inoculadas com *Phytophthora infestans*, fungo causador da requeima da batateira. Quando células do caule foram submetidas ao ácido eicosapentanóico, um elicitor encontrado em *P. infestans*, os níveis de transcritos para a GAPDHc também aumentaram e paralelamente houve indução do gene que codifica a enzima hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMGR), que participa da síntese de isoprenoides (fitoalexinas). Neste mesmo trabalho os autores submeteram tecidos foliares ao ácido salicílico, hormônio importante nas respostas de defesa das plantas, e constataram também um acúmulo de transcritos para a GAPDHc (PEREIRA, 2011; LAXALT et al., 1996). Zangh et al. (2011) também identificaram num genótipo resistente de soja (*Glycine max*), a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase subunidade C após inoculação do patógeno *Phytophthora sojae*, classificando essa enzima no grupo de proteínas envolvidas no metabolismo e regulação da energia.

A enzima tioredoxina teve sua expressão aumentada em 2,22 vezes, em porcentagem de volume, nos géis 2D das plantas inoculadas com *P. griseola* 24 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Tiorredoxinas são proteínas pequenas com aproximadamente 12 KDa, de ocorrência geral, com atividade redutora de pontes dissulfeto. Elas são oxidadas diretamente pelos ROS ou como consequência da sua habilidade de reduzir pontes dissulfeto de proteínas alvo como as peroxirredoxinas (tiorredoxina peroxidase). Há uma crescente evidência de que tiorredoxinas e proteínas similares são mediadores enzimáticos dos efeitos regulatórios das espécies reativas de oxigênio (ROS) nos níveis bioquímicos, transcricional e celular (NISHIYAMA et al., 2001). Compostos oxidantes produzidos pelos organismos incluem as ROS como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical superóxido ( $\dot{O}_2^-$ ), radical hidroxila (OH $\cdot$ ) e oxigênio singlete. Frente a uma situação de estresse biótico ou abiótico, tanto em plantas quanto em animais, uma resposta é disparada com o aumento de espécies reativas de oxigênio, especialmente  $\dot{O}_2^-$  e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Assim, a produção endógena de ROS é uma característica central e generalizada na resposta de plantas a situações de estresse (MAHALINGAM & FEDOROFF, 2003).

ROS podem influenciar na expressão gênica das células por meio de muitas rotas (Figura 3). Em muitos casos, ROS oxidam proteínas, particularmente

peroxirredoxinas e outras peroxidases e outros fatores de transcrição (ÅSLUND et al., 1999; MAHALINGAM & FEDOROFF, 2003).

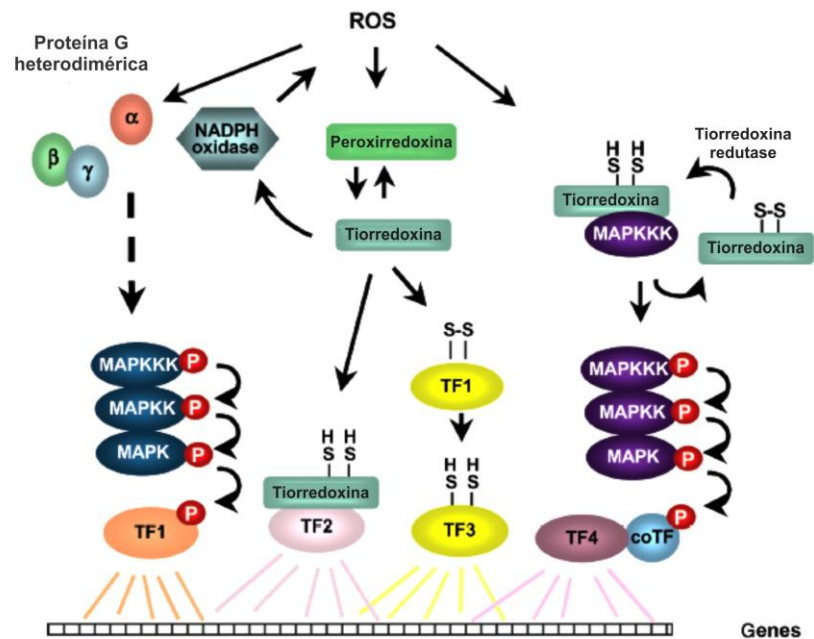


Figura 3. Potenciais rotas pelas quais os ROS podem influenciar na expressão gênica. MAPKs, *mitogen-activated protein* cinase; MAPKK, MAPK cinase; MAPKKK, MAPKK cinase, TFs, fatores de transcrição; coTF, cofator transcricional. Fonte: Modificada de Mahalingam e Fedoroff (2003).

Sun et al. (2010) avaliaram plantas de tabaco (*N. tabacum*) que produziam um tipo de tioredoxina em excesso e verificaram que as plantas exibiram resistência ao *Tabacco mosaic vírus*, *Cucumber mosaic virus*, e o estresse oxidativo provocado pelo herbicida Paraquat, em relação aos controles usados no experimento. Broin e Rey (2003) avaliaram plantas de batata transgênicas (*Solanum tuberosum*) que não possuíam o gene que codificava a CDSP32, um tipo de tioredoxina, e verificaram um aumento na peroxidação de lipídios das membranas dos tilacoides dessas plantas, evidenciando o papel importante que essa enzima possui na detoxificação das plantas em condições de estresse oxidativo.

Outra proteína diferencialmente expressa por AND 277, que está envolvida no metabolismo de ROS, foi a peroxirredoxina. Essa proteína teve sua expressão aumentada em 2,09 vezes nas plantas inoculadas com *P. griseola* 48 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Peroxirredoxinas (Prx) constituem o mais recente grupo identificado de enzimas antioxidantes que decompõem  $H_2O_2$ . Além de reduzir  $H_2O_2$ , as Prx também detoxificam hidroperóxidos alquilados e peroxinitrilas, apesar do fato de existir uma

significante diferença nas propriedades cinéticas da especificidade de substratos. Todas as Prx possuem uma estrutura proteica similar a das tioredoxinas e a massa molecular dessas proteínas é de 17 a 22 kDa. Três funções básicas podem ser atribuídas Prx como (i) antioxidantes, (ii) mediadores de vias de sinalização e (iii) sensores de oxirredução (DIETZ et al., 2006).

As Prx tem sido associadas à defesa das plantas contra patógenos. O nível de transcritos de Prx Q, um tipo de Prx, aumentou nas folhas de *Populus trichocarpa* em resposta à infecção causada por *Melampsora larici populina* (ROUHIER et al., 2004). Kiba et al. (2005) isolaram proteínas com atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea*, e a Prx Q estava presente nos isolados. O gene codificador dessa Prx chamado de *GtAFPI* foi induzido pelo ácido salicílico, mas não por metil jasmonato. A superexpressão da proteína recombinante em tabaco (*N. tabacum*) aumentou a tolerância a doenças fúngicas e o estresse oxidativo causado pelo herbicida Paraquat. Os autores concluíram que a Prx Q pode atuar como uma proteína de defesa contra doenças e estresse oxidativo, além de sugerirem essa proteína como um gene alvo para a engenharia genética na construção de plantas resistentes a doenças (DIETZ et al., 2006).

Neste trabalho foi encontrada uma diminuição da expressão das proteínas de ligação à subunidade  $\alpha$  e  $\beta$  da rubisco da ordem de 2,7 a 3,7 vezes nas plantas inoculadas com *P. griseola*, (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). As proteínas de ligação à subunidade  $\alpha$  e  $\beta$  da rubisco, também conhecidas como chaperoninas 60  $\alpha$  e 60  $\beta$ , respectivamente, participam do processo de montagem do oligômero da rubisco. Chaperoninas ou chaperonas moleculares são proteínas que ajudam no dobramento ou degradação de outras proteínas e estão presentes em procariotos ou organelas como mitocôndrias ou plastídios. Entretanto, em alguns trabalhos de proteômica recentes essas proteínas têm apresentado diferenças de expressão, como o aumento de expressão em arroz (*Oryza sativa*) devido a baixas temperaturas (CUI et al., 2005) e diminuição da expressão em arroz devido a ausência de luz (YANG et al., 2007). Durante a infecção, muitas mudanças podem ocorrer em tecidos de plantas hospedeiras. Uma delas consiste no decréscimo da taxa de fotossíntese, como mostrado por Tremblay et al. (2010), que verificaram decréscimo na fotossíntese da soja (*Glycine max*) infectada por *Phakopsora pachyrhizi*, fungo causador da ferrugem asiática da soja. Neste trabalho foi encontrada uma diminuição da expressão dessas proteínas, evidenciando uma possível diminuição da taxa fotossintética. Outro fato notado foi a presença de isoformas da chaperonina  $\alpha$  que apresentaram diferença de expressão. No *match* ID 1396 o PI observado foi de 4,85 e massa molecular de 64.540 Da e no *match* ID 1392 o PI foi de 4,80 e massa molecular

de 64.745 Da (Figura 4). Esses valores obtidos experimentalmente indicam uma possível modificação pós traducional nessas proteínas que não foi notada durante a identificação. Novas buscas serão feitas a fim de identificar se o peptídeo modificado será encontrado.

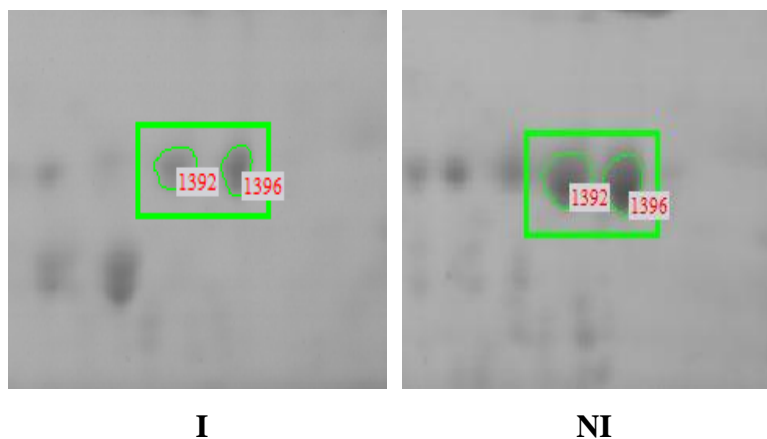


Figura 4. Duas isoformas de chaperonina 60 kDa subunidade  $\alpha$  que tiveram redução da expressão nos genótipos AND 277 inoculados. I, inoculado; NI, não inoculado.

Outro fato que justifica essa diminuição da fotossíntese foi a redução da expressão da rubisco ativase em quase duas vezes (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). A rubisco ativase é uma enzima que promove a adição de uma molécula de  $\text{CO}_2$  a um grupo  $\epsilon$ -amino de uma lisina presente no sítio ativo da rubisco promovendo sua ativação. A restauração da rubisco também pode ser promovida pela rubisco ativase, quando essa enzima remove, com gasto de ATP, a ribulose-1,5-bisfosfato do sítio ativo da rubisco (PORTIS, 2003). A rubisco ativase é um novo tipo de chaperona, que neste caso funciona como uma proteína que mantém a função catalítica da rubisco. Devido ao fato dessa enzima possuir a capacidade de regular a atividade fotossintética, ela tem sido alvo de muitos testes de melhoramento genético enzimático no intuito de obter uma forma capaz de aumentar as taxas de fotossíntese (SPREITZER, 1999).

A proteína 1 de evolução do oxigênio esteve presente somente nos géis 2D da plantas inoculadas com *P. griseola* (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Proteínas de evolução do oxigênio (*Oxygen evolving enhancer proteins*) consistem de três subunidades: OEE 1 (33 KDa), OEE 2 (23 KDa) e OEE 3 (16 KDa). Essas três proteínas ligam-se ao fotosistema II na região luminal da membrana do tilacoide. A expressão de OEE 1 é considerada um passo limitante na montagem do fotosistema II (MIZOBUCHI & YAMAMOTO, 1989) e sua ausência nas plantas controle seria um fato que

provavelmente ocasionaria a morte das plantas devido a deficiência fotossintética. Uma possível explicação para a presença da OEE 1 num local do gel nas plantas inoculadas, que não ocorre no gel das plantas controle, seria uma modificação pós traducional ocasionada pelo estresse devido a inoculação do patógeno, que mudaria o ponto isoelétrico e a massa molecular dessa proteína fazendo-a migrar para um local atípico no gel 2D.

A enzima isopentenil pirofosfato isomerase foi encontrada apenas nos géis bidimensionais das plantas inoculadas com *P. griseola* (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Os pigmentos carotenoides são componentes essenciais das membranas fotossintéticas de todas as plantas, algas e cianobactérias e possuem uma variedade extraordinária de funções em plantas (CUNNINGHAM & GANTT, 1998). A enzima isopentenilpirofosfato isomerase - IPP isomerase catalisa a primeira reação na via de biossíntese do  $\beta$ -caroteno. Essa enzima promove a isomerização do isopentenil pirofosfato (IPP) em sua forma alílica chamada dimetilalil pirofosfato (DMAPP), que de início é o substrato ativado para a formação de longas cadeias de poli-isoprenóides. Essa reação de isomerização é reversível e seria improvável da IPP isomerase ser uma enzima candidata como reguladora da via de biossíntese de isoprenóides (CUNNINGHAM & GANTT, 1998). Entretanto, tem sido demonstrado que a atividade dessa enzima é limitante na produção de isoprenóides em *E. coli*, como indicado pela acumulação de carotenoides em estirpes engenheradas para produzir esse pigmento. A introdução de qualquer número de cópias de cDNA da IPP isomerase de diferentes plantas, algas ou levedura, ou cópias adicionais em *E. coli* aumenta o acúmulo de carotenoides em várias vezes. Essa observação aumenta a possibilidade da atividade da IPP isomerase ser limitante da biossíntese de carotenoides ou outros isoprenóides em plantas (CUNNINGHAM & GANTT, 1998).

Em um trabalho realizado por Lee et al. (2009) com feijão (*P. vulgaris*) inoculado com esporos de *Uromyces appendiculatus*, agente causador da ferrugem do feijoeiro, foi identificado a presença da IPP isomerase 72 h.a.i. e sua presença atribuída à produção de isoprenóides, flavonóides e fitoalexinas que são parte do sistema de resistência mediado por ácido salicílico.

As fitoalexinas são moléculas com atividade antibióticas (ODJAKOVA & HADJIIIVANOVA, 2001) e muitas plantas secretam e acumulam fitoalexinas para resistir à infecção por fungos e bactérias (CAI et al., 2009). As fitoalexinas são sesquiterpenos, um grande grupo de isoprenóides, incluindo óleos essenciais e compostos antibióticos (IRITI & FAORO, 2009). Sua síntese ocorre a partir do

mevalonato e a enzima IPP isomerase tem um papel central nessa via (letra c na Figura 5), o que pode explicar sua presença nas plantas inoculadas com o patógeno.

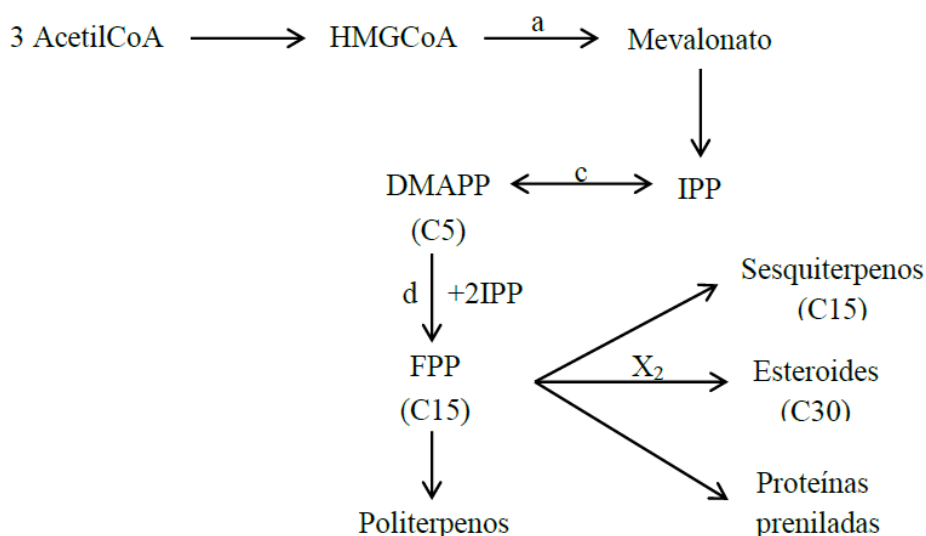


Figura 5. Biossíntese de sesquiterpenos em plantas. Nota: AcetylCoA, acetil coenzima A; HMGCoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A; IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; FPP, farnesil pirofosfato; a, HMGCoA redutase; b, 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato; c, isopentenil pirofosfato isomerase; d, prenil transferase. Fonte: Modificada de Cai et al. (2009).

A glicil-tRNA sintetase foi uma proteína encontrada somente nos géis 2D das plantas não inoculadas com *P. griseola* (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Aminoacil-tRNA-sintetases possuem um papel crucial na síntese proteica na reação de adição de aminoácidos em seus t-RNAs cognatos (DUCHÊNE et al., 2001). Uma explicação para a ausência dessa proteína nos géis 2D das plantas inoculadas seria uma interrupção da síntese proteica causada pelo ataque do patógeno. Uwer et al. (1998) analisaram o mutante recessivo de *A. thaliana* para o gene *edd1*, que não passava da fase de desenvolvimento embrionário globular para cordiforme. Os autores identificaram que a inserção de um transposon ocorria no gene que codificava uma glicil-tRNA-sintetase, evidenciando a importância dessa proteína para o desenvolvimento normal das plantas. Devido à importância dessa proteína para o desenvolvimento normal da planta, conforme relatado por Uwer et al. (1998), a ausência dessa proteína nas plantas inoculadas é pouco provável. A explicação mais plausível é que, nas plantas não inoculadas possa ter ocorrido uma mudança pós traducional na glicil-tRNA-sintetase que não ocorreu nas plantas inoculadas. Essa modificação alteraria o PI e massa molecular da proteína que provocaria uma migração diferente na focalização isoeletrica e no SDS-PAGE que não ocorre nas plantas inoculadas.

