



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

JOSÉ HÉLIO DE ARAÚJO FILHO

ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata*), CV. CE-31, INOCULADAS COM O NEMATÓIDE DAS GALHAS (*Meloydogine incognita*).

FORTALEZA – CEARÁ

2011

A689a

Araújo Filho, José Hélio de.

Análise proteômica de raízes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), CV. CE-31, inoculadas com o nematóide das galhas (*Meloidogyne incognita*) / José Hélio de Araújo Filho. – 2011.
146 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2011.

Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientação: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

1. Feijão-de-corda. 2. *Meloidogyne*. 3. Proteômica. 4. Plantas - Bioquímica. 5. Nematóides de galhas. I. Título.

CDD 574.192

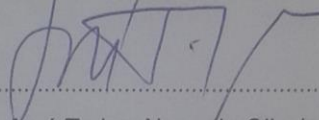
Esta tese de doutorado foi apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontrar-se-á à disposição na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas de ética científica.

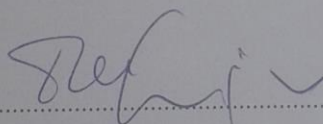
José Hélio de Araújo Filho

Tese aprovada em: 15 de setembro de 2011.

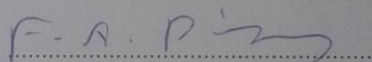
BANCA EXAMINADORA



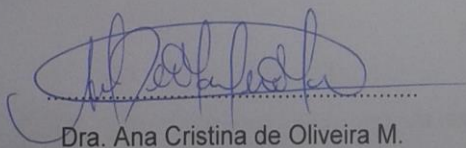
Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Universidade Federal do Ceará
(Orientador)



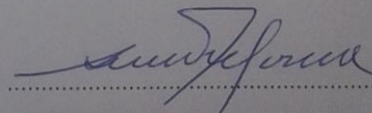
Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará
(Examinador)



Dr. Francisco de Assis de Paiva
Campos
Universidade Federal do Ceará
(Examinador)



Dra. Ana Cristina de Oliveira M.
Moreira
Universidade Federal do Ceará
(Examinadora)



Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza
(Examinador)

JOSÉ HÉLIO DE ARAÚJO FILHO

ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata*), CV. CE-31, INOCULADAS COM O NEMATÓIDE DAS GALHAS (*Meloydogine incognita*).

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

FORTALEZA - CEARÁ

2011

*À todas as pessoas
que torceram e/ou auxiliaram para que eu
obtivesse êxito nesse pequeno percurso
da eterna caminhada em busca do conhecimento*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr. **José Tadeu Abreu de Oliveira**, por ter depositado sua confiança em mim, pela forma rígida e “sutil” com que conduziu a orientação deste trabalho, pelo exemplo de honestidade e competência como ser humano, orientador e cientista, pela convivência parcimoniosa no ambiente de trabalho, pela ajuda e compreensão das minhas limitações e por todos os bons momentos de descontração que tivemos.

A todos os amigos do LabPlant, sob coordenação do Prof. Dr. **Joaquim Albenísio Gomes da Silveira**, em especial ao *Sérgio, Rafea, Josemir, “Dudu” Voegt, João Paulo, Luís Aguiar, Adilson, Aurinívea, Cristina e Raquel*.

A todos os amigos do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, sob coordenação do Prof. Dr. **Benildo de Souza Cavada**, em especial ao *Raniere, Bruno, Raquel, Kíria*

A todos os amigos do Bioplant, sob a coordenação do Prof. Dr. **Francisco Campos**, em especial à *Muciana, Thiago e Camila*.

A todos os amigos do laboratório de Toxinas Vegetais, sob a coordenação da Profa. Dr. **Maria Ilka Vasconcelos**, em especial à *“Dani”, Geórgia (Barbie), Juliana, Henrique, Hermógenes* (agora professor) e *Jane*.

A todos os amigos do laboratório de Bioenergética, sob a coordenação da Profa. Dr. **Dirce Melo** em especial ao *João Henrique, Prof. Hélio Costa, Neuzinha e Débora*.

A todos os amigos do Laboratório do Prof. Dr. **Márcio Viana**, em especial à, *Cléverson, Diego e Jefferson*.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética e Genética Molecular, sob a coordenação do Prof. Dr. **Thalles Barbosa**, em especial ao *Cícero, Denise, Sandrinha, Marina e Patrícia*.

A todos os amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, sob a coordenação do Prof. Dr. **Enéas Gomes**, em especial ao *Carlos Eduardo e Juan*.

A todos os amigos do Laboratório de Lectinas de Algas, sob a coordenação da Profa. Dra. **Norma Benevides**, em especial ao *Ygor, Luana, Edfrank e Gabi*.

À Profa. Dra. **Célia Carlini** por ter me recebido em seu laboratório e por disponibilizar gentilmente a infra-estrutura e o equipamento para análises de espectrometria de massas da UFRGS.

Aos bons novos amigos Jefferson Segalin e Paulo Pinto da UFRGS pela competência, ajuda que me prestaram nas análises das minhas amostras, pelo aprendizado e por terem feito me sentir “em casa”.

A todos os integrantes do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, coordenado pelo Prof. Dr. **José Tadeu Abreu de Oliveira**, meus mais profundos e sinceros agradecimentos à *Darcy, Fernando, Fredy, Eduardo, Alethéia, João Paulo, Ítalo, Gaby, Vladimir, Jonnathan, Davi, Ana Lú, Lara, Alessandra, Alexandra, Pedro Filho, Ana Lúcia e Rodolfo*, por todas as coisas que nem posso citar em poucas linhas.

“Superespecialmente” agradeço de alma à *Darcy* minha amiga para toda hora, conselheira, confidente e pelas farras divertidíssimas e ao meu “irmão” *Ygor* pela harmoniosa convivência e bons momentos em que passamos juntos.

A todos os funcionários do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

Aos meus orientandos, *Thiago, Bruna, Xavier, Priscília, e Carla*, por estarem me “aguentando”.

Aos meus “irmãos” *Paulinho, Naldinho, Mário, Eduardo Barbosa, Stephan Barisic e Rodolfo Lopes* por estarem sempre ao meu lado, apoiando no que fosse preciso e pela excelente convivência.

À minha tia maravilhosa *Lúcia*, seu esposo *Edmilson* e meus primos queridos *Iguinho, Vardinho, Artemis, Alison, Roberto e Alinhinha* por terem sido um porto seguro na minha estadia em Fortaleza durante o período do mestrado e doutorado.

A todos os meus ex-alunos dos cursos de Enfermagem e Educação Física do CAMAEM-Pau dos Ferros, Ciências Biológicas e Medicina do Campus central- Mossoró, por estarem sempre torcendo e me dando força para que tudo desse certo durante todo o período em que estive no Doutorado, principalmente na “reta final”.

Ao meu orientador de graduação (agora colega de trabalho) prof. Dr. *Francisco Barros Barbosa*, que foi o maior incentivador em todas as etapas da minha carreira acadêmica, e também o bom amigo *Kléberson Porpino* pela amizade, bons “papos” e apoio.

À minha querida irmã *Helene Karla*, por tudo.

Aos meus pais, *Hélio e Fátima*, agradeço por terem estimulado à minha liberdade de pensamentos e escolhas (dentre as quais, muitas foram infelizes nas suas óticas, mas

tenham de ser escolhas exclusivamente minhas, escolhas estas que para mim sempre foram felizes, mesmo que não tenham compreendido). Por terem se empenhado em dar a melhor educação escolar que uma pessoa pudesse receber (sem limites de preço), que culminou na minha escolha pelos veios da ciência (que é a mais poderosa ferramenta de discernimento e desenvolvimento da humanidade). Pela tentativa de ensinamentos e exemplos demonstrados de honestidade, competência, caráter indelével, idoneidade e por terem sido sempre, querendo ou não, uma referência (mesmo que eu não deixe transparecer) para mim.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Este trabalho foi possível graças ao auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (**CNPq**).

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa e Tecnologia do Estado do Ceará (**FUNCAP**).

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (**DBBM-UFC**), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (**CAPES**), pela bolsa de Pós-Graduação concedida ao autor, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

RESUMO

ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata*), CV. CE-31, INOCULADAS COM O NEMATÓIDE DAS GALHAS (*Meloidogyne incognita*).

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma importante leguminosa usada como alimento, sendo cultivada, primariamente, nas savanas secas do Continente Africano, na Ásia e na América do Sul, cobrindo mais de 12 milhões de hectares, com produção anual de cerca de 3 milhões de toneladas. O feijão-de-corda se constitui numa cultura de extrema importância em zonas semi-áridas dos trópicos, caracterizadas por baixa precipitação pluviométrica, altas temperaturas, solos arenosos e de baixa fertilidade. Dentre os organismos que causam doenças nos vegetais, os nematóides geram prejuízos anuais de, aproximadamente, vários bilhões de dólares na agricultura mundial e as espécies *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* são as mais danosas. Uma das principais culturas atacadas pelos nematóides é o feijão-de-corda. Em função disso, existe sempre demanda para se buscar melhorar a compreensão dessa relação entre hospedeiros e patógenos objetivando criar novas estratégias para minimizar eventuais perdas. O presente trabalho teve como objetivo identificar as proteínas que têm sua expressão diferenciada em raízes de feijão-de-corda resistente ao *Meloidogyne incognita* (inoculadas e não inoculadas) usando eletroforese bidimensional (2D) associada à espectrometria de massas de proteínas extraídas da raiz total e de mitocôndrias de raiz do cv Pitiúba (CE-31), resistente ao nematóide, inoculada com este patógeno, em comparação com plantas não-inoculadas (controle) em conjunto com análise de expressão gênica semi-quantitativa (PCR semi-quantitativa). Os resultados aqui obtidos demonstraram que houve alteração de pelo menos 22 proteínas nas amostras de raízes inoculadas e mais 22 proteínas de mitocôndrias de raízes, quando comparados com seus respectivos controles e que o ápice das suas alterações ocorriam por volta do 6º dia após a inoculação do patógeno. As proteínas de mitocôndrias não puderam ser identificadas com confiabilidade. Dentre as proteínas de raízes totais identificadas podemos destacar as PR-1, 2 e 3, que são reconhecidamente proteínas de defesa, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase (enzimas anti-estresse oxidativo) e uma leghemoglobina, que pode ser o primeiro relato dessa proteína nesse patossistema. As análises de expressão gênica concordaram perfeitamente com os achados proteômicos.