#### 4. CONCLUSÕES

As proteínas encontradas diferencialmente expressas pelo genótipo do feijoeiro comum AND 277 estão potencialmente envolvidas com mecanismos de defesa desenvolvidos pela planta em resposta à inoculação de *P. griseola*. Proteínas envolvidas diretamente no metabolismo de espécies reativas de oxigênio, uma forma de defesa das plantas contra patógenos, como tioredoxina e peroxirredoxina tiveram sua expressão aumentada nas plantas inoculadas em resposta à invasão de *P. griseola*. Proteínas envolvidas com a fotossíntese tiveram sua expressão diminuída, como as chaperoninas 60 kDa subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , juntamente com a rubisco ativase, o que mostra uma diminuição das taxas fotossintéticas das plantas inoculadas.

Outras proteínas como a ACC oxidase, que participa diretamente da síntese de etileno, hormônio de notável importância nos processos de defesa das plantas e IPP isomerase que participa na via biosintética de síntese de isoprenoides, compostos importantes na síntese de fitoalexinas, foram expressas somente nas plantas inoculadas. Tal fato pode indicar que o etileno é um potencial ativador dos mecanismos de defesa do feijoeiro em resposta a *P. griseola* e que as fitoalexinas podem ter um papel fundamental nesse mecanismo. Outras proteínas como a glicina desidrogenase, gliceraldeído-3-fosfato subunidade C, que também sofreram alteração de expressão, também estão envolvidas em processos de defesa dos vegetais, como demonstrado em outros trabalhos.

A metodologia de eletroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massas foi capaz de identificar proteínas diferencialmente expressas pelo feijoeiro comum em resposta à infecção causada por *P. griseola*. Um total de 13 proteínas foram identificadas sendo muitas delas diretamente envolvidas em processos de defesa.

Os resultados deste trabalho são importantes sob o ponto de vista fitopatológico, fisiológico, bioquímico e genético, pois apontam proteínas importantes que podem ser exploradas para o desenvolvimento de cultivares resistentes à mancha angular do feijoeiro.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, K. M. A. **Piramidação de genes de resistência à Antracnose, Ferrugem e Mancha Angular e estudos de alelismo em feijão comum.** 2009. 129 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

ÅSLUND, F. et al. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol—disulfide status. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 11, p. 6161-6165, 1999.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BROIN, M.; REY, P. Potato plants lacking the CDSP32 plastidic thioredoxin exhibit overoxidation of the BAS1 2-cysteine peroxiredoxin and increased lipid peroxidation in thylakoids under photooxidative stress. **Plant Physiology**, v. 132, n. 3, p. 1335-1343, 2003.

BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.

CAI, Y.; XIAOHONG, H.; MO, J.; SUN, Q.; YANG, J.; LIU, J. Molecular research and genetic engineering of resistance to *Verticillium* wilt in cotton: a review. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 25, p. 7363-7372, 2009.

CHANDOK, M. R.; YTTERBERG, A. J.; VAN WIJK, K. J.; KLESSIG, D. F. The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the p protein of the glycine decarboxylase complex. **Cell**, v. 113, n. 4, p. 469-482, 2003.

CHEN, N.; GOODWIN, P. H.; HSIANG, T. The role of ethylene during the infection of *Nicotiana tabacum* by *Colletotrichum destructivum*. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 392, p. 2449-2456, 2003.

CUI, S.; HUANG, F.; WANG, J.; MA, X.; CHENG, Y.; LIU, J. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. **Proteomics**, v. 5, n. 12, p. 3162-3172, 2005.

CUNNINGHAM, F. X.; GANTT, E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, n. 1, p. 557-583, 1998.

DE STEFANO, M.; FERRARINI, A.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide functions in the plant hypersensitive disease resistance response. **BMC Plant Biology**, v. 5, n. 1, p. S10, 2005.

DIETZ, K.-J.; JACOB, S.; OELZE, M.-L.; LAXA, M.; TOGNETTI, V.; DE MIRANDA, S. M. N.; BAIER, M.; FINKEMEIER, I. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 8, p. 1697-1709, 2006.

DUCHÊNE, A.-M.; PEETERS, N.; DIETRICH, A.; COSSET, A.; SMALL, I. D.; WINTZ, H. Overlapping destinations for two dual targeted Glycyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 15275-15283, 2001.

ELAD, Y. Production of ethylene by tissues of tomato, pepper, french-bean and cucumber in response to infection by *Botrytis cinerea*. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 36, n. 4, p. 277-287, 1990.

GE HEALTHCARE. **2 – D Electrophoresis** – Principles and Methods. Handbook 80-6429-60AD, 2010.

HOLMES, M. R.; RAMKISSOON, K. R.; GIDDINGS, M. C. Proteomics and protein identification. In. BAXEVANIS, A. D.; OUELLETTE, B. F. F. (Eds.) **Bioinformatics** – A practical guide to the analysis of genes and proteins. 3. Ed. John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 445-472.

IRITI, M.; FAORO, F. Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 8, p. 3371-3399, 2009.

KIBA, A.; NISHIHARA, M.; TSUKATANI, N.; NAKATSUKA, T.; KATO, Y.; YAMAMURA, S. A Peroxiredoxin Q homolog from gentians is involved in both resistance against fungal disease and oxidative stress. **Plant Cell Physiology**, v. 46, n. 6, p. 1007-1015, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAXALT, A. M.; CASSIA, R. O.; SANLLORENTI, P. M.; MADRID, E. A.; ANDREU, A. B.; DALEO, G. R.; CONDE, R. D.; LAMATTINA, L. Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. **Plant Molecular Biology**, v. 30, n. 5, p. 961-972, 1996.

LEE, J.; FENG, J.; CAMPBELL, K. B.; SCHEFFLER, B. E.; GARRETT, W. M.; THIBIVILLIERS, S.; STACEY, G.; NAIMAN, D. Q.; TUCKER, M. L.; PASTOR-CORRALES, M. A.; COOPER, B. Quantitative proteomic analysis of bean plants infected by a virulent and avirulent obligate rust fungus. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 19-31, 2009.

LIEBLER, D. C. **Introduction to proteomics: tools for new biology**. Totowa: Humana Press, 2002. 210 p.

LIU, Y.; ZHANG, S. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3386-3399, 2004.

MAHALINGAM, R.; FEDOROFF, N. Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, v. 119, n. 1, p. 56-68, 2003.

MATRIX SCIENCE. Disponível em: <<http://www.matrixscience.com/>>. Acesso em: 16 Mai. 2012.

MIZOBUCHI, A.; YAMAMOTO, Y. Assembly of photosystem II polypeptides and expression of oxygen evolution activity in the chloroplasts of *Euglena gracilis* Z during the dark-light transition. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 977, n. 1, p. 26-32, 1989.

MODOLO, L. V.; CUNHA, F. Q.; BRAGA, M. R.; SALGADO, I. Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. meridionalis elicitor. **Plant Physiology**, v. 130, n. 3, p. 1288-1297, 2002.

NAVARRE, D. A.; WOLPERT, T. J. Inhibition of the glycine decarboxylase multienzyme complex by the host-selective toxin victorin. **The Plant Cell**, v. 7, n. 4, p. 463-71, 1995.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 25 Mar. 2012.

NIETSCHKE, S.; BORÉM, A.; ASSIS DE CARVALHOS, G.; DE PAULA JÚNIOR, T.; FORTES FERREIRA, C.; GONÇALVES DE BARROS, E.; ALVES MOREIRA, M. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the state of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, v. 117, n. 1, p. 77-84, 2001.

NISHIYAMA, A.; MASUTANI, H.; NAKAMURA, H.; NISHINAKA, Y.; YODOI, J. Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins. **IUBMB Life**, v. 52, n. 1, p. 29-33, 2001.

ODJAKOVA, M.; HADJIIVANOVA, C. The complexity of pathogen defense in plants. **Bulgarian Journal Plant Physiology**, v. 27, n. 1-2, p. 101-109, 2001.

PEREIRA, M. R. **Identificação de proteínas diferencialmente expressas em folhas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em resposta a *Phakopsora pachyrhizi***. 2011. 56 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

PHYTOZOME. Disponível em: <<http://www.phytozome.com/>>. Acesso em: 13 Jun. 2012.

PORTIS, A. Rubisco activase – Rubisco's catalytic chaperone. **Photosynthesis Research**, v. 75, n. 1, p. 11-27, 2003.

ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; GUALBERTO, J. M.; JORDY, M.-N.; DE FAY, E.; HIRASAWA, M.; DUPLESSIS, S.; LEMAIRE, S. D.; FREY, P.; MARTIN, F.; MANIERI, W.; KNAFF, D. B.; JACQUOT, J.-P. Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. **Plant Physiology**, v. 134, n. 3, p. 1027-1038, 2004.

SARMA, A. D.; OEHRLE, N. W.; EMERICH, D. W. Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 379, n. 2, p. 192-195, 2008.

SARTORATO, A. Novas fontes de resistência do feijoeiro comum à mancha angular. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 192-194, 2006.

SCHOMBURG, D.; SCHOMBURG, I. **Springer Handbook of Enzymes**. In: SCHOMBURG, D. e SCHOMBURG, I. (Ed.): Springer Berlin Heidelberg, v. 22, 2005. p. 371-377.

SHAN, X.; GOODWIN, P. Silencing an ACC oxidase gene affects the susceptible host response of *Nicotiana benthamiana* to infection by *Colletotrichum orbiculare*. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 3, p. 241-247, 2006.

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, 2007.

SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2199-2223, 2010.

SPREITZER, R. J. Questions about the complexity of chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. **Photosynthesis Research**, v. 60, n. 1, p. 29-42, 1999.

SUN, L.; REN, H.; LIU, R.; LI, B.; WU, T.; SUN, F.; LIU, H.; WANG, X.; DONG, H. An h-type thioredoxin functions in tobacco defense responses to two species of viruses and an abiotic oxidative stress. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, n. 11, p. 1470-1485, 2010.

TANAKA, R.; TANAKA, A. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, n. 1, p. 321-346, 2007.

TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; ALKHAROUF, N. W.; LI, S.; MATTHEWS, B. F. Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 183-193, 2010.

UWER, U.; WILLMITZER, L.; ALTMANN, T. Inactivation of a glycyl-tRNA synthetase leads to an arrest in plant embryo development. **The Plant Cell**, v. 10, n. 8, p. 1277-1294, 1998.

WANG, K. L.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The Plant Cell**, v. 14, p. S131-S151, 2002.

YANG, P.; CHEN, H.; LIANG, Y.; SHEN, S. Proteomic analysis of de-etiolated rice seedlings upon exposure to light. **Proteomics**, v. 7, n. 14, p. 2459-2468, 2007.

YURINA, N. P.; OSIPENKOVA, O. V.; ODINTSOVA, M. S. Higher plant tetrapyrrols: their biosynthesis and its regulation, tetrapyrrol role in transmission of retrograde signals. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 59, n. 1, p. 1-13, 2012.

ZHANG, Y.; ZHAO, J.; XIANG, Y.; BIAN, X.; ZUO, Q.; SHEN, Q.; GAI, J.; XING, H. Proteomics study of changes in soybean lines resistant and sensitive to *Phytophthora sojae*. **Proteome Science**, v. 9, n. 1, p. 52-64, 2011.

## CAPÍTULO 2

### PROTEOMA DIFERENCIAL DO FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO POR *Colletotrichum lindemuthianum*

#### 1. INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos mais importantes constituintes da dieta da população brasileira, por ser reconhecidamente uma excelente fonte proteica, além de possuir bom conteúdo de carboidratos e ser rico em ferro (BORÉM & CARNEIRO, 2006). Dentre milhares de tipos de legumes, o feijoeiro comum é a espécie mais utilizada para a alimentação. Em países como o Brasil e o México, o feijoeiro comum é a fonte primária de proteínas na dieta humana (BROUGHTON et al., 2003).

As doenças que ocorrem na cultura do feijoeiro constituem uma das principais causas da sua baixa produtividade no Brasil. Muitas delas podem causar, dependendo das condições climáticas, redução significativa da produtividade ou mesmo inviabilizar determinadas áreas para o cultivo (PAULA JR. & ZAMBOLIM, 2006).

A antracnose, provocada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.)

Scrib., é uma das doenças de maior importância da cultura do feijoeiro comum e afeta, em todo o mundo, as cultivares suscetíveis estabelecidas em locais com temperaturas moderadas e alta umidade relativa (BIANCHINI et al., 2005). A melhor medida para o controle da doença é o plantio de cultivares resistentes. Porém, a alta variabilidade do patógeno dificulta a obtenção de variedades com resistência durável (DI PIERO & GARDA, 2008).

A proteômica tornou-se componente integral dos estudos de larga escala conhecidos como “Ômicas”. Estudos de proteômica têm sido conduzidos para o entendimento da interação planta-patógeno, patogenicidade fúngica e virulência. Essas ferramentas de análise de larga escala em combinação com a mutagênese, ou estudos de transgenia tem revelado, em níveis moleculares, como essa interação se processa (GONZALEZ-FERNANDEZ & JORRIN-NOVO, 2012).

Diante dos problemas causados por *C. lindemuthianum* na cultura do feijoeiro, objetivou-se com este trabalho, a identificação de proteínas diferencialmente expressas pelo feijoeiro comum em resposta à infecção desse patógeno.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal e inoculação**

O cultivar de feijão utilizado neste experimento (AND 277) foi disponibilizado pelo Banco Ativo de Germoplasma do Feijoeiro (BAG) do BIOAGRO, UFV – MG. AND 277 é um feijão andino, possuidor dos alelos *Co-1* e *Co-3*, que confere resistência a diversas raças do fungo *C. lindemuthianum*, conforme relatado por Arruda (2009). Três sementes da cultivar AND 277 foram semeadas em cada um dos 18 vasos de 2,5 L contendo uma mistura de solo e esterco curtido na proporção de 4:1. Os vasos foram mantidos em casa da vegetação até o momento da inoculação. Quando as plantas atingiram o estágio fenológico V3, aproximadamente 15 dias após a emergência, foram inoculadas com esporos da raça 73 de *C. lindemuthianum* suspensos em água, na concentração de  $1,2 \times 10^6$  esporos/mL. Foi utilizado neste trabalho o isolado 497 caracterizado por Rava et al. (1994), que é incompatível com AND 277. A cultura desse isolado é mantida na micoteca do Programa de Melhoramento do Feijoeiro do BIOAGRO/UFV. A inoculação foi realizada na face adaxial e abaxial dos trifólios utilizando um atomizador De Vilbiss nº 15 acionado por compressor elétrico. Após a inoculação, as plantas foram mantidas na câmara de nevoeiro a  $20 \pm 2$  °C sob fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa superior a 95 %. Foi coletado um trifólio de cada uma das três plantas por vaso para constituir cada uma das três repetições nos tempos de coleta 12 e 48 horas após inoculação. Para cada tempo de inoculação foi utilizado um controle não inoculado (apenas borrifado com água). Assim, foram analisados ao todo quatro tratamentos, sendo três repetições para cada tratamento. Apenas com o propósito de certificar a avirulência do isolado, plantas do cultivar suscetível Rudá foram inoculadas. As folhas coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o momento da extração das proteínas.

### **2.2. Extração de proteínas**

Foi utilizado o protocolo baseado na extração proposta por Sarma et al. (2008), com algumas modificações. As amostras foram pulverizadas em gral de porcelana na presença de nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido. O pó obtido foi transferido para tubos Falcon de 50 mL previamente resfriados com N<sub>2</sub> líquido. Foram adicionados 8 mL de solução tampão gelada contendo: fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) 1 mM; Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 10 mM, ditioneitol (DTT) 50 mM,

inibidor de protease (código P9599, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e água ultrapura q.s.p. 8 mL. Para a obtenção de um pó ainda mais fino, as amostras foram trituradas com o auxílio de um *Polytron homogenizer* (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY, EUA) por um min. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 8.000 x g por 20 min, a 4 °C. As demais centrifugações foram realizadas sob as mesmas condições. A fase aquosa foi coletada e transferida para novos tubos de 50 mL, enquanto que o *pellet* foi descartado.

Foram adicionados 5 mL de fenol tamponado pH 8,0 à fase aquosa e os tubos foram agitados por 30 min em um agitador. Após essa fase, o líquido foi transferido para tubos de 15 mL e esses tubos foram centrifugados por 20 min, a 4 °C. Posteriormente, a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo de 50 mL e o procedimento anterior foi repetido, porém, com a adição de 3 mL de fenol. A fase orgânica inferior obtida nas duas etapas anteriores foi transferida para um tubo de 50 mL e foram adicionados 25 mL de acetato de amônio 0,1 M em metanol 100% (v/v) gelado acrescido de DTT 10 mM. Os tubos foram deixados a -80 °C *overnight* para a precipitação das proteínas.

Após a precipitação das proteínas, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com acetato de amônio 0,1 M em metanol 100% (v/v) gelado por duas vezes, agitados em *vortex* e, depois, centrifugados. As amostras foram também lavadas com acetona 80% (v/v) e etanol 90% (v/v), uma vez com cada solução, agitadas em *vortex* e, depois, centrifugadas.

Após as lavagens, o *pellet* foi mantido à temperatura ambiente para a evaporação completa do etanol. O tempo aproximado de secagem foi de duas horas. O *pellet* final foi ressuscitado em tampão contendo ureia 7 M, tiourea 2 M e 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato (CHAPS) 4% (m/v) e agitado em um banho seco (Mixing Bloc MB-102 BIOER) na velocidade de 1.500 rpm.

Por fim, as amostras foram sonicadas em sonicador da marca *UltraSonic Processor* (Modelo GE 50), por 5 s, por três vezes, até a completa solubilização das proteínas. A potência utilizada foi de 10% da potência máxima do aparelho e as amostras permaneceram em gelo durante o processo. Depois de solubilizadas, as amostras foram clarificadas com centrifugação a 10.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e armazenados a -80 °C.

### **2.3. Quantificação de proteínas**

A quantificação das proteínas totais foi realizada utilizando o método de Bradford (1976), tendo a albumina sérico bovina como padrão.

### **2.4. Eletroforese bidimensional (2-DE)**

#### **2.4.1. Reidratação das tiras de gel**

Foram utilizadas tiras de 18 cm com gradiente linear de pH de 4,0 a 7,0 (código 17-1233-01, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). A reidratação foi realizada durante 18 h em aparato de reidratação *reswelling tray* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) utilizando solução de reidratação *DeStreak* (código 17-6003-19, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) e tampão IPG 2% (v/v) (código 17-6000-86, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). Foi aplicado 1 mg de proteína para cada tira, sendo o volume final de 340  $\mu$ L (GE HEALTHCARE, 2010).