Palavras-chave: Feijão-de-corda, *Meloidogyne incognita*, Proteômica, Proteínas de defesa de plantas.

ABSTRACT

PROTEOMICS ANALYSIS OF COWPEA ROOTS (*Vigna unguiculata*), CV. CE-31, INOCULATED WITH ROOT-KNOT NEMATODE (*Meloidogyne incognita*).

The cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] is an important leguminous used as food, being cultivated, mostly in arid African savannas, Asia and south of America, covering more over 12 millions of hectares, with annual production about 3 millions of tons. The cowpea it's a culture greatly important in tropics zones characterized by low pluviometric precipitation, high temperature, gravely soils and poor fertility. Among the pathogenic organism that cause plant disease, the nematode, mainly *Meloidogyne* sp. generate annual losses about several billions of dollars all over the world and the *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica* species be the most damagers. One of the main cultures attacked by nematodes is the cowpea. Regard it, there is always needs to improve the knowledge about the relationship between host and pathogens aimed develop novels strategies to diminish eventual losses. The present work aimed identify the differential expression of proteins in *Meloidogyne incognita* resistant cowpea total roots and mitochondria roots cv Pitiúba (CE-31), inoculated and mock inoculated, using 2D electrophoresis assay associated with MS identification and gene expression analyses by semi-quantitative PCR. The results obtained showed at least 22 altered proteins in inoculated total roots and more 22 proteins of mitochondria roots, when compared with their respective controls and the top of alterations occurred next to 6° day after inoculation with pathogen. Mitochondria proteins cannot be identified reliability. Among the total roots proteins we can emphasize PR-1, 2 and 3, recognized as defense proteins, ascorbate peroxidase and superoxide dismutase (anti-oxidative brush enzymes) and a leghemoglobin, which can be the first report about this protein in this pathosystem. The gene expression analyses coincided with proteomics finds.

Keywords: Cowpea, *Meloidogyne incognita*, Proteomics, Plants defense proteins.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁG.
1	Fluxograma geral do protocolo de extração de proteínas de raízes de feijão-de-corda para eletroforese bidimensional.	45
2	Mapa bidimensional de proteínas (SDS-PAGE), gerado a partir da aplicação de 200 µg de proteínas extraídas de raízes de feijão-de-corda, cv. CE-31, com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, contendo Glicerol 20%, PEG 3%, PVPP 1:1 (m/v), EDTA 10 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM, isofocalizadas em fita de 13 cm, em gradiente linear de pH variando de 4-7. Gel corado pelo método do “blue-silver” (Coomassie coloidal).	46
3	Gráfico de oxigrafia típico de solução mitocondrial concentrada mostrando um alto consumo de oxigênio indicando integridade de membranas.	47
4	Gráfico de atividade da enzima citocromo c oxidase. (EBC)=extrato bruto de raízes de feijão-de-corda controle, (EBI)= extrato bruto de raízes de feijão-de-corda inoculadas com o nematóide das galhas, (MC)= mitocôndrias isoladas controle e (MI)= mitocôndrias isoladas de amostras de raízes de feijão-de-corda inoculadas com o nematóide das galhas.	48
5	Mapas bidimensionais de proteínas, gerados com aplicação de 200 µg de proteínas extraídas de raízes de feijão-de-corda, cv. CE-31, com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, contendo Glicerol 20%, PEG 3%, PVPP 1:1 (m/v), EDTA 10 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM, isofocalizadas em fita de 13 cm, em gradiente linear de pH variando de 4-7. Gel corado pelo método do “blue-silver” (Coomassie coloidal) mostrando géis de raízes 6 dias após inoculação. (A) amostra controle e (B) inoculada. As setas vermelhas evidenciam os <i>spots</i> super-expressos e as setas pretas os <i>spots</i> sub-expressos nas raízes inoculadas. No gel controle os círculos pretos mostram as proteínas constitutivas que mantiveram sua expressão quando comparadas com o gel de raiz inoculada no qual essas mesmas proteínas foram subexpressas.	51
6	Perfil bidimensional de proteínas de mitocôndrias de raízes de feijão-de-corda. A e B correspondem respectivamente aos perfis de mitocôndrias de raízes controles e inoculadas com o nematóide das galhas. A e B não estão marcadas com a ferramenta de detecção automática do software ImageMaster 2D Platinum 6.0. C e D correspondem respectivamente aos	

perfis de mitocôndrias de raízes controles e inoculadas com o nematóide das galhas marcadas com a ferramenta de detecção automática do software. Um total de 22 *spots* protéicos foram superexpressos apenas nos géis provenientes de raízes inoculadas (B e D) e não houve subexpressão quando comparados com os controles. Os círculos pretos em D indicam os *spots* superexpressos.

52

7 Mapa bidimensional de proteínas (SDS-PAGE), gerado a partir da aplicação de proteínas de nematóides (2000 J2, 50 massas de ovos e 50 fêmeas) extraídas com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, contendo Glicerol 20%, PEG 3%, PVPP 1:1 (m/v), EDTA 10 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM, isofocalizadas em fita de 13 cm, em gradiente linear de pH variando de 4-7. (A) Gel corado pelo método do “blue-silver” (Coomassie coloidal) e (B) Gel revelado com nitrato de prata. Nenhum *spot* foi detectado visualmente e nem pelo software ImageMaster 2D Platinum 6.0.

53

8 Gráfico em pizza mostrando as porcentagens das classes de proteínas que sofreram alterações nas análises dos géis de eletroforese bidimensionais das raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparados com seus respectivos controles.

57

9 Análise de alteração da asparaginil endopeptidase (*spot* 1). Houve subexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2) Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco

65

10 Análise de alteração da ARG 10 (*spot* 10). Foi constatada a subexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2) Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco.

66

11 Análise de alteração da ACC sintetase (*spot* 2). Foi constatada a superexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2)

- Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco. **68**
- 12** Análise de alteração da cisteinil endopeptidase (*spot 4*). Foi constatada a superexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2) Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco. **69**
- 13** Análise de alteração da chalcona-flavona isomerase (*spot 6*). Foi visto a superexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2) Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco. **71**
- 14** Análise de alteração da superóxido dismutase CuZn dependente (*spot 15*). Foi visto a superexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2) Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco. **72**
- 15** Análise de alteração da leghemoglobina (*spot 21*). Foi visto a superexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2) Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco. **75**
- 16** Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) de isoformas de quitinase (PR-3) 4, 5 e 6 dias após inoculação . Foi visto a superexpressão desta proteína (*spot 18*) nos géis das amostras de raízes inoculadas com

o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. O gene da actina foi usado como controle para todas as análises de expressão gênica. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco. **76**

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁG.
1	Famílias reconhecidas de proteínas relacionadas à patogênese e suas respectivas propriedades.	11
2	Soluções tampões testadas para definir a melhor condição de extração das proteínas de raízes de feijão-de-corda, para aplicação na eletroforese bidimensional.	27
3	Lista das proteínas que sofreram alterações nas raízes de feijão-de-corda inoculadas com <i>M. incognita</i> , através de análise por nano-UPLC-ESI-Q-TOF e ferramentas de bioinformática.	58
4	Lista de Identificação das proteínas que sofreram alterações, exibindo não relevância estatística, nas mitocôndrias de raízes de feijão-de-corda inoculadas com <i>M. incognita</i> , através de análise por nano-UPLC-ESI-Q-TOF e ferramentas de bioinformática.	60
5	Sequências dos iniciadores desenhados para as algumas proteínas que tiveram sua expressão alterada na análise proteômica diferencial de raízes de feijão-de-corda.	63

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1. O Feijão-de-corda	3
2.2. Nematóides fitopatogênicos e sua importância para a agricultura	4
2.3. Mecanismos de defesa de plantas a patógenos	6
2.4. Respostas de defesa das plantas ao ataque de nematóides	10
2.5. Estudos proteômicos da relação nematóide-plantas	14
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Reagentes	20
4.2. Materiais Biológicos	20

4.2.1.	<i>Meloidogyne incognita</i>	20
4.2.2.	Feijão-de-corda	21
5.	MÉTODOS	21
5.1.	Cultivo das plantas, obtenção de fêmeas, massas de ovos, juvenis de segundo estágio (J2) e manutenção da cultura de <i>M. incognita</i>	21
5.2.	Obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2) de <i>M. incognita</i> para inoculação das plantas e análise 2D	22
5.3.	Extração de proteínas totais das raízes para análise proteômica	23
5.4.	Extração da Fração Mitocondrial e determinação de pureza	26
5.5.	Eletroforese Bidimensional e Análise diferencial <i>in silico</i> dos géis	30
5.6.	Excisão e processamento dos <i>spots</i> para espectrometria de massas	33
5.7.	Espectrometria de Massa e identificação dos <i>spots</i>	34
5.8.	Transferência de proteínas para membrana de PVDF e sequenciamento de Edman	35
5.9.	Análise de expressão gênica	36
5.9.1.	Desenho de iniciadores	36
5.9.2.	Obtenção de DNA genômico	37
5.9.3.	Obtenção de RNA total e cDNA	39
5.9.4.	Análise semi-quantitativa de transcritos	41
6.	RESULTADOS	43
6.1.	Extração de proteínas das raízes de feijão-de-corda	43

6.2.	Purificação de mitocôndrias de raízes de feijão-de-corda	43
6.3.	Eletroforese Bidimensional e Análise diferencial <i>in silico</i> dos géis	49
6.4.	Processamento dos <i>spots</i> , identificação por espectrometria de massa e sequenciamento de Edman	54
6.5.	Análise semi-quantitativa de expressão gênica	61
7.	DISCUSSÃO	77
7.1.	Extração de proteínas das raízes de feijão-de-corda	77
7.2.	Purificação de mitocôndrias de raízes de feijão-de-corda	78
7.3.	Análise diferencial <i>in silico</i> dos géis, processamento dos <i>spots</i> , identificação de proteínas por espectrometria de massa e análise semiquantitativa de expressão gênica das amostras de proteínas de raízes	79
7.4.	Géis bidimensionais das mitocôndrias das raízes de feijão-de-corda	93
8.	CONCLUSÕES	98
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1. INTRODUÇÃO