#### **2.4.2. Focalização isoelétrica (IEF)**

A focalização Isoelétrica (IEF) foi realizada no equipamento *IPGphor III* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). O programa *Ettan IPGphor III Control Software* foi utilizado para monitoramento e programação dos parâmetros da corrida eletroforética nas tiras de gel, com as seguintes etapas: 1) 200 V em passo único por 14 h; 2) 500 V em passo único por 1 h; 3) 800 Vxh em gradiente até 1.000 V; 4) 16.500 Vxh em gradiente até 10.000 V; 5) 18.200 Vxh em passo único de 10.000 V; 6) 5.000 V em passo único por 5 h (GE HEALTHCARE, 2010). A corrente utilizada foi no máximo de 75  $\mu$ A para cada tira. As tiras contendo as amostras foram cobertas usando cerca de 8 mL de *Immobiline DryStrip Cover Fluid* (código 17-1335-01, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) para cada caneta do *manifold*. Após a focalização as tiras foram imediatamente armazenadas a -80 °C para posterior utilização.

### **2.4.3. Equilíbrio das tiras de gel**

Após a IEF, as tiras foram equilibradas sob constante agitação em 10 mL de tampão de equilíbrio, contendo Tris-HCl 75 mM pH 8,8, ureia 6 M, glicerol 30% (v/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,002% (m/v) (GE HEALTHCARE, 2010). Foram realizadas duas etapas de equilíbrio de 30 min cada. Durante a primeira etapa foi adicionado 1,5% (m/v) de DTT ao tampão de equilíbrio e na segunda, 2,5% (m/v) de iodoacetamida. Após os dois passos de equilíbrio, as tiras foram submersas por alguns segundos em tampão de corrida e, em seguida, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

### **2.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A segunda dimensão da eletroforese foi efetuada com base na metodologia descrita por Laemmli (1970), em gel de separação na concentração de 12,5% (m/v) de poliacrilamida, em cuba tipo DaltSix (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). A corrida foi feita em uma primeira etapa com uma corrente de 10 mA/gel, voltagem de 80 V e potência de 1 W/gel por 60 min e, em seguida, a uma corrente de 40 mA/gel, voltagem de 500 V e potência de 13 W/gel, até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel (GE HEALTHCARE, 2010). A temperatura foi mantida a 8 °C por meio de refrigeração com circulador termostático.

### **2.5. Coloração dos géis**

Após o término da 2ª dimensão, os géis foram fixados com uma solução contendo ácido fosfórico 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) por aproximadamente 12 h. Posteriormente, essa solução foi retirada e a solução de coloração contendo sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v), *Coomassie blue* G-250 0,08% (v/v) e etanol 20% (v/v) (GE HEALTHCARE, 2010). A solução de coloração foi mantida em contato com os géis por 48 h e depois descartada. Em seguida, uma solução de descoloração contendo ácido acético 5% (v/v) foi adicionada e os géis foram estocados com essa mesma solução até a retirada dos *spots* para tripsinização.

## 2.6. Captura das imagens e análise da expressão

As imagens dos géis foram digitalizadas usando o *Image Scanner III* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) no modo de escaneamento transparente, resolução de 300 dpi, filtro de cor vermelho e com fórmula de calibração atualizada. As imagens foram calibradas com o *software Labscan* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). As análises comparativas das imagens digitais obtidas foram efetuadas utilizando o software *Image Master 2D Platinum 7.1* (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido). A comparação foi feita entre o controle não inoculado e o inoculado para cada tempo de inoculação, considerando três repetições biológicas para cada tratamento. Nas análises foram considerados *spots* diferencialmente expressos aqueles que apresentaram uma variação de sobreposição de medidas (*ratio*) acima de 1,5 e ANOVA com p valor menor que 0,05. Para os *spots* diferencialmente expressos foi calculada uma porcentagem de seu volume e a comparação desses valores indicou a diferença de expressão entre os tratamentos.

## 2.7. Tripsinização das amostras

Os *spots* correspondentes a proteínas diferencialmente expressas foram retirados dos géis e submetidos à digestão com tripsina no gel, segundo o protocolo de Shevchenko et al. (2007), com algumas modificações. Os pedaços de gel foram transferidos para uma placa de polipropileno de 96 poços MicroAmp<sup>®</sup> (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) previamente lavada em dois banhos de metanol. A descoloração das proteínas no gel foi feita com uma solução contendo acetonitrila 50% (v/v) e bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 por duas vezes, sendo uma lavagem durante a noite e outra de 1 h no dia seguinte, todas elas incubadas à temperatura de 25 °C e agitação a 1.400 rpm em um banho seco. Duas lavagens também foram feitas com uma solução contendo metanol 50% (v/v) e ácido acético 5% (v/v) por duas horas sob as mesmas condições citadas acima.

A seguir, a solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila pura por 10 min e secos em *Speed Vac Concentrator Plus* (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Alemanha) por 15 min. As proteínas foram, então, reduzidas com DTT a 20 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0 por 30 min a 56 °C, em banho seco, a 500 rpm. Após esta etapa, as proteínas foram alquiladas com iodoacetamida 75 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, pH 8,0 por 30 min, a 25 °C, na ausência de luz, e incubadas em banho seco a 500 rpm.

Sequencialmente, os pedaços de gel foram, por duas vezes, lavados em bicarbonato de amônio a 100 mM, pH 8,0 por 10 min, desidratados em acetonitrila pura por 5 min e secos em *Speed Vac Concentrator Plus* por 15 min.

A digestão foi realizada utilizando tripsina (Trypsin Gold, Mass Spectrometry grade, Promega V5280, Madison, WI, EUA). A enzima (100 µg) foi ressuspensa em 100 µL de ácido acético 50 mM. A solução de clivagem foi feita a partir da solução estoque da tripsina (1.000 ng/µL) acrescentando um volume da solução de bicarbonato de amônio 40 mM acetonitrila 10% pH 8,0, de modo que a concentração final da enzima ficasse a 25 ng/µL. Para cada amostra, foram aplicados 20 µL de solução de clivagem de forma a cobrir os pedaços de gel. As amostras foram mantidas em gelo por 45 min para que a enzima pudesse penetrar no gel sem que se iniciasse a digestão. Após este período, 50 µL da solução de bicarbonato de amônio 40 mM/acetonitrila 10% (v/v), pH 8,0, foram adicionados a cada tubo. As amostras foram, então, incubadas a 37 °C por 16 h (*overnight*) em banho seco a 500 rpm.

Após a digestão, a placa com os pedaços de gel foi colocada num banho de ultrassom (Branson Ultrasonic BV Co., CT, EUA) por 10 min, em seguida agitadas em banho seco a 1.400 rpm por 2 min e toda a solução dessa placa foi removida para uma nova placa. A cada pedaço de gel restante, em duas etapas sequenciais, foram adicionados 30 µL da solução de ácido fórmico 5% (v/v) acetonitrila 50% (v/v), sendo submetidos a agitação por 2 min a 1.400 rpm e incubados por 15 min em repouso a temperatura ambiente, 10 min no banho ultrassom e mais 2 min no banho seco a 750 rpm. Toda a solução foi removida e adicionada à solução da nova placa. As amostras, contendo os peptídeos tripticos, foram concentradas até a secagem completa em *Speed Vac Concentrator Plus*. Os peptídeos foram posteriormente ressuspensos em solução de ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) e posteriormente dessalinizados em coluna de hidrofobicidade C18 (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, Alemanha).

## **2.8. Espectrometria de massas**

A identificação de proteínas foi realizada utilizando um espectrômetro de massas do tipo AB SCIEX TOF/TOF™ 5800 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) disponibilizado pelo Núcleo de Proteoma do Laboratório de Toxinologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ). Para isso, as amostras de 0,3 µL juntamente com 0,3 µL de matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (código C2020, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) foram aplicadas em uma placa de aço. Após a secagem da preparação, os fragmentos resultantes da digestão triptica foram analisados para a obtenção das listas

de massas dos peptídeos e seus fragmentos. A ionização dos peptídeos para a fase gasosa foi feita a técnica de MALDI e o método de detecção das massas obtida por detector do tipo TOF/TOF. A fragmentação foi realizada pelo método PSD para os 15 peptídeos mais intensos de cada amostra.

## **2.9. Identificação das proteínas em bancos de dados**

A identificação das proteínas foi feita pela busca no banco de dados público do Phytozome, onde se encontram as sequências obtidas pelo sequenciamento do genoma do feijoeiro comum (PHYTOZOME, 2012). Os dados do MS/MS *ion search* foram utilizados para a busca das proteínas pelo *software* Mascot versão 2.2.07 (MATRIX SCIENCE, 2012) num sistema de busca local, considerando os seguintes parâmetros: duas de clivagens perdidas, erro de 0,1 Da para identificação de peptídeos e proteínas e modificações variáveis nos peptídeos e aminoácidos sendo a carbamidometilação da cisteína, oxidação da metionina e deaminação da asparagina e glutamina. Como o genoma do feijoeiro ainda encontra-se em fase de anotação das suas sequências, após a identificação das proteínas do feijoeiro e confirmação com o *software* Scaffold (Proteome Software, Inc., Portland, OR, EUA), foi realizada uma busca por similaridades de sequências utilizando o algoritmo BlastP (*Basic Local Alignment Search Tool*) nos bancos de dados não redundantes do NCBI para a identificação das proteínas (NCBI, 2012).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cultivares AND 277 e Rudá apresentaram diferentes respostas quando inoculadas com a raça 73 de *C. lindemuthianum*. Quinze dias após a inoculação, plantas da cultivar AND 277 não mostraram sintomas da doença enquanto que a cultivar Rudá apresentou sintomas típicos da doença como escurecimento das nervuras na face abaxial das folhas e necroses adjacentes à essas nervuras. Portanto, a raça 73 é avirulenta a cultivar AND 277 e virulenta a cultivar Rudá. Logo a interação AND 277 x *C. lindemuthianum* é incompatível enquanto que a interação Rudá x *C. lindemuthianum* é compatível.

Nos géis bidimensionais contendo proteínas de plantas inoculadas com esporos de *C. lindemuthianum* foram detectadas 48 proteínas diferencialmente expressas pelo feijoeiro em resposta ao patógeno. Trinta e sete dessas proteínas foram detectadas 12 h.a.i., sendo 28 delas identificadas por MS/MS. No tempo 48 h.a.i. foram detectadas 11 proteínas diferencialmente expressas, sendo que oito puderam ser identificadas.

A proteína relacionada ao amadurecimento foi encontrada somente nos géis 2D das plantas não inoculadas com *C. lindemuthianum* (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Na análise da ontologia do gene (*gene ontology*) codificador da proteína relacionada ao amadurecimento (GO:0006952), verifica-se que ele é um gene relacionado aos processos de defesa da planta em resposta à presença de corpos estranhos, injúrias e infecções (EMBL-EBI, 2012). A ausência dessa proteína nas plantas inoculadas poderia, a princípio, ser justificada pela sua supressão induzida pela inoculação de *C. lindemuthianum*. Outra possível explicação para justificar essa observação seria que nas plantas inoculadas possa ter ocorrido uma modificação pós traducional que mudou o ponto isoelétrico (PI) e/ou a massa molecular (MM) da proteína alterando a sua mobilidade no gel.

Neste trabalho, algumas proteínas relacionadas à fotossíntese apresentaram expressão diferenciada quando plantas inoculadas foram comparadas às plantas não inoculadas (Tabelas 1 e 2 e Figura 1): triose fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase A, sedoheptulose-1,7-bisfosfatase, rubisco ativase, fator HCF136 de montagem e estabilidade do fotosistema II. Segundo Bolton (2009), duas hipóteses podem ser propostas para relacionar a fotossíntese e energia com a resposta de defesa. A primeira, do ponto de vista de oferta e demanda, assume que o aumento das taxas fotossintéticas é uma resposta ao aumento do consumo de carbono e energia que ocorrem durante o processo infeccioso.

Tabela 1. Proteínas diferencialmente expressas em folhas do genótipo AND 277 de feijoeiro comum em resposta à inoculação de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Match ID	Proteína <sup>1</sup>	Espécie	Acesso (GI) <sup>2</sup>	E value	PI/MM		Cobertura <sup>3</sup> (%)	Peptídeo identificado
					Exp.	Teórico		
2480	Proteína relacionada ao amadurecimento	<i>Glycine max</i>	351724283	3 e <sup>-166</sup>	5,56/15.439	5,46/18.208	46	VSEEVHAPYGYLEFFDHVIR WSVEYER TVTCHETIESVDEQNKR DVDAHLLLETQENANK LHEGDDWHANDSVK
2458	Frutose-bisfosfato aldolase 1-like citoplasmática	<i>Glycine max</i>	356552422	0,0	5,83/46.301	5,77/38.534	41	IGPNEPSELSIQQNAQGLAR GVVELAATNGETTTQGFDSLGR LEVLKPWTLSFSFGR LASINVENIEANR TSDGKPFVEVLNENNVIPGIK HVGESQTGLASESLYEK YAIICQENGLVPIVEPEILTDGAHDIK
2570	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase A cloroplastídica	<i>Glycine max</i>	356561064	0,0	6,60/43.079	8,61/43.161	11	GILSVCDEPLVSVDFR TFAEEVNAAFR
2567	Aldo-ceto redutase família 4 membro C9-like	<i>Glycine max</i>	356496076	0,0	5,94/38.281	5,73/34.797	27	ENLIQPDIPSTWR AVTTAIQVGYR ATIFIDETYGAYK VPPAVNQVELHPGWQPK TLQDLQLDYLDLYLIHWPVR
1673	Peroxirredoxina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	11558242	4 e <sup>-163</sup>	4,63/21.373	5,17/28.615	29	SYDVLIPDQGIAR EGVIQHSTINLAIGR

Continuação

Match ID	Proteína <sup>1</sup>	Espécie	Acesso (GI) <sup>2</sup>	E value	PI/MM		Cobertura <sup>3</sup> (%)	Peptídeo identificado
					Exp.	Teórico		
1578	Fator de elongação G (EF-G) cloroplastídico	<i>Glycine max</i>	356563292	0,0	5,18/95.303	5,49/86.047	18	FEIVDIPEDFQEQAQDYR VEVVTPEEHLGDVIGDLNSR INIIDTPGHVDFTLEVER LAQEDPSFHFSR VEANVGAPQVNYR QSGGQGQFADITVR AVLVDGSYHDVDSSVLAFLAAR
2527	GDP-manose 3,5-epimerase 1-like	<i>Glycine max</i>	356573081	0,0	6,13/48.756	5,88/42.421	33	TIPIYHIPGPEGVR SFTFIDECVEGVLR VVQTQAPVQLGSLR DQFEMWGDGLQTR FFYASSACIYPEFK TEGHYIIASDWK FHNIYGPYGTWK
2526	Monodehidroascorbato redutase isoforma 1-like	<i>Glycine max</i>	356533631	0,0	5,34/48.380	5,22/46.886	35	TVEEYDYLPYFYSR AYLFPESPAR LPGFHVCVGGGER YIIVGGGVAAGYAAR VLEADIVVVGGRPQTALFK TNLSDVYAVGDVATFPLK LLPEWYTEK SLISAAGETFSYQTLVIATGSTVIR VVGVFLENGTPEENSAIAK

Continuação

Match ID	Proteína <sup>1</sup>	Espécie	Acesso (GI) <sup>2</sup>	E value	PI/MM		Cobertura <sup>3</sup> (%)	Peptídeo identificado
					Exp.	Teórico		
2524	Frutose-bisfosfato aldolase 1 cloroplastídica	<i>Glycine max</i>	356545061	0,0	6,22/44.829	7,63/43.008	30	SAAYYQQGAR YAAISQDNGLVPIVEPEILLDGEHTIDR GLVPLAGSNDESWCQGLDGLASR
2523	Fator de alongação Tu (EF-Tu) cloroplastídico	<i>Glycine max</i>	356516623	0,0	5,02/43.800	6,26/53.177	23	KYDEIDAAPEER ILDEALAGDNVGLLLR VGETVDLVGLR GITINTATVEYETENR LMDEVDSYIPIQR QDQVDDEELLQLVDLEVR
2522	Sedoheptulose-1,7-bisfosfatase isoforma 1-like	<i>Glycine max</i>	356568652	0,0	5,06/42.780	5,94/41.634	17	GFPGTHEFLLLDEGK GIFTNVASPSAK
2520	Fosfoglicerato cinase	<i>Glycine max</i>	356557030	0,0	5,91/41.808	6,19/42.167	13	LVAGLPEGGVLLLENVR VDLNVPLDDNLNITDDTR LASLADVYVNDAFGTAHR
2516	Cisteína sintase-like	<i>Glycine max</i>	356573072	0,0	5,41/40.034	5,48/34.336	11	LIVVVFPFGER YLSSVLFESVK VHYETTGPFIWK
2515	Ribonucleoproteína de 31 kDa	<i>Glycine max</i>	356508744	8 e <sup>-139</sup>	4,44/33.935	4,84/33.225	34	AGVVEIAEVIYNR FSGYDYDGR NFEPAAISIYVGNLPWDIDSTR IFVGNLPYDVDSEK GFGFVTMSTVEEA EK