O domínio do cultivo de plantas alimentícias foi um dos pontos centrais que dirigiu a transição do nomadismo para o sedentarismo que, por sua vez, foi crucial para a fortificação dos alicerces das grandes civilizações, já que a agricultura possibilitou a formação de comunidades e do suprimento de suas necessidades básicas nutricionais (KRUGER, 2001; ASSAD e ALMEIDA, 2004). O surgimento e o devido estabelecimento do plantio tiveram significância incomensurável quando, pela primeira vez, foi possível controlar a disponibilidade de alimentos, o que se configurou como um dos grandes passos significativos da história do desenvolvimento da humanidade. Apenas com a introdução da agricultura, é que foi permitido aumento exponencial das populações e o seu estabelecimento em áreas bem definidas, assim como o conseqüente surgimento de aldeias, grandes aglomerados e, finalmente, das cidades (GUPTA, 2004; PEARSALL, 2006). À medida que as comunidades inflavam, houve necessidade paralela de aumentar a oferta e melhorar os valores nutricionais dos alimentos. Com esse intuito, tecnologias e ferramentas cada vez mais avançadas foram sendo desenvolvidas ao longo do tempo. Ainda assim, com a utilização dessas novas estratégias, a produtividade das culturas vegetais é limitada devido a vários fatores desfavoráveis como a disponibilidade de terras agricultáveis, escassez de água, solos pobres em nutrientes e salinos, e a incidência de pragas e doenças (MILLER, 2008).

Dentre os organismos que causam doenças nos vegetais estão os vírus, bactérias, fungos e nematóides. No caso dos nematóides, estes geram prejuízos anuais de, aproximadamente, 157 bilhões de dólares na agricultura mundial e as espécies *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* são as mais danosas (BAICHEVA, 2002; GUERENA e EARLES, 2003; GUERENA, 2006; ABAD *et al.* 2008,). Uma das principais culturas atacadas pelos nematóides é o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (FERY *et al.*,1980; EHLERS *et al.*, 2002; DAS *et al.*, 2008; SAWADOGO *et al.*, 2009).

Em função disso, existe sempre demanda para se buscar melhorar a compreensão dessa relação entre hospedeiros e patógenos objetivando criar novas estratégias para minimizar eventuais perdas. Recentemente, foi confirmada, em nosso laboratório, a existência de um cultivar do feijão-de-corda (cv. CE-31 ou “Pitiúba”) que é extremamente resistente à infestação pelo nematóide *M. incognita* (ANDRADE, 2003; CAPISTRANO 2004). Esse cultivar foi escolhido, portanto, como modelo de estudo para avaliar se há alteração da expressão das proteínas das raízes quando infectadas pelo *Meloidogyne incognita*, em comparação com raízes não-infectadas. Para isso, foi empregada uma abordagem proteômica na tentativa de identificar proteínas diferencialmente expressas, bem como vias metabólicas envolvidas com os mecanismos de defesa da planta. Esse estudo gerou dados que podem subsidiar futuras intervenções bioquímicas e fisiológicas na planta, através de alterações da expressão gênica dirigida, com o objetivo maior de desenvolver plantas de feijão-de-corda resistentes ao ataque do *M. incognita*

2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. O Feijão-de-corda

O feijão-de-corda ou feijão-caupi pertence ao gênero *Vigna*, família Fabaceae, sendo composto de mais de 200 espécies. O gênero *Vigna*, abriga cerca de 20 espécies típicas das regiões tropicais e as espécies de maior importância econômica e nutricional são *Vigna unguiculata* (L.) Walpers, *V. radiata* (L.) Wilczek e *V. mungo* (L.) Hepper, sendo usadas como fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais indispensável para vários povos (FERY, 2002).

Os grãos secos cozidos do feijão-de-corda (*V. unguiculata*) representam sua principal forma de consumo. Entretanto, folhas (em muitas partes do leste da África, continente de onde a planta foi originada), sementes frescas (no sudeste dos Estados Unidos e Senegal) e vagens frescas verdes (em regiões úmidas da Ásia e do Caribe) também são consumidas (EHLERS e HALL, 1997). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial desta espécie de feijão (depois de Nigéria e Níger), com, aproximadamente, 33 milhões de consumidores (EMBRAPA, 2010).

Dentre as principais características do feijão-de-corda, seu elevado conteúdo protéico, associado à boa capacidade de fixação de nitrogênio, boa tolerância às condições de baixa disponibilidade de água nos solos, altas temperaturas e relativa tolerância à salinidade, condições típicas das regiões semi-áridas do nordeste do Brasil, são algumas das que podem ser citadas. No entanto, apesar desta boa capacidade de tolerância às diferentes condições de estresses, parte da produtividade do feijão-de-corda é ameaçada pela ação de diversos fitopatógenos, dentre os quais os fitonematóides (ROBERTS *et al.*, 1996; FREITAS *et al.*, 1999; DAS *et al.*, 2010).

Felizmente, o feijão-de-corda possui cultivares que apresentam características diferenciadas de resistência ou susceptibilidade frente a diversos patógenos (FERY *et al.*, 1980; EHLERS *et al.*, 2002; DAS *et al.*, 2008; SAWADOGO *et al.*, 2009). Com relação ao nematóide das galhas, *M. incognita*, o cultivar CE-31 (ou Pitiúba), em especial, exhibe alta resistência ao ataque deste fitoparasita (ANDRADE, 2003).

2.2. Nematóides fitopatogênicos e sua importância para a agricultura

Mais de 30 espécies de nematóides já foram identificadas como sendo parasitas de plantas, destacando-se os gêneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus* e *Rotylenchulus*. No gênero *Meloidogyne*, as espécies *Meloidogyne incognita* Kofoid & White e *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood têm sido descritas como as mais importantes (ABAD *et al.*, 2003; ATKINSON *et al.*, 2003; FREIRE-FILHO *et al.*, 2005; SAWADOGO *et al.*, 2009).

No Brasil, os prejuízos causados pelos nematóides, de um modo geral, ocorrem em quase todas as culturas. Entretanto, não se dispõe de estimativas concretas das perdas na produção da maioria das plantas cultivadas, embora se saiba que, em determinados locais, chega a ser em torno de 24% em café, tomate e soja (EMBRAPA, 2010). Aqui, os nematóides do gênero *Meloidogyne* são os mais nocivos à agricultura, sendo *M. incognita* e *M. javanica* as que atacam a maioria das plantas cultivadas e, igualmente, exibem marcante patogenicidade. Particularmente no feijão-de-corda, a incidência desses nematóides é frequente, sendo responsável por grandes prejuízos (ANDRADE, 2003). Levantamentos sobre a meloidoginose, doença causada por estes nematóides, classificam-na como uma das maiores causas de estresse em plantas, levando a perdas consideráveis na produção (ATKINSON *et al.*, 2003; DAVIS *et al.*, 2008).

O conhecimento do ciclo de vida do nematóide das galhas é um requisito básico para melhor compreensão de como o verme parasita a planta hospedeira, até levar à formação das galhas e do sítio de alimentação. Inicialmente, ainda dentro do ovo, o indivíduo jovem, denominado juvenil de primeiro estágio (J1), sofre uma ecdise, dando origem ao estágio infectivo denominado J2 ou juvenil de segundo estágio. O J2, ao eclodir, tem a capacidade de perceber sinais químicos que são liberados pelas raízes de uma potencial planta hospedeira, por meio de órgãos quimiorreceptores. Uma vez captados os sinais, o J2 migra até a zona de alongamento da raiz, um pouco acima da coifa (CAILLAUD *et al.*, 2008). Por meio de várias enzimas secretadas pelo J2 ele dá início ao processo de degradação da parede celular vegetal, e migra intra- e intercelularmente para o floema primário ou para as

células indiferenciadas adjacentes ao parênquima, onde ele se torna sedentário e estabelece o sítio de alimentação caracterizado pela presença de células gigantes (hipertrofiadas), multinucleadas, geradas por sucessivas divisões mitóticas (cariocinese) sem ocorrência da citocinese (ABAD, 2008).

A meloidoginose produz lesões irreversíveis na raiz, comprometendo sua capacidade de absorção de água e nutrientes, prejudicando o desenvolvimento normal das plantas. Como consequência desta deficiência nutricional, há redução no crescimento, aparecimento de folhas pequenas, seguido de seu amarelecimento (clorose) e murcha prematura. Também, os frutos são pouco desenvolvidos e sua produção é reduzida ou mesmo interrompida (GERMANI & PLENCHETE, 2004). Esta redução na capacidade de produção, ou mesmo a morte das plantas, traz considerável impacto negativo à agricultura mundial, levando a prejuízos de vários milhões de dólares. Outra forma de se considerar o impacto de nematóides parasitas de plantas é através das estratégias de manejo empregadas no controle dessa praga. A aplicação de nematicida é maior que três vezes o total de produtos químicos utilizados para combater insetos, fungos e ervas daninha em fazendas experimentais (JAVED *et al.*, 2008).

2.3. Mecanismos de defesa de plantas a patógenos

Durante a evolução, o contato das plantas com patógenos (vírus, bactérias, fungos, nematóides, insetos e outros) permitiu que os vegetais desenvolvessem variados e sofisticados mecanismos de defesa (MILLER *et al.*, 2008). Esses mecanismos de proteção podem ser constitutivos ou induzidos e envolvem tanto as barreiras físicas como vias metabólicas específicas e compostos químicos. Esses últimos podem atuar, diretamente,

sobre patógenos, sendo letais, ou apenas deter seu desenvolvimento na planta. As defesas físicas são barreiras estruturais constitutivas como lignina, espinhos, pêlos e tricomas etc. Já as defesas químicas induzidas, envolvem a produção de espécies reativas de oxigênio, de metabólitos secundários e compostos primários ativos contra patógenos, como os peptídeos e proteínas relacionadas à defesa (VERONESE *et al.*, 2003; LIPKA e PANSTRUGA, 2005; MILLER *et al.*, 2008).