Continuação

Match ID	Proteína <sup>1</sup>	Espécie	Acesso (GI) <sup>2</sup>	E value	PI/MM		Cobertura <sup>3</sup> (%)	Peptídeo identificado
					Exp.	Teórico		
1302	Triosefosfato isomerase	<i>Glycine max</i>	356572486	0,0	5,83/27.429	7,59/32.986	18	VATPQQAQEVHVAIR WVVLGHSER GGAFTGEISVEQLK FFVGGNWK TFDVCFQQLK
1292	Ribulose-fosfato 3-epimerase	<i>Glycine max</i>	356511994	8 e <sup>-176</sup>	5,85/26.039	7,71/29.930	33	AGADIVSVHCEQSSTIHLHR AVELAGCDWIHVDVMDGR GVNPWIEVDGGVGPANAYK VIEAGANALVAGSAVFGAK SDIIVSPSILSANFSK
2486	Aldo-ceto redutase	<i>Medicago truncatula</i>	357439453	0,0	5,90/45.778	6,77/46.750	23	IVSIQNSYSLLVR HGLTPVELALGFAR LGTDYIDLLQIHWPD TDLYIGSWLK
1658	Peroxirredoxina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	11558242	4 e <sup>-163</sup>	4,70/23.500	5,17/28.615	29	SYDVLIPDQGIALR EGVIQHSTINNLAIGR SGGLGDLNYPLISDVT K
2559	Proteína de choque térmico de 17.5 kDa classe I (HSP 17,5 kDa)	<i>Glycine max</i>	356521398	5 e <sup>-95</sup>	6,49/15.453	6,32/17.411	41	ASSELPLVGNTAPDFEAEAVFDQEFIK VEIEDDNILQISGER DFHFPSSLSAENSAFVNTR
2508	Glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase	<i>Glycine max</i>	351723335	0,0	5,83/55.005	5,98/50.190	18	ASIENGVLTVTIPK IIGGLPVGAYGGR ELLPGGVNSPVR LVIDAVPSIEMVR

Continuação

Match ID	Proteína <sup>1</sup>	Espécie	Acesso (GI) <sup>2</sup>	E value	PI/MM		Cobertura <sup>3</sup> (%)	Peptídeo identificado
					Exp.	Teórico		
1419	Fator de alongação Tu (EF-Tu) cloroplastídico	<i>Glycine max</i>	356516623	0,0	5,54/49.672	6,26/53.177	23	KYDEIDAAPEER ILDEALAGDENVGLLR GITINTATVEYETENR VGETVDLVGLR LMDEVDSYIPIQR QDQVDDEELLQLVDLEVR
1639	Glutamina sintetase foliar	<i>Phaseolus vulgaris</i>	121353	0,0	5,86/49.312	6,77/47.217	24	HETASINTFSWGVANR AAEVFSNPR HKEHISAYGEGNER IIAEYIWIGGTGIDVR EHISAYGEGNER LEGLLNLDITPFTDK
1634	Rubisco ativase 1	<i>Glycine max</i>	358248528	0,0	5,20/49.576	5,54/52.141	35	SFQCELVFAK VPIIVTGNDFSTLYAPLIR LVDNFPQGSIDFFGALR
2457	Aldo-ceto redutase	<i>Medicago truncatula</i>	357439453	0,0	6,03/45.795	6,77/46.750	23	IVSIQNSYSLLVR LGTDYIDLLQIHWPD HGLTPVELALGFAR TDLYIGSWLK YVALFGEFYDPSK
1628	Malato desidrogenase-like	<i>Solanum tuberosum</i>	83283965	0,0	6,10/43.396	5,58/35.385	42	ELVADDAWLNGEFISTVQQR MELVDAAFPLLK NVIIWGNHSSQYPD VNHATVTTPSGDK VLVVANPANTNALILK

Continuação

Match ID	Proteína <sup>1</sup>	Espécie	Acesso (GI) <sup>2</sup>	E value	PI/MM		Cobertura <sup>3</sup> (%)	Peptídeo identificado
					Exp.	Teórico		
2456	Frutose-bisfosfato aldolase 1 cloroplastídica	<i>Glycine max</i>	356545061	0,0	6,12/43.173	7,63/43.008	30	SAAYYQQGAR ASQDALLFR GLVPLAGSNDESWCQGLDGLASR YAAISQDNGLVPIVEPEILLDGEHTIDR LASIGLENTEANR
1609	Rubisco ativase	<i>Phaseolus vulgaris</i>	10720248	0,0	5,42/23.021	6,49/48.208	31	VPIIVTGNDFSTLYAPLIR HPGQSIDFFGALR VQLADQYLNEAALGNANEDAIAK
342	Sedoheptulose-1,7-bisfosfatase isoforma 1-like	<i>Glycine max</i>	356568652	0,0	4,96/42.640	5,94/41.634	17	LFSPGNLR LLVSMGEALR GFPGTHEFLLLDEGK GIFTNVASPSAK LIDYYVNEK
836	Ribonucleoproteína de 31 kDa	<i>Glycine max</i>	356508744	8 e <sup>-139</sup>	4,48/29.389	4,84/33.225	34	AGVVEIAEVIYNR NFEPAAISIYVGNLPWDIDSTR
14	Proteína 1 relacionada à patogênese	<i>Phaseolus vulgaris</i>	130829	7 e <sup>-106</sup>	4,84/17.266	4,83/16.518	29	GVFTFEDQTTSPVAPATLYK SVEIVEGNGGPGTIK
1831	Chalcona-flavonona isomerase	<i>Phaseolus vulgaris</i>	3041652	5 e <sup>-152</sup>	5,59/29.961	5,51/23.671	12	VNFPPGASVFYR GKPSEELINTLDFYR
1807	Fator HCF136 de montagem e estabilidade do PS II	<i>Glycine max</i>	356544404	0,0	5,18/41.790	6,38/43.377	35	GTGLTEEFEEVPVQSR STEEAWAAGSGGILLR GFVLGNDGVLLR SIPSAEDEDFNRYR TVSSGISGASYTGTFTVNR SAEMVTDEGAIYVTANR

Continuação

Match ID	Proteína <sup>1</sup>	Espécie	Acesso (GI) <sup>2</sup>	E value	PI/MM		Cobertura <sup>3</sup> (%)	Peptídeo identificado
					Exp.	Teórico		
524	Fator desencadeante-like	<i>Glycine max</i>	356552817	0,0	5,02/59.778	5,20/61.128	11	SFPLVFPETWTQENLR VPEDILISYVGR KVPEDILISYVGR MVEVDIPQSLFEEQGR
399	Glutamina sintetase foliar	<i>Phaseolus vulgaris</i>	121353	0,0	5,47/45.891	6,77/47.217	24	HETASINTFSWGVANR IIAEYIWGGTGIDVR AAEVFSNPR HKEHISAYGEGNER EHISAYGEGNER GGNNILVICDAYTPAGEPIPTNK GGNNILVICDAYTPAGEPIPTNKR
745	Proteína não caracterizada LOC100306660	<i>Glycine max</i>	351724087	4 e <sup>-97</sup>	5,80/22.111	5,71/18.197	31	LVSYAPEVTAHVEQGR SEVYHGDEICQVK EIALPNGLLPLKDIEECGYDR

<sup>1</sup> Todas as proteínas tiveram uma confirmação com 100% de certeza no *software* Scaffold (Proteome Software, Inc., Portland, OR).

<sup>2</sup> GenInfo Identifier (GI) – número de acesso no GenBank – NCBI.

<sup>3</sup> Porcentagem obtida no *software* Mascot (Matrix Science Ltd., London, Reino Unido).

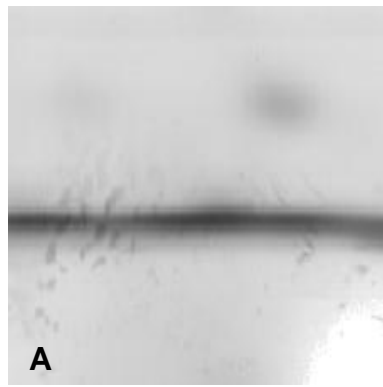
Tabela 2. Nível de expressão relativa das proteínas baseada na média da % de volume das plantas inoculadas (I) e não inoculadas (NI).

Match ID	Proteína	Média da % de volume $\pm$ DP		Tempo (h)	Diferença de expressão
		I	NI		
2480	Proteína relacionada ao amadurecimento	ND	0,1380 $\pm$ 0,08240	12	NA
2458	Frutose-bisfosfato aldolase 1-like citoplasmática	ND	0,0460 $\pm$ 0,0086	12	NA
2570	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase A cloroplastídica	0,0781 $\pm$ 0,0091	ND	12	NA
2567	Aldo-ceto redutase família 4 membro C9-like	0,0417 $\pm$ 0,0080	ND	12	NA
1673	Peroxirredoxina	0,0827 $\pm$ 0,0048	0,0417 $\pm$ 0,0074	12	(+) 1,98
1578	Fator de alongação G	0,0270 $\pm$ 0,0009	0,0555 $\pm$ 0,0147	12	(-) 2,06
2527	GDP-manose 3,5-epimerase 1-like	0,0524 $\pm$ 0,0020	ND	12	NA
2526	Monodehidroascorbato redutase isoforma 1-like	0,0397 $\pm$ 0,0070	ND	12	NA
2524	Frutose-bisfosfato aldolase 1 cloroplastídica	0,0483 $\pm$ 0,0147	ND	12	NA
2523	Fator de alongação Tu	0,0320 $\pm$ 0,0084	ND	12	NA
2522	Sedoepitulose-1,7-bisfosfatase isoforma 1-like	0,0330 $\pm$ 0,0088	ND	12	NA
2520	Fosfoglicerato cinase	0,0367 $\pm$ 0,0046	ND	12	NA
2516	Cisteína sintase-like	0,0371 $\pm$ 0,0066	ND	12	NA
2515	Ribonucleoproteína de 31 kDa	0,0507 $\pm$ 0,0192	ND	12	NA
1302	Triosefosfato isomerase	1,1021 $\pm$ 0,2562	0,5003 $\pm$ 0,0987	12	(+) 2,20
1292	Ribulose-fosfato 3-epimerase	0,1075 $\pm$ 0,0144	0,5941 $\pm$ 0,1750	12	(-) 5,52
2486	Aldo-ceto redutase	ND	0,0739 $\pm$ 0,0222	12	NA
1658	Peroxirredoxina	0,0364 $\pm$ 0,0074	0,0918 $\pm$ 0,0310	12	(-) 2,52
2559	Proteína de choque térmico de 17,5 kDa classe I	0,0383 $\pm$ 0,0119	ND	12	NA
2508	Glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase	ND	0,0384 $\pm$ 0,0143	12	NA

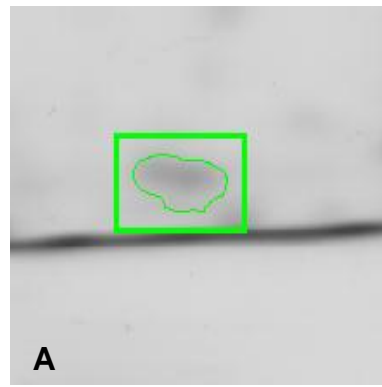
Continuação

Match ID	Proteína	Média da % de volume $\pm$ DP		Tempo (h)	Diferença de expressão
		I	NI		
1419	Fator de alongação Tu	0,0500 $\pm$ 0,0039	0,1147 $\pm$ 0,0184	12	(-) 2,29
1639	Glutamina sintetase foliar	0,0360 $\pm$ 0,0053	0,0996 $\pm$ 0,0224	12	(-) 2,77
1634	Rubisco ativase 1	0,0612 $\pm$ 0,0229	0,1810 $\pm$ 0,0568	12	(-) 2,95
2457	Aldo-ceto redutase	ND	0,0393 $\pm$ 0,0115	12	NA
1628	Malato desidrogenase-like	0,3642 $\pm$ 0,0185	0,1969 $\pm$ 0,0417	12	(+) 1,84
2456	Frutose-bisfosfato aldolase 1 cloroplastídica	ND	0,0734 $\pm$ 0,0264	12	NA
1609	Rubisco ativase	0,0786 $\pm$ 0,0094	0,0363 $\pm$ 0,0098	12	(+) 2,16
342	Sedoheptulose-1,7-bisfosfatase isoforma 1-like	0,0779 $\pm$ 0,0074	0,0399 $\pm$ 0,0009	48	(+) 1,95
836	Ribonucleoproteína de 31 kDa	0,0340 $\pm$ 0,0027	0,0192 $\pm$ 0,0024	48	(+) 1,77
14	Proteína 1 relacionada à patogênese	0,1706 $\pm$ 0,02680	0,0900 $\pm$ 0,0108	48	(+) 1,89
1831	Chalcona-flavonona isomerase	0,0317 $\pm$ 0,0054	ND	48	NA
1807	Fator HCF136 de montagem e estabilidade do PSII	0,0515 $\pm$ 0,0139	ND	48	NA
524	Fator desencadeante-like	0,0276 $\pm$ 0,0045	0,0119 $\pm$ 0,0017	48	(+) 2,33
399	Glutamina sintetase foliar	0,5795 $\pm$ 0,0457	0,1822 $\pm$ 0,0577	48	(+) 3,18
745	Proteína não caracterizada LOC 100306660	0,0711 $\pm$ 0,0067	0,0381 $\pm$ 0,0065	48	(+) 1,86

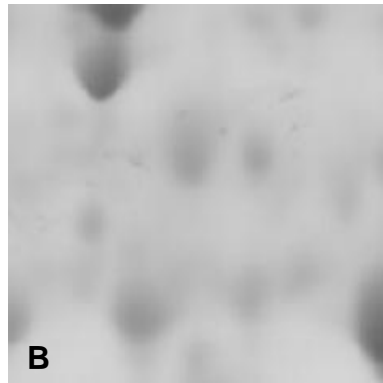
Os sinais (+) e (-) indicam aumento e diminuição na expressão da proteína em resposta a inoculação de *C. lindemuthianum*, respectivamente. DP = desvio padrão, ND = não detectado, NA = não aplicável.



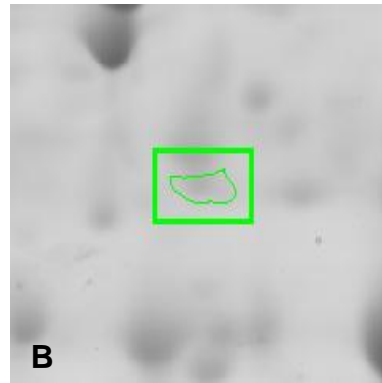
I



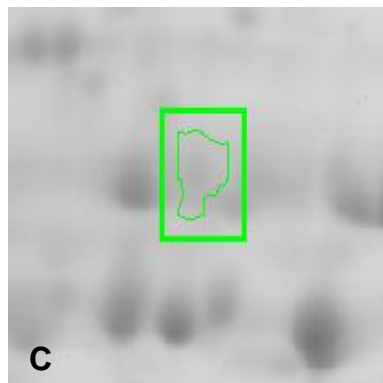
NI



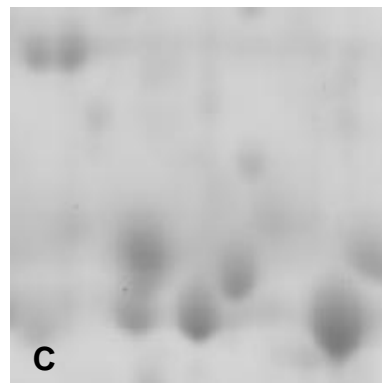
I



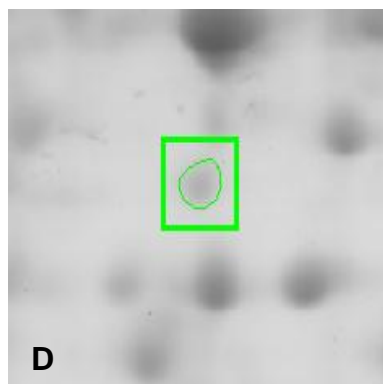
NI



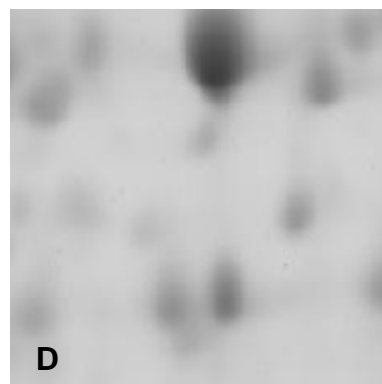
I



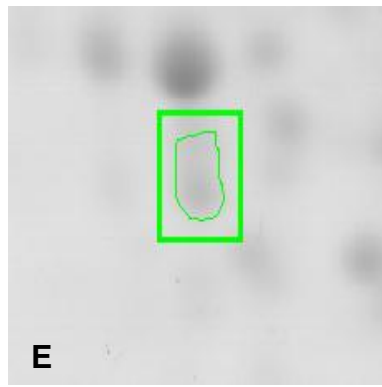
NI



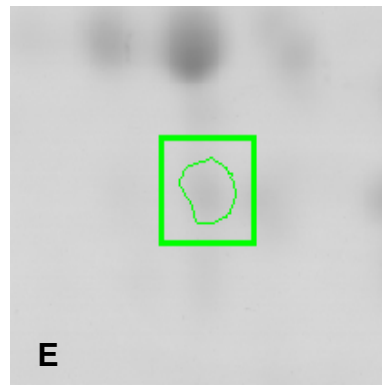
I



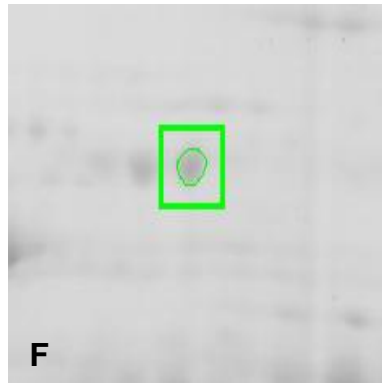
NI



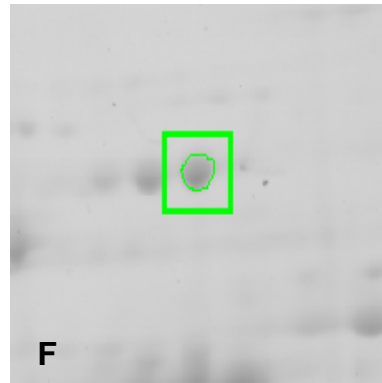
I



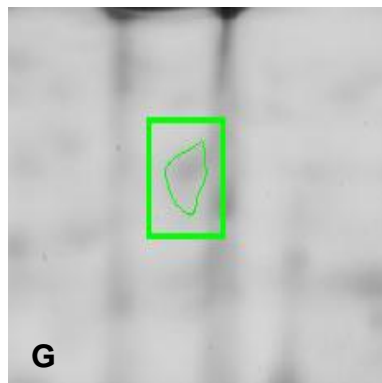
NI



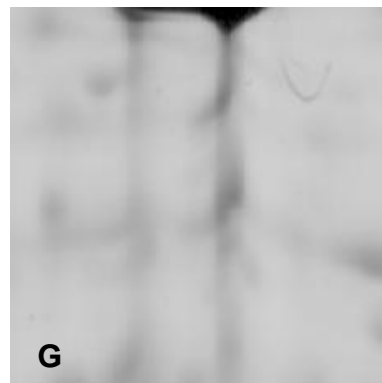
I



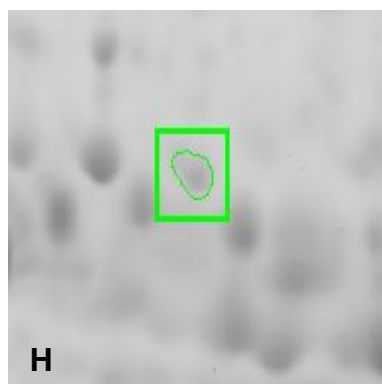
NI



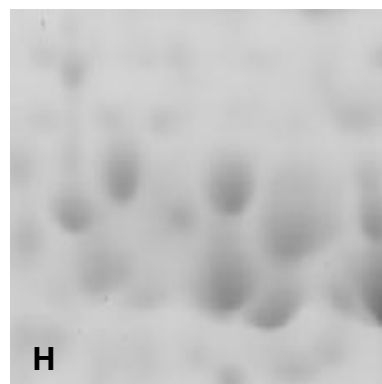
I



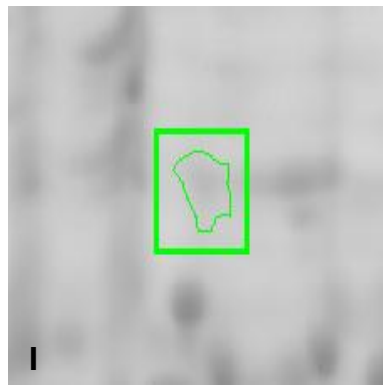
NI



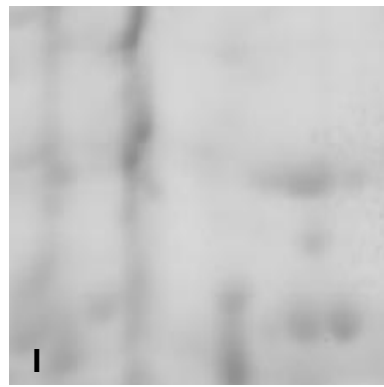
I



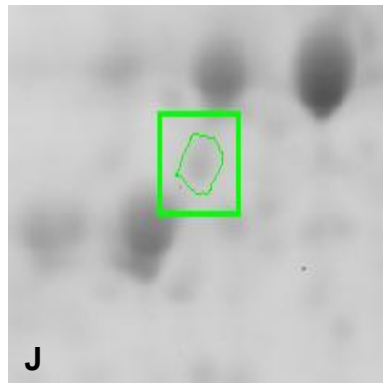
NI



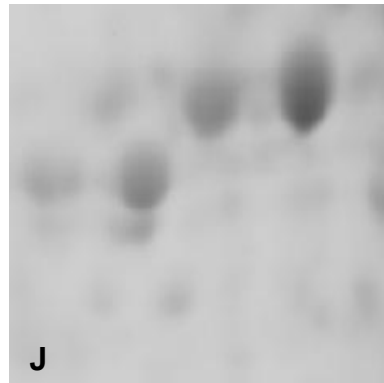
I



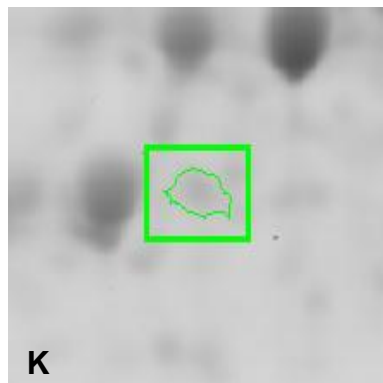
NI



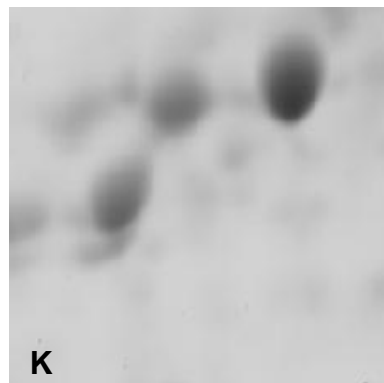
I



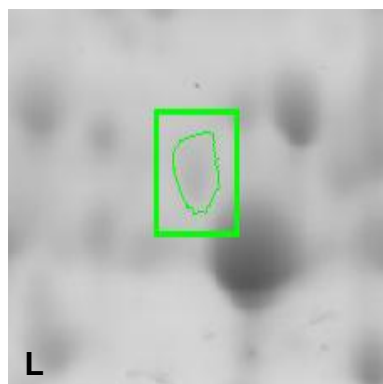
NI



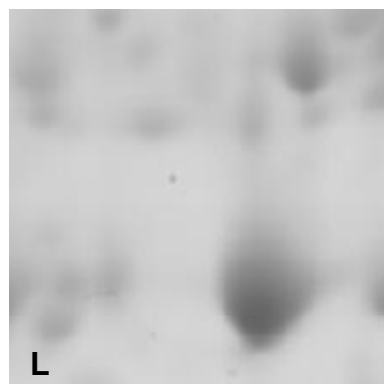
I



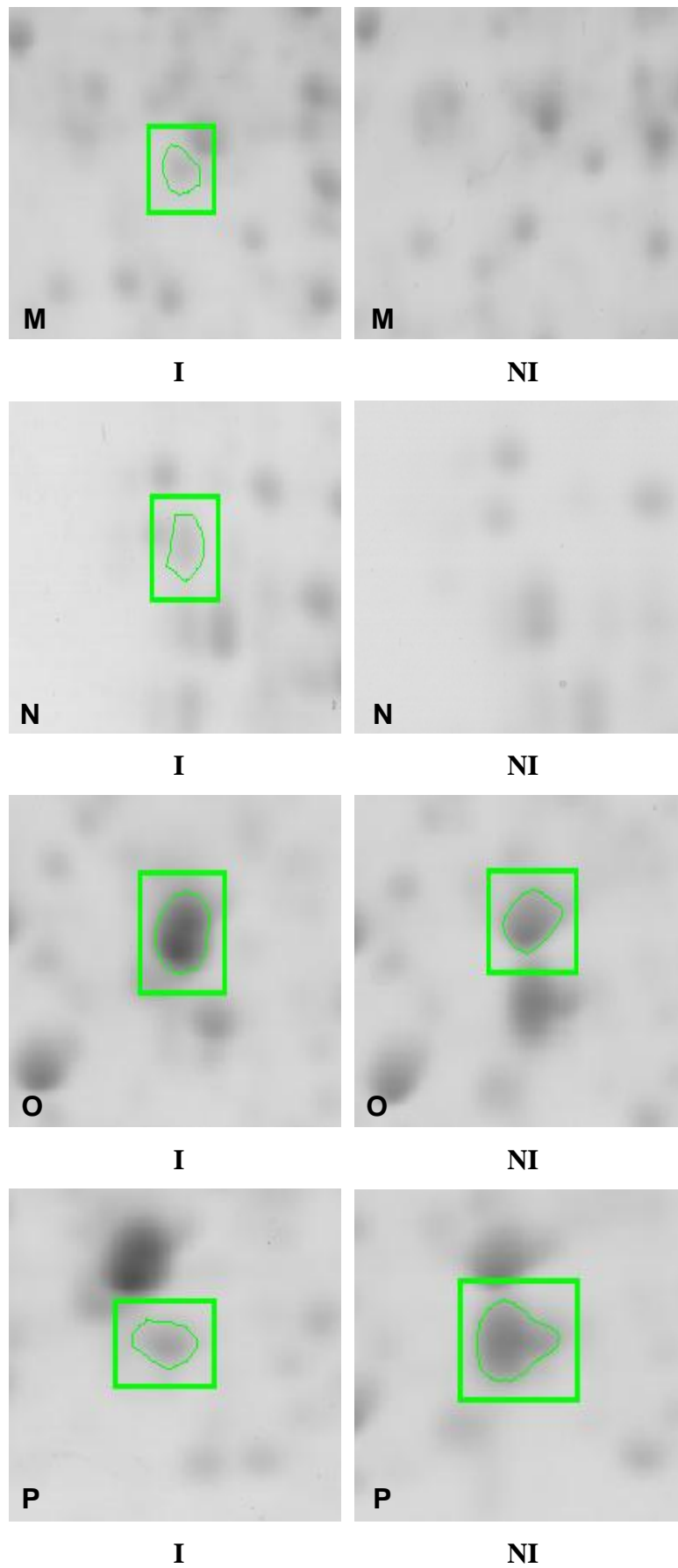
NI

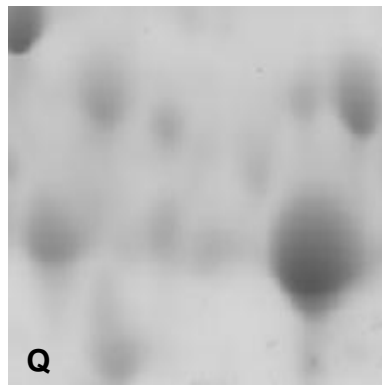


I

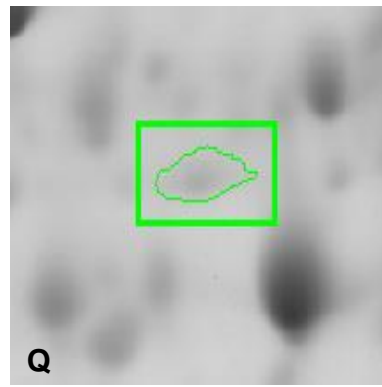


NI

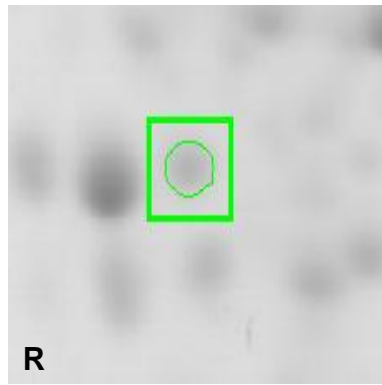




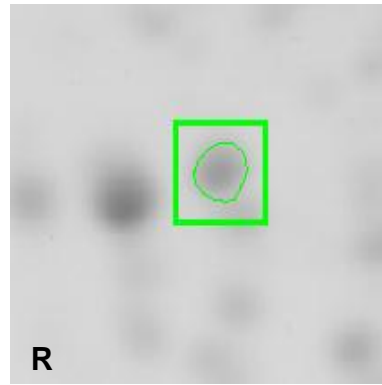
I



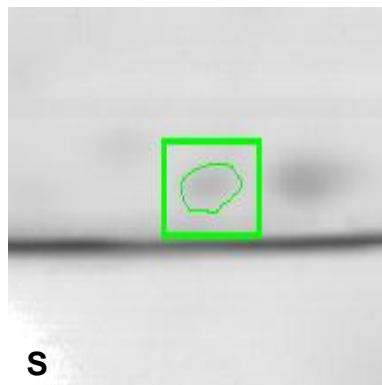
NI



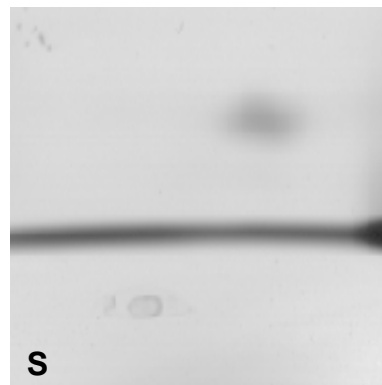
I



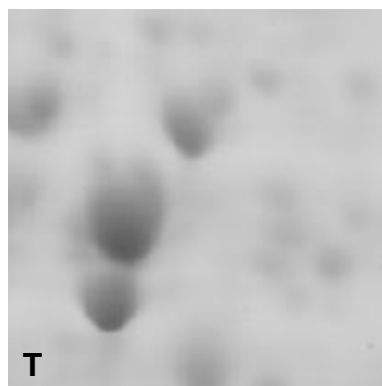
NI



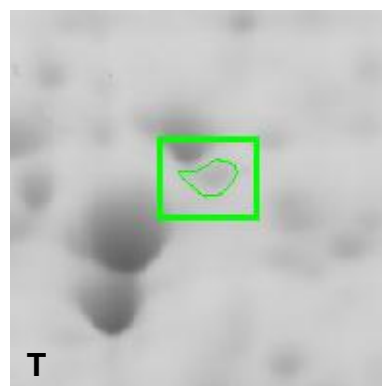
I



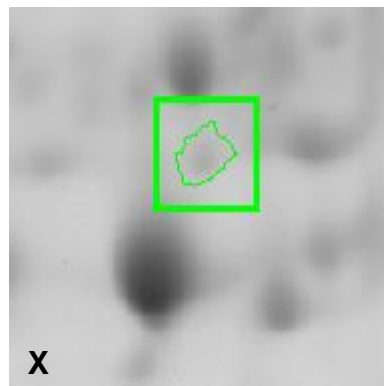
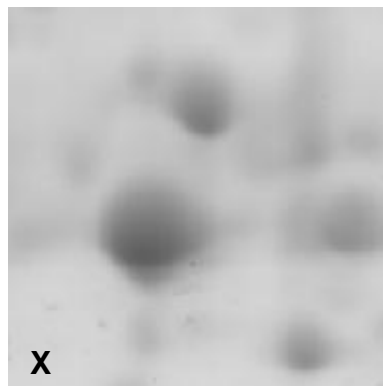
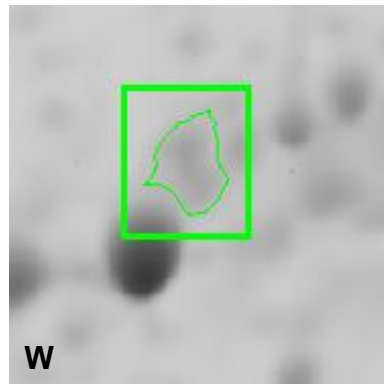
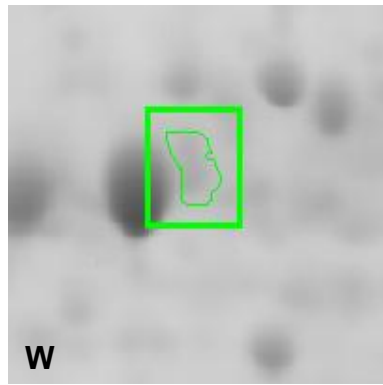
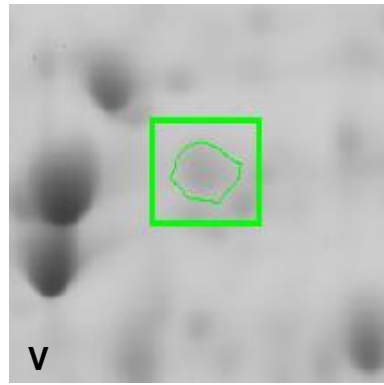
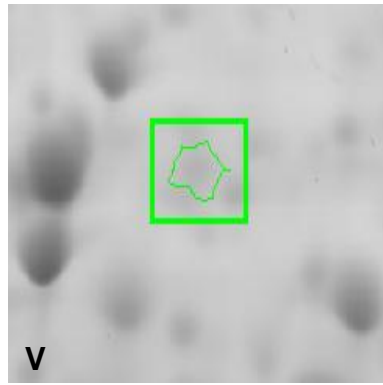
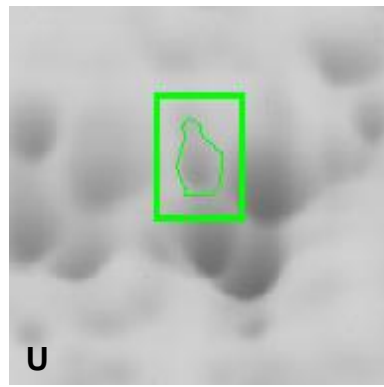
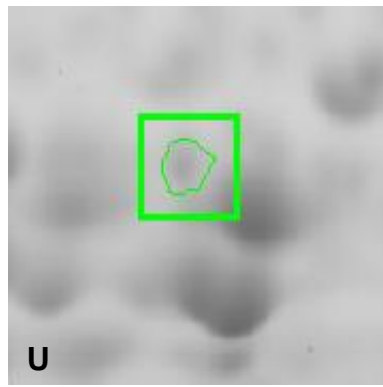
NI