As interações planta-patógeno, de um modo geral, são classificadas em compatíveis (patógeno virulento e hospedeiro suscetível) e incompatíveis (patógeno avirulento e hospedeiro resistente). Nas interações compatíveis, o sistema de defesa da planta é ativado tardiamente ou não é ativado, garantindo o sucesso do organismo agressor e condicionando o aparecimento da doença na planta agredida. Nas interações incompatíveis, as estratégias de defesa são rápida e eficientemente ativadas, conduzindo à resistência, que é manifestada pela inabilidade do patógeno de penetrar, crescer ou se multiplicar na planta (AGRAWAL, 2007). Em termos moleculares, a ativação de defesas induzidas depende da combinação de genes específicos (genes de resistência-*R* e avirulência-*Avr*) e é desencadeada pelo reconhecimento refinado da invasão do patógeno pela planta. Sua percepção envolve moléculas elicitoras e sinalizadoras bem como receptores com alto grau de especificidade condicionado à presença de um gene *R*, dominante na planta, e um gene *Avr* dominante no patógeno. Os genes *R* codificam proteínas da classe das NB-LRR (do Inglês *Nucleotide-bind site-leucine-rich repeat*), que reconhecem efetores do patógeno, desencadeando a resposta imune da planta. Essa elaborada estratégia de reconhecimento gene-a-gene postula que, para cada gene que condiciona a doença em um sistema hospedeiro, existe um gene correspondente no parasita que condiciona à patogenicidade (FLOR, 1971). Essa é a base molecular do sistema de defesa em plantas que define se a relação entre planta e patógeno será de compatibilidade ou incompatibilidade (GACHOMO *et al.*, 2003; EITAS e DANGLA, 2010).

Esse sistema imune da planta reconhece padrões de superfície invariantes de micróbios/patógenos (MAMP/PAMP, siglas dos termos em Inglês - Microbial/Pathogen associated Molecular Patterns), através dos receptores de reconhecimento constitutivos presentes no vegetal, desencadeando, assim, a imunidade ativada por PAMP (PAMP-triggered immunity - PTI) que é a base para a resistência da planta contra patógenos não compatíveis. Essas intrincadas interações moleculares desencadeiam, na célula, cascatas de sinalizações que culminam na resposta de defesa da planta (GUST *et al.*, 2010). Uma dessas respostas, que ocorre no sítio primário de infecção, é a reação de hipersensibilidade ou resposta hipersensitiva (HR). Essa resposta, dependente da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), leva ao colapso e morte celular localizado no sítio de infecção. Esse fenômeno é também conhecido como morte programada celular (PCD) e se assemelha à apoptose animal.

A HR é ativada pela planta imediatamente após o ataque de um patógeno. Caracteriza-se por alterações drásticas na célula que resultam na destruição sumária de uma quantidade limitada do tecido do organismo hospedeiro, no local de tentativa de infecção pelo patógeno. Como resultado, o invasor permanece confinado na região necrótica próxima ao sítio de infecção. A produção de fitoalexinas, o aumento súbito e temporário de espécies reativas de oxigênio (ROS), indução de enzimas hidrolíticas, proteínas relacionadas à patogênese (PR-Proteínas), inibidores de proteinases são alguns dos eventos relacionados com essa resposta (SASABE *et al.*, 2000; SCHENK *et al.*, 2000; ARIMURA *et al.*, 2005).

Outro tipo de mecanismo de defesa ativado, subsequentemente, após a HR, em plantas, é a resposta sistêmica adquirida (SAR). A SAR caracteriza-se pela indução da resistência em locais da planta distantes do local primário da infecção pelo patógeno. Tem papel crucial para impedir a propagação da doença através da planta. É um tipo de resistência induzida que, também, protege a planta contra o ataque de um largo espectro de microorganismos diferentes daquele que deu origem a SAR. Nestas condições, tanto na HR

quanto na SAR, diversos genes que codificam as proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) são transcritos. As PR-proteínas são umas das mais importantes classes de moléculas de defesa da planta e podem ser definidas como aquelas que são sintetizadas ou induzidas em resposta a diferentes agentes patogênicos como vírus, bactérias, fungos, e nematóides. Podem também ser induzidas em resposta a estresses abióticos, injúrias mecânicas, sendo muitas delas encontradas no espaço intercelular (OKA *et al.*, 1997; VAN LOON e VAN STRIEN, 1999). As PR-proteínas foram primeiramente identificadas em plantas de fumo que apresentavam reação de hipersensibilidade ao vírus do mosaico do tabaco (TMV) por dois grupos independentes (VAN LOON e VAN KAMMEN, 1970; GIANINAZZI *et al.*, 1970). Inicialmente, foram divididas em cinco grandes grupos (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4 e PR-5) de acordo com sua sequência de aminoácidos, massa molecular, localização extracelular, resistência à proteólise e acúmulo em resposta às lesões (BOWLES, 1990). Como análogas dessas proteínas, PR-proteínas adicionais foram identificadas e agrupadas em 11 famílias (DATTA e MUTHUKRISHNAN, 1999) e, mais recentemente, com a descoberta de novas proteínas com as mesmas características, agrupadas em 17 famílias (**TABELA 1**) (VAN LOON *et al.*, 2006). As PR-proteínas se acumulam no tecido infectado, bem como nos tecidos não infectados, próximos e/ou distantes do sítio de infecção do mesmo vegetal, sendo fundamentais para o mecanismo de defesa de plantas (JWA *et al.*, 2006; MILLER *et al.*, 2008). A participação de alguns compostos, como o óxido nítrico, etileno, ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA), tem sido sugerida como sinalizadores da SAR, e conseqüentemente, também, na produção de PR-proteínas. A participação do SA, na SAR, por exemplo, deve-se à sua presença, em altos níveis, em plantas que apresentam essa resposta (MOLINARI e LOFFREDO, 2006; ARASIMOWICZ e FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

2.4. Respostas de defesa das plantas ao ataque de nematóides

Alguns poucos genes e outras moléculas envolvidas na incompatibilidade patogênica entre nematóides e plantas já foram descobertos, entretanto, a elucidação dos mecanismos dessa interação se mantém como um grande desafio. As respostas das plantas durante uma interação incompatível com nematóides têm sido analisadas bioquimicamente, mas, até agora, poucos patossistemas foram estudados (POTENZA *et al.*, 2001;; CAILLAUD *et al.*, 2007).