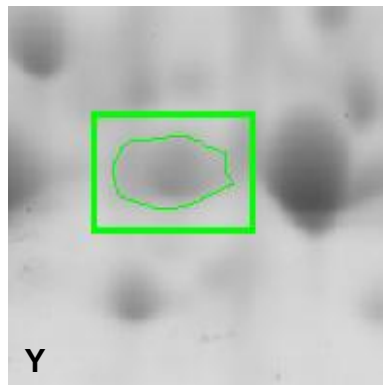


I

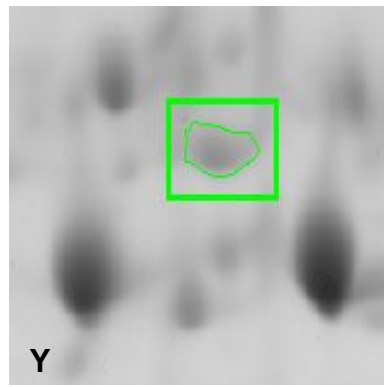


NI

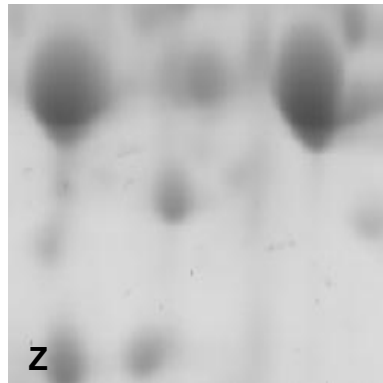




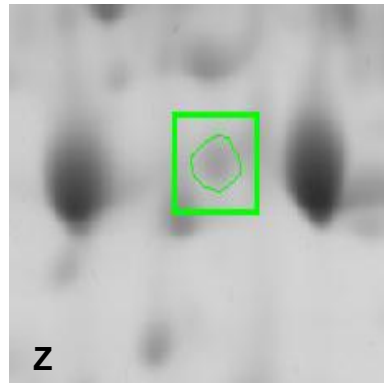
I



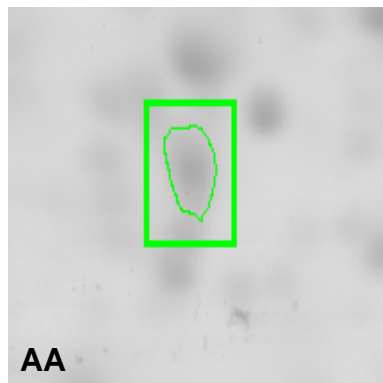
NI



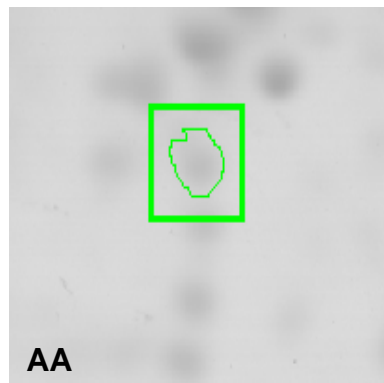
I



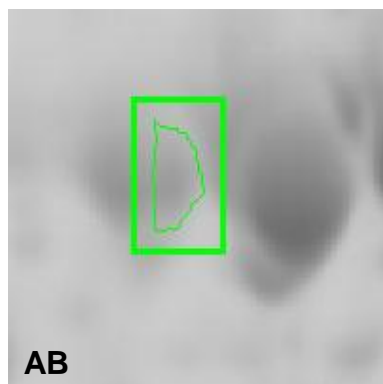
NI



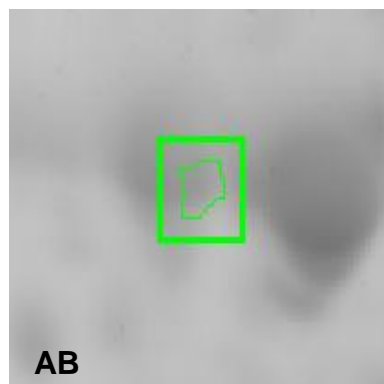
I



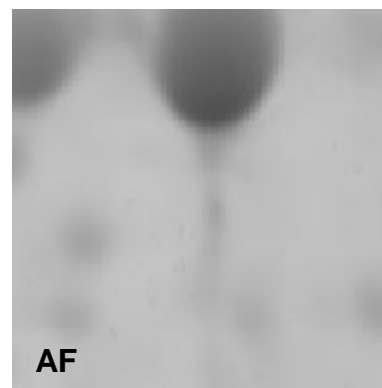
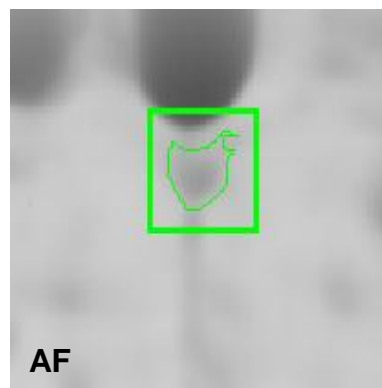
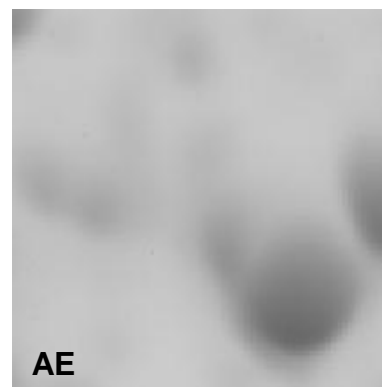
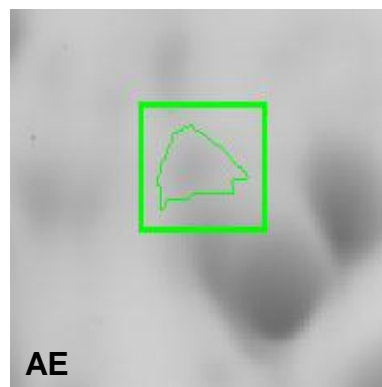
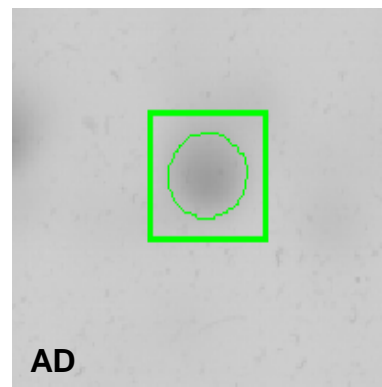
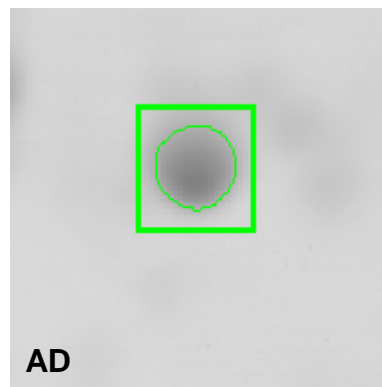
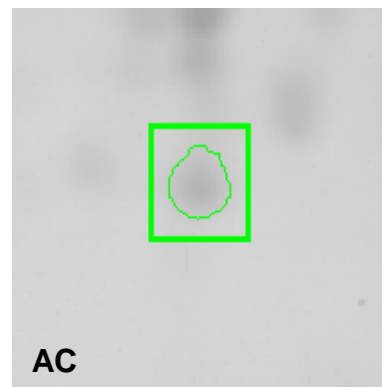
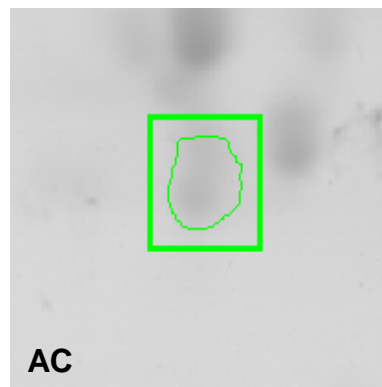
NI



I



NI



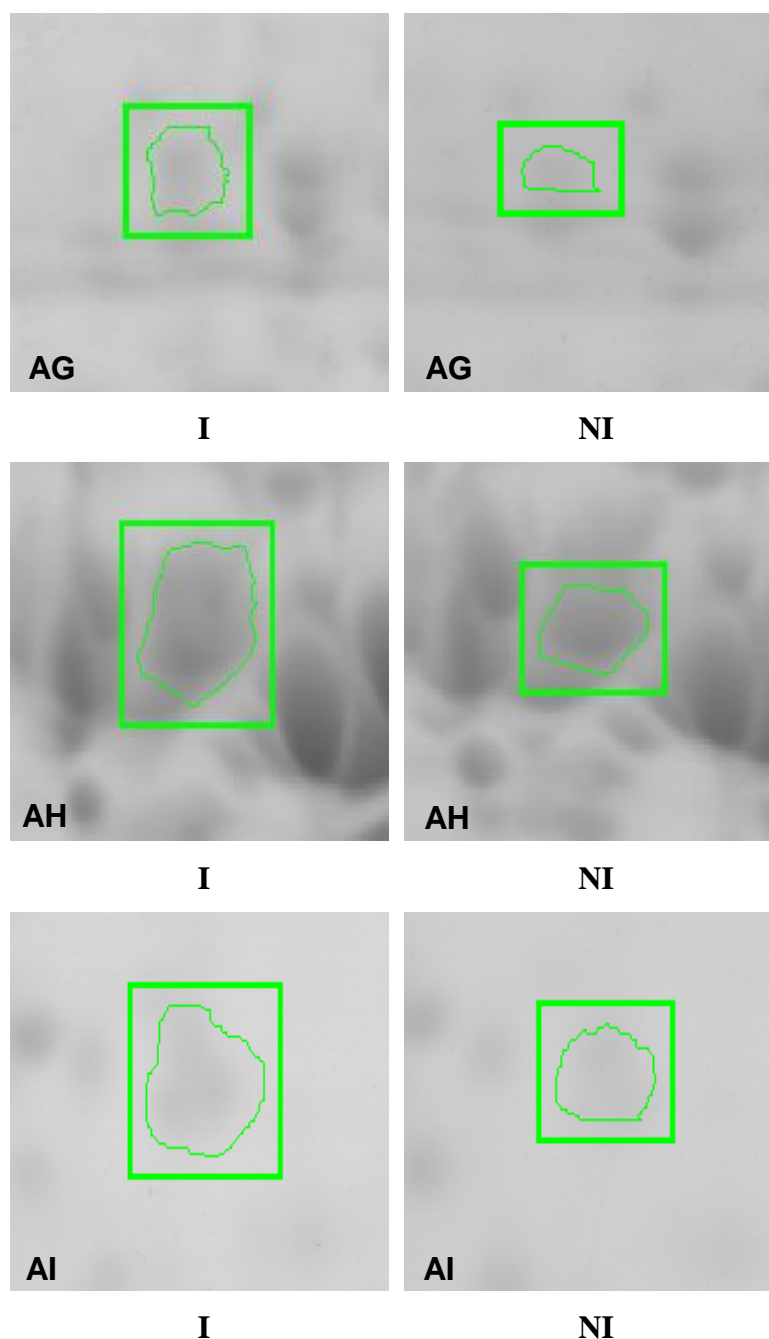


Figura 1. *Spots* diferencialmente expressos no genótipo AND 277 inoculado (I) com esporos de *C. lindemuthianum* e não inoculado (NI). **A**, proteína relacionada ao amadurecimento; **B**, frutose bisfosfato aldolase 1-like citoplasmática; **C**, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase A cloroplastídica; **D**, aldo-ceto redutase família 4 membro C9-like; **E**, peroxirredoxina; **F**, fator de alongação G cloroplastídico; **G**, GDP-manose 3,5-epimerase 1-like; **H**, monodehidroascorbato redutase isoforma 1-like; **I**, frutose-bisfosfato aldolase 1 cloroplastídica; **J**, fator de alongação Tu cloroplastídico; **K**, sedoheptulose-1,7-bisfosfatase isoforma 1-like; **L**, fosfoglicerato cinase; **M**, cisteína sintase-like; **N**, ribonucleoproteína de 31 kDa; **O**, triosefosfato isomerase; **P**, ribulose-fosfato 3-epimerase; **Q**, aldo-ceto redutase; **R**, peroxirredoxina; **S**, proteína de choque térmico de 17,5 kDa classe I; **T**, glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase; **U**, fator de

elongação Tu cloroplastídico; **V**, glutamina sintetase foliar; **W**, rubisco ativase 1; **X**, aldo-ceto redutase; **Y**, malato desidrogenase-like; **Z**, frutose bisfosfato aldolase 1 cloroplastídica; **AA**, rubisco ativase; **AB**, sedoheptulose-1,7-bisfosfato isoforma 1-like; **AC**, ribonucleoproteína de 31 kDa; **AD**, proteína 1 relacionada à patogênese; **AE**, chalcona-flavonona isomerase; **AF**, fator HCF136 de montagem e estabilidade do PS II; **AG**, fator desencadeante-like; **AH**, glutamina sintetase foliar; **AI**, proteína não caracterizada LOC 100306660.

Por outro lado, também existe a hipótese de que ocorreria a redução da fotossíntese durante a resposta de defesa, em que a prioridade celular seria a síntese de compostos relacionados à defesa (BOLTON, 2009).

Rubisco ativase foi uma proteína identificada em dois *spots* (*match* ID 1634 e 1609) (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). No *match* ID 1634, houve diminuição da expressão dessa proteína em quase três vezes, enquanto que no *match* ID 1609 houve um aumento de expressão superior a duas vezes. A rubisco ativase é uma enzima que promove a adição de uma molécula de CO<sub>2</sub> a um grupo ε-amino de uma lisina presente no sítio ativo da rubisco promovendo sua ativação. A restauração da rubisco também pode ser promovida pela rubisco ativase, quando essa enzima remove, com gasto de ATP, a ribulose-1,5-bisfosfato do sítio ativo da rubisco (PORTIS, 2003). No modelo de resistência, a abundância de proteínas relacionadas à fotossíntese, como as subunidades maior e menor da rubisco e rubisco ativase, seriam reduzidas, enquanto que proteínas relacionadas à defesa aumentariam (ZIMARO et al., 2011). De acordo com Chaves et al. (2009), uma condição de estresse pode afetar de diferentes formas os genes pertencentes a uma mesma família. Sendo assim, o aumento da expressão da proteína presente no *match* ID 1609 pode ser derivado de um efeito de retroalimentação ocorrido pela diminuição da fotossíntese causada pelo patógeno.

A expressão da proteína triosefosfato isomerase foi aumentada 2,20 vezes nas plantas inoculadas com *C. lindemuthianum* 12 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Em plantas, essa enzima participa em vários processos metabólicos incluindo glicólise, gliconeogênese e ciclo de Calvin (CHEN & THELEN, 2010). Diferenças de expressão dessa proteína tem sido observadas em resposta ao estresse biótico (CAMPO et al., 2008) e abiótico (YAN et al., 2005).

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) A cloroplastídica foi encontrada apenas nos géis bidimensionais das plantas inoculadas com *C. lindemuthianum* 12 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). A GAPDH cloroplastídica é formada por duas subunidades diferentes denominadas A e B (BRINKMANN et al.,

1989). Chanda et al. (2008) estudaram o gene *GLY1* de *A. thaliana*, que codifica uma GAPDH localizada no cloroplasto. Plantas mutantes para esse gene possuíam baixos níveis de glicerol-3-fosfato e eram suscetíveis ao fungo hemibiotrófico *Colletotrichum higginsianum*. No entanto, plantas que superexpressavam esse gene tinham um aumento na resistência ao patógeno. Kachroo et al. (2005) verificaram que o balanço de glicerol-3-fosfato e ácido oleico é crítico na regulação de processos de defesa mediados por ácido salicílico e ácido jasmônico. Plantas deficientes de produzir glicerol-3-fosfato eram incapazes de ativar a via do ácido salicílico. Portanto, o acúmulo de GAPDH nas plantas inoculadas com *C. lindemuthianum*, pode estar relacionado ao aumento dos níveis de glicerol-3-fosfato, que por sua vez é capaz de ativar mecanismos de defesa disparados pela planta para combater a invasão do patógeno.

Três *spots* diferencialmente expressos 12 h.a.i. foram identificados como sendo a enzima frutose bisfosfato aldolase (FBA) (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). FBA cloroplastídica (*match* ID 2524) foi detectada apenas nas plantas inoculadas. Porém, apenas nas plantas não inoculadas foram encontrados os outros dois *spots* referentes à FBA citoplasmática (*match* ID 2458) e cloroplastídica (*match* ID 2456) (Figura 2). A proximidade dessas proteínas é um indicativo de que as formas citoplasmática e cloroplastídica apresentam estruturas conservadas. A presença de duas isoformas das proteínas do cloroplasto é um indicativo de que modificações pós traducionais possam ter ocorrido.

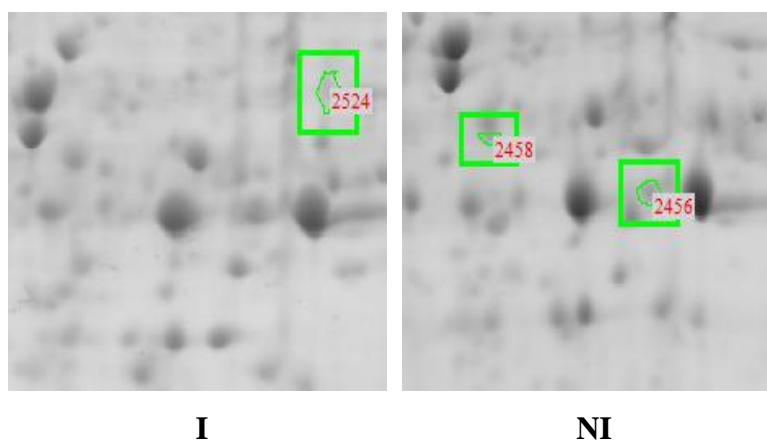


Figura 2. Diferentes isoformas de frutose-bisfosfato aldolase que tiveram expressão diferenciada nos genótipos AND 277 inoculado (I) e não inoculado (NI).

FBA catalisa a clivagem da frutose-1,6-bisfosfato em diidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato numa condensação aldólica reversível (RUTTER, 1964). FBA é constituinte da via glicolítica/gliconeogênese e via das pentoses fosfato em plantas (KONISHI et al., 2004). Tremblay et al. (2010) usaram a técnica de *microarray* para

identificar mudanças de expressão gênica da soja (*Glycine max*) em resposta à infecção por *Phakopsora pachyrhizi* e verificaram que a FBA teve sua expressão reduzida após inoculação do patógeno. Purev et al. (2008) analisaram a expressão do gene *ClAldC*, que codifica a FBA de *Codonopsis lanceolata* pela técnica de RT-PCR e verificaram que esse gene apresentava elevada expressão no caule de plantas saudáveis, enquanto que em folhas e raízes a expressão era baixa. Quando essas plantas eram submetidas aos estresses causados por peróxido de hidrogênio, ausência de ar (anóxia) e baixa temperatura ocorria uma significativa indução desse gene após 2-8 h. Outros tipos de estresse como: excesso de NaCl, ferimentos, ausência ou excesso de luz não afetaram a expressão desse gene.

A ribulose fosfato 3-epimerase teve sua expressão diminuída em 5,52 vezes em plantas inoculadas com *C. lindemuthianum* 12 h.a.i (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Essa enzima participa da via das pentoses fosfato e catalisa a conversão da ribulose-5-fosfato a xilulose-5-fosfato (CHEN, 1998). Tremblay et al. (2010) analisaram transcritos de soja pela técnica de *microarray* e verificaram que essa enzima tinha sua expressão diminuída ocasionada pelo fungo causador da ferrugem asiática da soja (*P. pachyrhizi*). Coaker et al. (2004) utilizaram a técnica de eletroforese 2D e também verificaram a redução da expressão dessa proteína em plantas resistentes de tomate (*Lycopersicon hirsutum*) em resposta à bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Um *spot* identificado como a enzima aldo-ceto redutase (AKR) foi detectado somente nas plantas inoculadas 12 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). AKR são enzimas amplamente distribuídas na natureza que possuem numerosos papéis no metabolismo de esteroides, açúcares e carbonilas. Essas proteínas também atuam no metabolismo de compostos tóxicos endógenos e exógenos, incluindo aqueles produzidos em situações de estresse (SIMPSON et al., 2009). A caracterização da AKR da família 4, membros C8 e C9 (ARK4C8 e AKR4C9) foi realizada por Simpson et al. (2009). Foi sugerido que o papel primário dessas enzimas seria de detoxificar as células de vários aldeídos e cetonas tóxicos produzidos durante situações de estresse. Em nosso trabalho, dois outros *spots* presentes apenas nas plantas não inoculadas (*match* ID 2457 e 2486) foram identificados como AKR (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). A proximidade entre esses dois *spots* indica que são duas isoformas dessa proteína, sendo possível que sejam resultantes de modificações pós traducionais (Figura 3).

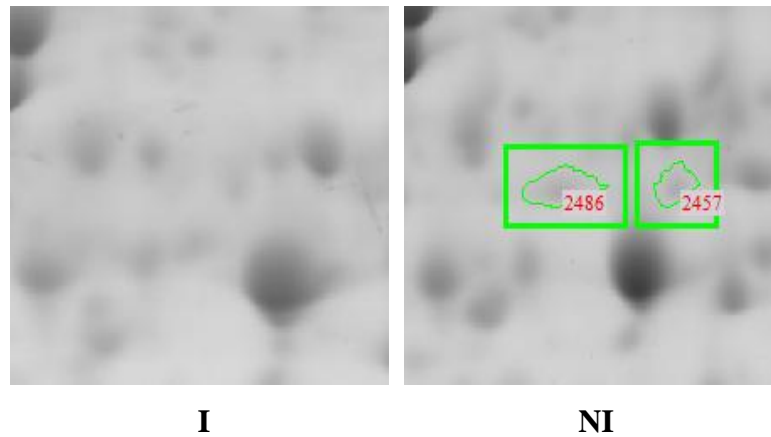


Figura 3. Diferentes isoformas de aldo-ceto redutase que tiveram expressão diferenciada no genótipo AND 277 inoculado (I) e não inoculado (NI).

A enzima fosfoglicerato cinase (PGK) foi encontrada apenas nas plantas inoculadas com *C. lindemuthianum* 12 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Essa enzima atua na via glicolítica na conversão do 1,3-bisfosfoglicerato em 3-fosfoglicerato, que resulta na produção de uma molécula de ATP. Mutuko e Nose (2012) avaliaram plantas de arroz (*Oryza sativa*) infectadas com *Rhizoctonia solani* e verificaram um aumento da atividade enzimática da PGK ocasionado pela infecção.

O fator de alongação Tu (EF-Tu) foi identificado em dois *spots*, sendo que o *match* ID 2523 só foi encontrado nas plantas inoculadas e o *match* ID 1419 foi menos expresso nas plantas inoculadas (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Esses dois *spots* estão localizados em regiões próximas do gel 2D (Figura 4), o que indica que representam duas isoformas dessa proteína. É interessante observar que essas proteínas são geralmente codificadas por famílias multigênicas (FU et al., 2012). A proteína EF-G também teve sua expressão reduzida nas plantas inoculadas com o patógeno (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Tanto o EF-Tu, quanto o EF-G são proteínas envolvidas na translocação, fase de precisão na síntese de proteínas durante o alongamento da cadeia polipeptídica na tradução (SCHRANK & VAINSTEIN, 2012).

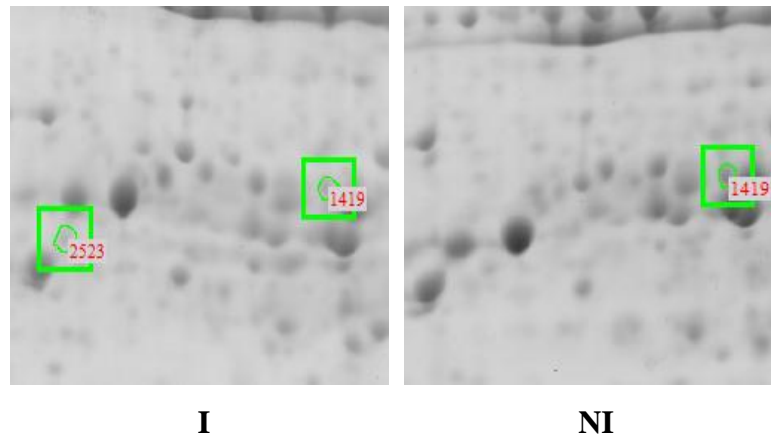


Figura 4. Diferentes isoformas do EF-Tu que tiveram expressão diferenciada no genótipo AND 277 inoculado (I) e não inoculado (NI).

O fator de alongação Tu, ligado a uma molécula de GTP (EF-Tu-GTP), leva o aminoacil-tRNA até o sítio A do ribossomo onde ocorre a incorporação desse aminoácido à proteína em formação. O fator de alongação G, ligado ao GTP (EF-G-GTP), participa na translocação do tRNA do sítio A para o sítio P, promovendo o movimento do ribossomo através do mRNA (SCHRANK & VAINSTEIN, 2012). É provável que a inoculação das plantas de soja por *C. lindemuthianum* leve à diminuição geral do metabolismo e que isso seja efetivado pela redução da biossíntese de proteínas por meio da redução na expressão do EF-Tu e EF-G. Nesse sentido, Valcu et al. (2009) também verificaram que a expressão de EF-G era reduzida em *Fagus sylvatica* após infecção por *Phytophthora citricola*. No mesmo trabalho, a indução de ferimentos também levou à diminuição na expressão de EF-Tu e EF-G.

Por outro lado, a expressão diferencial de EF-Tu tem sido muito estudada devido à sua atividade de chaperona. Sob condições de intenso estresse abiótico é desencadeada a desnaturação de proteínas. Assim, EF-Tu com sua atividade de chaperona teria o papel de promover a renaturação dessas proteínas (FU et al., 2012).

Neste trabalho, a proteína peroxirredoxina (Prx) foi encontrada em dois *spots* nas plantas inoculadas 12 h.a.i., sendo mais expressa 1,98 vezes (*match* ID 1673) e menos expressa 2,52 vezes (*match* ID 1658) (Tabelas 1 e 2 e Figura 1 e 5). Tal fato pode ter ocorrido devido às várias cópias desses genes, modificações pós traducionais, diferentes formas de *splicing* além da regulação hormonal por diferentes hormônios como etileno, ácido abscísico e auxinas (TOVAR-MÉNDEZ, 2011).

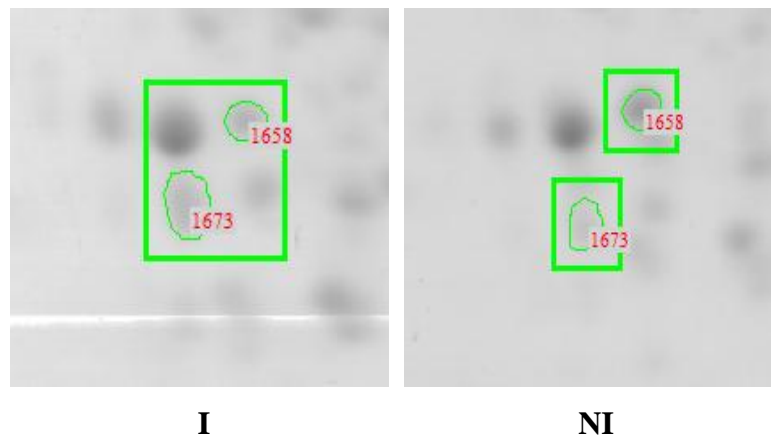


Figura 5. Diferentes isoformas de peroxirredoxina que tiveram expressão diferenciada no genótipo AND 277 inoculado (I) e não inoculado (NI).

As Prx tem sido associadas à defesa das plantas contra patógenos. O nível de transcritos de Prx Q, um tipo de Prx, aumentou nas folhas de *Populus trichocarpa* em resposta à infecção causada por *Melampsora larici populina* (ROUHIER et al., 2004). Kiba et al. (2005) isolaram proteínas com atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea* e a Prx Q estava presente nos isolados. O gene que codifica essa Prx chamado de *GtAFP1* foi induzido pelo ácido salicílico, mas não por metil jasmonato. A superexpressão da proteína recombinante em tabaco (*N. tabacum*) aumentou a tolerância a doenças fúngicas e ao estresse oxidativo causado pelo herbicida Paraquat. Os autores concluíram que a Prx Q pode atuar como uma proteína de defesa contra doenças e estresse oxidativo, além de indicarem o gene que codifica essa proteína como um alvo para a engenharia genética na construção de plantas resistentes a doenças (DIETZ et al., 2006).

Em plantas, espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o radical superóxido e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) são formadas nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos durante a respiração, fotossíntese e outros processos que envolvem a transferência de elétrons (TOVAR-MÉNDEZ, 2011). O excesso de ROS é potencialmente deletério, mas rigidamente controlado. Esse processo é essencial para certas funções como desenvolvimento, respostas de defesa e sinalização de oxirredução (FOYER & NOCTOR, 2005).

De fato, grande parte da regulação da expressão gênica causada por processos redox é mediada por uma família de proteínas dissulfeto oxidoreduases, chamadas tioredoxinas, peroxirredoxinas, glutaredoxinas e proteínas dissulfeto isomerase (ROUHIER et al., 2008).

Outra enzima envolvida nos processos de regulação do potencial redox celular encontrada neste trabalho foi a monodehidroascorbato redutase (MDHAR). Essa enzima só foi encontrada nas plantas inoculadas com *C. lindemuthianum* 12 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Os peroxissomos são organelas envolvidas no metabolismo de ROS. Especificamente, a enzima ascorbato peroxidase inicia a transferência de elétrons de duas moléculas de ascorbato para a molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formando água e oxigênio. Essa reação produz duas moléculas de monodehidroascorbato (ascorbato como radical livre) que podem ser recicladas imediatamente para ascorbato reduzido pela MDHAR via transferência de elétrons para NADP<sup>+</sup> (LISENBEE et al., 2005). A expressão diferencial da MDHAR indica a regeneração do ascorbato para que a remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seja continuada, garantindo o funcionamento correto do sistema de detoxificação da célula (PECHANOVA et al., 2010). Esse processo de degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente em excesso na célula é conhecido como ciclo ascorbato-glutationa.

Outro fato interessante relacionado ao ciclo ascorbato-glutationa, uma das principais formas de detoxificação das células contra ROS, foi a presença da enzima GDP-manose 3,5-epimerase (GME) somente nos géis 2D das plantas inoculadas com o patógeno 12 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Essa enzima é central na via mais importante de síntese de ascorbato possuindo um papel chave na regulação dessa via controlando o balanço de produção do L-ascorbato e a biossíntese de polissacarídeos de parede celular. O ascorbato é um dos mais importantes antioxidantes que protegem as células vegetais contra ROS gerados durante processos fisiológicos e estresses bióticos e abióticos (GILBERT, 2009). O ascorbato serve como um substrato redutor para a ascorbato peroxidase (APX) que catalisa a conversão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e gera uma molécula de monodehidroascorbato (MDHA) que posteriormente é reciclado em ascorbato pela MDHAR. Algumas moléculas de MDHA podem, espontaneamente, converter-se em ascorbato e dehidroascorbato (DHA) que podem ser reduzidos para ascorbato pela enzima dehidroascorbato redutase usando a glutaciona como doador de elétrons (KATO et al., 1997). Todo esse processo pode ser visualizado na Figura 6.

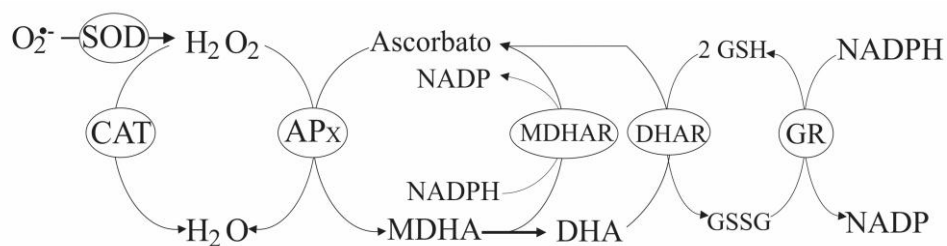


Figura 6. Vias de eliminação de ROS em plantas. As reações não são apresentadas estequiometricamente. Abreviações: SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; APX, ascorbato peroxidase; MDHA, monodehidroascorbato; MDHAR, monodehidroascorbato redutase; DHA, dehidroascorbato; GR, glutaciona redutase; GSH, glutaciona reduzida; GSSG, glutaciona dissulfeto. Fonte: Modificada de Teixeira et al. (2005).

Zhang et al. (2011) utilizando plantas transgênicas de tomate (*Solanum lycopersicum*), verificaram a superexpressão dos genes *SIGME1* e *SIGME2*, genes que codificam a GME, e verificaram um aumento na quantidade de ascorbato nas folhas e frutos. Essas plantas também apresentaram aumento na tolerância ao estresse oxidativo promovido pela exposição ao herbicida Paraquat, maior taxa de sobrevivência pela exposição ao frio e um aumento significativo de massa fresca e comprimento das raízes sob condição de estresse salino.

A expressão da proteína malato desidrogenase foi 1,84 vezes maior em plantas de AND 277 inoculadas com *C. lindemuthianum* 12 h.a.i. em relação às não inoculadas (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Essa enzima catalisa a conversão reversível de oxaloacetato a malato usando o NADH ou  $NADP^+$  como oxidante ou redutor, respectivamente (HEBBELMANN et al., 2012). Tem sido demonstrado que a malato desidrogenase possui um papel importante na tolerância a estresses em plantas (KOUSSEVITZKY et al., 2008). Por exemplo, plantas transgênicas de *A. thaliana* que superexpressam o gene que codifica a malato desidrogenase de arroz (*Oryza sativa*) possuem uma quantidade de NADPH maior que  $NADP^+$ , em relação ao tipo selvagem, que confere maior tolerância ao estresse salino (CHENG & LONG, 2007). Geddes et al. (2008) verificaram um aumento da expressão da malato desidrogenase em genótipos resistentes de cevada em resposta à inoculação por *Fusarium graminearum*. Em outro trabalho, Tesfaye et al. (2001) superexpressaram o gene que codifica a malato desidrogenase em alfafa (*Medicago sativa*), e um aumento na atividade específica da enzima levou a um aumento na concentração de ácidos orgânicos na raiz que aumentou a tolerância dessas plantas ao alumínio.

Outra proteína relacionada à resposta a condições de estresse encontrada apenas nas plantas inoculadas 12 h.a.i. foi a proteína de choque térmico de 17,5 kDa ou HSP 17,5 kDa. Trata-se de uma proteína citoplasmática, com 153 resíduos de aminoácidos que atua em processos biológicos de resposta a estresse (UNIPROT, 2012). Pequenas proteínas de choque térmico (smHSPs) são de distribuição generalizada na natureza e são abundantes em plantas superiores, ao contrário de outros eucariotos. Essas proteínas possuem uma massa de 17 a 30 kDa e compartilham um domínio C-terminal comum com todas smHSP eucarióticas. Em geral, as smHSP não são encontradas em tecidos vegetativos normais, mas são acumuladas em altos níveis em resposta ao choque térmico e a outros tipos de estresse (WATERS et al., 1996). SUN et al. (2001) caracterizaram o gene *At-HSP17.6A*, que codifica uma smHSP classe II, de *A. thaliana*. A proteína possuía 156 resíduos de aminoácidos e não foi expressa em nenhum tecido vegetativo na ausência de estresse. Entretanto, após a indução de estresse térmico a 37 °C, rapidamente ocorreu a expressão dessa proteína. Em plantas normais, sob condições de estresse hídrico e salino não foi verificada a acumulação dessa proteína. Porém, plantas que superexpressaram o gene que codifica a HSP 16,6 Da foram tolerantes ao estresse hídrico e salino. Os autores também demonstraram que a proteína codificada pelo gene *HSP17.6A* forma um complexo com massa molecular de ~230 kDa, que é uma característica comum de outras HSPs. Também foi demonstrado *in vitro* a atividade de chaperona da HSP17.6A, que foi capaz de restaurar 60% da atividade da citrato sintase.

A enzima cisteína sintase foi expressa somente nas plantas inoculadas com o patógeno 12 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Essa enzima cujo nome sistemático é [O-acetil-L-serina(tiol)liase] (OASTL) catalisa o passo final para a biossíntese de L-cisteína em plantas (KAWASHIMA et al., 2004). O papel dessa proteína tem sido demonstrado na detoxificação celular causada por metais pesados. Ning et al. (2010) superexpressaram o gene *GmOASTL4* de soja (*G. max*) em tabaco (*N. tabacum*) e verificaram que a quantidade de OASTL aumentou grandemente nessas plantas, o que resultou no aumento da tolerância dessas plantas ao excesso do metal pesado cádmio. Outro fato observado por Ning et al. (2010) foi o aumento das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase. O aumento dessa enzima em exposição ao estresse biótico, causado por infecção fúngica, indica a ativação das mesmas vias de detoxificação ativada por estresse abiótico.

Após 48 h de inoculação do patógeno, uma proteína relacionada com a patogênese (*Pathogenesis-related protein 1- PR1*) teve sua expressão aumentada nas

folhas de AND 277 inoculadas (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). PRs são definidas como proteínas codificadas pela planta hospedeira que são induzidas especificamente por patologias ou situações relacionadas (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999). Uma importante característica das PR é seu efeito antifúngico; algumas PR exibem também efeitos contra bactérias, insetos, nematoides e vírus. O efeito das PR pode ser explicado pela sua atividade inibitória de outras proteínas, atividade hidrolítica e habilidade permeabilizante de membranas. Assim, enzimas hidrolíticas ( $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases e proteases) podem ser uma ferramenta no enfraquecimento e decomposição da parede celular fúngica (EDREVA, 2005).

Devido à importante função das proteínas PRs, plantas geneticamente modificadas com expressão alterada dos genes que codificam essas proteínas vem sendo construídas como uma estratégia promissora no melhoramento de plantas contra patógenos (EDREVA, 2005). Sarowar et al. (2005) superexpressaram em tabaco (*N. tabacum*) o gene de pimenta *CABPR1*, que codifica uma PR1, e verificaram que essas plantas apresentaram aumento na tolerância a metais pesados e ao oomiceto *Phytophthora nicotianae* e às bactérias *Ralstonia solanacearum* e *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Análises de RT-PCR mostraram que houve aumento na expressão dos genes PR-Q (quitinase) e da glutathione S-transferase. Ocorreu também uma redução da atividade e da transcrição da peroxidase, evidenciando um desbalanço redox com o acúmulo de  $H_2O_2$ , o que levou essas plantas à tolerância aos estresses bióticos e abióticos.

Glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase foi encontrada apenas nas folhas das plantas não inoculadas 12 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Essa proteína também é chamada de glutamato-1-semialdeído 2,1-aminotransferase e está envolvida com a biossíntese de tetrapirróis e clorofila, catalisando a isomerização do glutamato 1-semialdeído em 5-aminolaevulinato (TYACKE et al., 1995). Zou et al. (2005) utilizando a técnica de *microarray*, verificaram que essa proteína tinha uma redução de 1,68 vezes nas plantas de soja resistentes a *Pseudomonas syringae*.

Nos géis 2D analisados 12 h.a.i. a enzima glutamina sintetase (GS) (*match* ID 1639) teve sua expressão reduzida nas plantas inoculadas 2,77 vezes e 48 h.a.i. (*match* ID 399) a expressão nas plantas inoculadas aumentou 3,18 vezes (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). A baixa disponibilidade de nitrogênio frequentemente aumenta a suscetibilidade de plantas a doenças. A limitação de nitrogênio também afeta a patogenicidade, e a forma de nitrogênio disponível para as plantas e patógenos pode afetar a severidade da doença

(SOLOMON et al., 2003). A infecção das plantas com bactérias e fungos patogênicos também altera o metabolismo da planta hospedeira (PAGEAU et al., 2006).

A enzima GS é crucial para o processo de assimilação de nitrogênio porque ela catalisa o primeiro passo da conversão do nitrogênio inorgânico (amônio) na sua forma orgânica (glutamina) (GONNET & DÍAZ, 2000). Pageau et al. (2006) investigaram a diferença de expressão de GS em resposta aos hormônios etileno, ácido abscísico e jasmônico. Foi observado que esses hormônios promoviam expressão diferencial de dois tipos de GS, chamadas GS1 e GS2. Ora uma dessas isoformas era expressa, ora outra; e em certos momentos as duas eram expressas ou ambas reprimidas. Pérez-Garcia et al. (1995) infectaram folhas de tomate com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e uma nova isoforma de GS citosólica foi expressa. Essa enzima era semelhante a uma GS expressa na senescência. Tremblay et al. (2010) verificaram uma redução na expressão de transcritos correspondentes a esta proteína em um genótipo de soja suscetível (Williams 82) 10 dias após inoculação de *P. pachyrhizi*. A diminuição ou aumento da GS pode ser atribuída à presença de isoformas dessa proteína, conforme verificado por Pageau et al. (2006) ou resposta a diferentes hormônios reguladores da expressão dessa enzima.

O fator desencadeante foi uma proteína diferencialmente expressa 48 h.a.i. Essa proteína foi 2,33 vezes mais expressa, em porcentagem de volume, nas plantas inoculadas com *C. lindemuthianum* (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Fatores desencadeantes são chaperonas que se associam ao ribossomo e são as primeiras chaperonas a se ligarem aos peptídeos nascentes (HESTERKAMP et al., 1996). Este tipo de chaperona só é encontrado em bactérias e cloroplastos. Essa proteína acomoda o substrato (proteína em formação) no seu interior prevenindo agregação dessa proteína, degradação e dobramento incorreto (PREISLER & DEUERLING, 2012). O papel dessa proteína em processos de defesa de plantas contra patógenos ainda não é relatado na literatura. Portanto, o aumento da expressão dessa proteína nas plantas inoculadas com *C. lindemuthianum* indica uma possível participação dessa proteína no processo de defesa, especificamente garantindo o correto dobramento das proteínas do cloroplasto.

Chalcona flavonona-isomerase, ou chalcona isomerase foi uma enzima encontrada apenas nos géis 2D das plantas inoculadas com *C. lindemuthianum* 48 h.a.i. (Tabelas 1 e 2 e Figura 1). Essa é a segunda enzima da via de produção flavonoides e isoflavonoides em legumes, que leva a produção de fitoalexinas, cuja indução e acumulação é uma típica resposta de defesa associada com a resistência em várias plantas contra o ataque de organismos (CASTILEJO et al., 2009).

#### 4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram encontradas 48 proteínas diferencialmente expressas pelo feijoeiro comum em resposta à infecção *C. lindemuthianum*. Desse total, 36 proteínas puderam ser identificadas por espectrometria de massas.

A análise do proteoma diferencial das folhas do feijoeiro comum revelou mecanismos de defesa da planta em resposta ao estresse biótico através da identificação de proteínas envolvidas no processo de defesa, metabolismo de carboidratos e estresse oxidativo.

O aumento da expressão de proteínas envolvidas na diminuição do estresse oxidativo causado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio como peroxirredoxina, GDP-manose 3,5-epimerase, monodehidroascorbato redutase e malato desidrogenase indica um mecanismo de detoxificação celular prevenindo a peroxidação de lipídeos e oxidação de outros componentes celulares.

Proteínas relacionadas a processos de defesa como a proteína de choque térmico de 17,5 kDa, proteína relacionada à patogênese 1 (PR1) e chalcona isomerase puderam ser identificadas, e a presença delas está correlacionada a processos de defesa como síntese de proteases para degradação da parede celular fúngica, síntese de fitoalexinas e até mesmo minimizando os danos causados pela invasão do patógeno.

Outras proteínas do metabolismo de carboidratos e aminoácidos como: frutosebisfosfato aldolase, aldo-ceto redutase, cisteína sintase, triosefosfato isomerase, glutamina sintetase e glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase, também foram identificadas e vários trabalhos na literatura têm associado essas proteínas a processos de defesa vegetal contra diversos tipos de estresse.

A proteômica diferencial foi uma ferramenta importante para entendimento da interação planta-patógeno estudada. Assim, o proteoma diferencial do feijoeiro infectado por *C. lindemuthianum* possibilitou traçar uma visão geral dos mecanismos envolvidos nessa interação ao identificar proteínas específicas de defesa. Os genes codificadores dessas proteínas podem ser usados para estudos de identificação de polimorfismos, que aplicados a um programa de melhoramento, podem auxiliar no processo de seleção para o desenvolvimento de novas cultivares resistentes a antracnose.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, K. M. A. **Piramidação de genes de resistência à Antracnose, Ferrugem e Mancha Angular e estudos de alelismo em feijão comum**. 2009. 129 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2. p. 333–349.

BOLTON, M. D. Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 5, p. 487-497, 2009.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JR.; T. J.; BORÉM, A. (Ed.) **Feijão**. 2. Ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 13-18.

BRADFORD, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRINKMANN, H.; CERFF, R.; SALOMON, M.; SOLL, J. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the cytosolic precursors of subunits GapA and GapB of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pea and spinach. **Plant Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 81-94, 1989.

BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.

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

CASTILLEJO, M. A.; MALDONADO, A.; DUMAS-GAUDOT, E.; FERNANDEZ-APARICIO, M.; SUSIN, R.; DIEGO, R.; JORRIN, J. Differential expression proteomics to investigate responses and resistance to *Orobanche crenata* in *Medicago truncatula*. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 294, 2009.

CHANDA, B.; VENUGOPAL, S. C.; KULSHRESTHA, S.; NAVARRE, D. A.; DOWNIE, B.; VAILLANCOURT, L.; KACHROO, A.; KACHROO, P. Glycerol-3-Phosphate Levels Are Associated with Basal Resistance to the Hemibiotrophic Fungus *Colletotrichum higginsianum* in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 147, n. 4, p. 2017-2029, 2008.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009.

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

CHEN, Y.-R.; HARTMAN, F. C.; LU, T.-Y. S.; LARIMER, F. W. D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase: cloning and heterologous expression of the spinach gene, and purification and characterization of the recombinant enzyme. **Plant Physiology**, v. 118, n. 1, p. 199-207, 1998.

CHENG, Y.; LONG, M. A cytosolic NADP-malic enzyme gene from rice (*Oryza sativa* L.) confers salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 7, p. 1129-1134, 2007.

COAKER, G. L.; WILLARD, B.; KINTER, M.; STOCKINGER, E. J.; FRANCIS, D. M. Proteomic analysis of resistance mediated by Rcm 2.0 and Rcm 5.1, two loci controlling resistance to bacterial canker of tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 9, p. 1019-1028, 2004.

DIETZ, K.-J.; JACOB, S.; OELZE, M.-L.; LAXA, M.; TOGNETTI, V.; DE MIRANDA, S. M. N.; BAIER, M.; FINKEMEIER, I. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 8, p. 1697-1709, 2006.

DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, 2008.

EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. **General and Applied Plant Physiology**, v. 31, n. 1-2., p. 105-112, 2005.

EMBL-EBI. **European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute**. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0006952>>. Acesso em: 21 Jun. 2012.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant Cell Environment**, v. 28, n. 8, p. 1056-1071, 2005.

FU, J.; MOMČILOVIĆ, I.; PRASAD, P. V. V. Roles of protein synthesis elongation factor EF-Tu in heat tolerance in plants. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 8, 2012.

GE HEALTHCARE. **2 – D Electrophoresis** – Principles and Methods. Handbook 80-6429-60AD, 2010.

GEDDES, J.; EUDES, F.; LAROCHE, A.; SELINGER, L. B. Differential expression of proteins in response to the interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Hordeum vulgare*. **Proteomics**, v. 8, n. 3, p. 545-554, 2008.

GILBERT, L.; ALHAGDOW, M.; NUNES-NESEI, A.; QUEMENER, B.; GUILLON, F.; BOUCHET, B.; FAUROBERT, M.; GOUBLE, B.; PAGE, D.; GARCIA, V.; PETIT, J.; STEVENS, R.; CAUSSE, M.; FERNIE, A. R.; LAHAYE, M.; ROTHAN, C.; BALDET, P. GDP-d-mannose 3,5-epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. **The Plant Journal**, v. 60, n. 3, p. 499-508, 2009.

GONNET, S.; DÍAZ, P. Glutamine synthetase and glutamate synthase activities in relation to nitrogen fixation in *Lotus* spp. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 3, p. 195-202, 2000.

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.

HEBBELMANN, I.; SELINSKI, J.; WEHMEYER, C.; GOSS, T.; VOSS, I.; MULO, P.; KANGASJÄRVI, S.; ARO, E.-M.; OELZE, M.-L.; DIETZ, K.-J.; NUNES-NESEI, 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.

HESTERKAMP, T.; HAUSER, S.; LÜTCKE, H.; BUKAU, B. *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 9, p. 4437-4441, 1996.

KATO, Y.; URANO, J. I.; MAKI, Y.; USHIMARU, T. Purification and characterization of dehydroascorbate reductase from rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, n. 2, p. 173-178, 1997.

KACHROO, P.; VENUGOPAL, S. C.; NAVARRE, D. A.; LAPCHYK, L.; KACHROO, A. Role of Salicylic Acid and Fatty Acid Desaturation Pathways in ssi2-Mediated Signaling. **Plant Physiology**, v. 139, n. 4, p. 1717-1735, 2005.

KAWASHIMA, C. G.; NOJI, M.; NAKAMURA, M.; OGRA, Y.; SUZUKI, K. T.; SAITO, K. Heavy metal tolerance of transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 2, p. 153-157, 2004.

KIBA, A.; NISHIHARA, M.; TSUKATANI, N.; NAKATSUKA, T.; KATO, Y.; YAMAMURA, S. A Peroxiredoxin Q homolog from gentians is involved in both resistance against fungal disease and oxidative stress. **Plant Cell Physiology**, v. 46, n. 6, p. 1007-1015, 2005.

KONISHI, H.; YAMANE, H.; MAESHIMA, M.; KOMATSU, S. Characterization of fructose-bisphosphate aldolase regulated by gibberellin in roots of rice seedling. **Plant Molecular Biology**, v. 56, n. 6, p. 839-848, 2004.

KOUSSEVITZKY, S.; SUZUKI, N.; HUNTINGTON, S.; ARMIJO, L.; SHA, W.; CORTES, D.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role

in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 49, p. 34197-34203, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LISENBEE, C. S.; LINGARD, M. J.; TRELEASE, R. N. Arabidopsis peroxisomes possess functionally redundant membrane and matrix isoforms of monodehydroascorbate reductase. **The Plant Journal**, v. 43, n. 6, p. 900-914, 2005.

MATRIX SCIENCE. Disponível em: <<http://www.matrixscience.com/>>. Acesso em: 16 Mai. 2012.

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

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>. Acesso em: 13 Jun. 2012.

NING, H.; ZHANG, C.; YAO, Y.; YU, D. Overexpression of a soybean O-acetylserine (thiol) lyase-encoding gene *GmOASTLA* in tobacco increases cysteine levels and enhances tolerance to cadmium stress. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 4, p. 557-564, 2010.

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

PAULA JR., T. J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JR., T. J.; BORÉM, A. (Ed.) **Feijão**. 2. Ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 359-414.

PECHANOVA, O.; HSU, C.-Y.; ADAMS, J.; PECHAN, T.; VANDERVELDE, L.; DRNEVICH, J.; JAWDY, S.; ADELI, A.; SUTTLE, J.; LAWRENCE, A.; TSCHAPLINSKI, T.; SEGUIN, A.; YUCEER, C. Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 674, 2010.

PÉREZ-GARCIA, A.; CÁNOVAS, F. M.; GALLARDO, F.; HIREL, B.; VICENTE, A. Differential expression of glutamine synthetase isoforms in tomato detached leaflets infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, n. 1, p. 96-103, 1995.

PHYTOZOME. Disponível em: <<http://www.phytozome.com/>>. Acesso em: 13 Jun. 2012.

PORTIS, A. Rubisco activase – Rubisco's catalytic chaperone. **Photosynthesis Research**, v. 75, n. 1, p. 11-27, 2003.

PREISLER, S.; DEUERLING, E. Ribosome-associated chaperones as key players in proteostasis. **Trends in biochemical sciences**, v. 37, n. 7, 2012.

PUREV, M.; KIM, M. K.; SAMDAN, N.; YANG, D. C. Isolation of a novel fructose-1,6-bisphosphate aldolase gene from *Codonopsis lanceolata* and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. **Molecular Biology**, v. 42, n. 2, p. 179-186, 2008.

RAVA, C.; PURCHIO, A.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, n. 2, p.167-172, 1994.

ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; GUALBERTO, J. M.; JORDY, M.-N.; DE FAY, E.; HIRASAWA, M.; DUPLESSIS, S.; LEMAIRE, S. D.; FREY, P.; MARTIN, F.; MANIERI, W.; KNAFF, D. B.; JACQUOT, J.-P. Poplar peroxiredoxin Q, a thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. **Plant Physiology**, v. 134, n. 3, p. 1027-1038, 2004.

ROUHIER, N.; LEMAIRE, S. D.; JACQUOT, J.-P. The Role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 143-166, 2008.

RUTTER, W. J. Evolution of Aldolase. **Federation Proceedings**, v. 23, p. 1248-57, 1964.

SARMA, A. D.; OEHRLE, N. W.; EMERICH, D. W. Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 379, n. 2, p. 192-195, 2008.

SAROWAR, S.; KIM, Y. J.; KIM, E. N.; KIM, K. D.; HWANG, B. K.; ISLAM, R.; SHIN, J. S. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 4, p. 216-224, 2005.

SCHRANK, I. S.; VAINSTEIN, M. H. Código Genético e Síntese de Proteínas. In. ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (Ed.) **Biologia Molecular Básica**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2012. p. 256-275.

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, 2007.

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

SOLOMON, P. S.; TAN, K.-C.; OLIVER, R. P. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 3, p. 203-210, 2003.

SUN, W.; BERNARD, C.; VAN DE COTTE, B.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. **The Plant Journal**, v. 27, n. 5, p. 407-415, 2001.

TEIXEIRA, F. K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; GALVÃO, V. C.; MARGIS-PINHEIRO, M. Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 529-538, 2005.

TESFAYE, M.; TEMPLE, S. J.; ALLAN, D. L.; VANCE, C. P.; SAMAC, D. A. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1836-1844, 2001.

TREMBLAY, A.; HOSSEINI, P.; ALKHAROUF, N. W.; LI, S.; MATTHEWS, B. F. Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 183-193, 2010.

TOVAR-MÉNDEZ, A.; MATAMOROS, M. A.; BUSTOS-SANMAMED, P.; DIETZ, K.-J.; CEJUDO, F. J.; ROUHIER, N.; SATO, S.; TABATA, S.; BECANA, M. Peroxiredoxins and NADPH-dependent thioredoxin systems in the model legume *Lotus japonicus*. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 1535-1547, 2011.

TYACKE, R. J.; CONTESTABILE, R.; GRIMM, B.; HARWOOD, J. L.; JOHN, R. A. Reactions of glutamate semialdehyde aminotransferase (glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase) with vinyl and acetylenic substrate analogues analysed by rapid scanning spectrophotometry. **Biochemical Journal**, v. 309, n. 1, p. 307-313, 1995.

UNIPROT. Disponível em <<http://www.uniprot.org/uniprot/P04793>>. Acesso em: 21 Jun. 2012.

VALCU, C.-M.; JUNQUEIRA, M.; SHEVCHENKO, A.; SCHLINK, K. Comparative proteomic analysis of responses to pathogen infection and wounding in *Fagus sylvatica*. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 8, p. 4077-4091, 2009.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, n. 2, p. 85-97, 1999.

WATERS, E. R.; LEE, G. J.; VIERLING, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 3, p. 325-338, 1996.

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

ZHANG, C.; LIU, J.; ZHANG, Y.; CAI, X.; GONG, P.; ZHANG, J.; WANG, T.; LI, H.; YE, Z. Overexpression of SIGMEs leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 3, p. 389-398, 2011.

ZIMARO, T.; GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; GEHRING, C.; OTTADO, J. Unraveling Plant Responses to Bacterial Pathogens through Proteomics. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 12, 2011.

ZOU, J.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; ALDEA, M.; LI, M.; ZHU, J.; GONZALEZ, D. O.; VODKIN, L. O.; DELUCIA, E.; CLOUGH, S. J. Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific down regulation of photosynthesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 11, p. 1161-1174, 2005.