TABELA 1. Famílias reconhecidas de proteínas relacionadas à patogênese e suas respectivas propriedades (Adaptada de Van Loon *et al.*, 2006).

Família	Propriedades
PR-1	Desconhecida
PR-2	β -1,3-glucanase
PR-3	Quitinase tipo I,II,IV,V,VI,VII
PR-4	Quitinase tipo I e II
PR-5	Semelhante à taumatina
PR-6	Inibidores de proteinases
PR-7	Endoproteinase
PR-8	Quitinase tipo III
PR-9	Peroxidase
PR-10	Semelhante à ribonuclease
PR-11	Quitinase tipo I
PR-12	Defensina
PR-13	Tionina
PR-14	Proteína transferidora de lipídeos
PR-15	Oxalato oxidase
PR-16	Semelhante à oxidase
PR-17	Desconhecida

Em cultivares de alfafa resistente ao *M. incognita*, os genes denominados de *Meloidogyne incognita alfalfa* (*Mia* 1-6) se mostraram como possíveis marcadores de resistência aos nematóides das galhas. Esses genes estão relacionados a proteínas cujas funções estão ligadas à maturação do RNA, vias gluconeogênicas, oxidoredução e tolerância a estresses múltiplos (POTENZA *et al.*, 2001). Também, foi encontrado no algodão (*Gossypium hirsutum*) o gene *MIC-3* (*Meloidogyne incognita cotton*), o qual se mostrou um eficaz marcador de resistência desta espécie (ZHANG *et al.*, 2002).

No caso específico do feijão-de-corda, existe um gene ou *locus* que tem sido bastante utilizado para o desenvolvimento de genótipos variantes resistentes ao nematóide das galhas (PETRILLO e ROBERTS, 2005; PETRILLO *et al.*, 2006). Este *locus* foi inicialmente descrito por Fery e Dukes (1980) e confere resistência a vários tipos de nematóides do gênero *Meloidogyne*, tais como *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla*, e *M. javanica*. Estudos genéticos têm indicado que este *locus* deve possuir vários alelos incluindo *rk*, *Rk* e *Rk2*. O Alelo *Rk2*, especialmente, confere grande resistência a muitas raças de *M. incognita* e *M. javanica*. Um único gene recessivo não diretamente ligado ao *Rk* (presente em um *locus* separado), o qual aumenta a resistência da planta hospedeira quando combinado com o *Rk*, foi identificado e denominado de *rk3*. Esses genes de resistência estão sendo bastante estudados devido à sua importância (DAS *et al.*, 2008). Recentemente, estudos de caracterização histológica da interação incompatível mediada pelos genes de resistência *Rk* entre o feijão-de-corda, cultivar CB46 (resistente), e o *M. incognita* raça 3 foram realizados. Foi constatado, surpreendentemente, que a resposta de incompatibilidade era bastante retardada e não havia morte celular mediada por resposta hipersensitiva (HR) como tipicamente ocorre em algumas plantas resistentes aos nematóides das galhas (DAS *et al.*, 2008; DAS *et al.*, 2010).

No *Lycopersicon peruvianum*, genes pertencentes, também, à classe *Mi*, que, aparentemente, estão relacionados à resistência desta planta ao nematóide de galha, foram descobertos (PÉREZ *et al.*, 2006). Na raiz e nas folhas do tomateiro (*Lycopersicon*

esculentum) de uma linhagem resistente a meloidoginose, foi observado aumento significativo nos níveis de ácido salicílico (SA) no cultivar resistente quando comparado com um cultivar susceptível, ambos inoculados com o *Meloidogyne* spp. (MOLINARI, 2006). Já é bem estabelecido que o SA está intimamente relacionado ao desencadeamento da resposta sistêmica adquirida (SAR). Achados mais recentes reforçam que a presença desse sinalizador na planta é um excelente indicador de interação incompatível planta-patógeno. Essa molécula já foi relacionada, diretamente, com a expressão do gene *Mi-1* em cultivares de tomateiro resistentes à infecção de nematóides (BRANCH *et al.*, 2004).

Andrade (2003) demonstrou que algumas enzimas relacionadas à defesa contra patógenos como β -1,3-glucanases, quitinases e inibidores de proteinases cisteínicas, além de enzimas envolvidas com estresse oxidativo (peroxidase, catalase e superóxido dismutase), apresentaram grande aumento de atividade em extratos de raiz de feijão-de-corda (*V. unguiculata*), cv. CE-31 (cultivar resistente), previamente inoculado com o nematóide de galha, quando comparado com plantas controles, não inoculadas. Ainda assim, esse campo de pesquisa envolvendo estudos de proteínas relacionadas aos mecanismos de defesa das plantas aos nematóides das galhas se encontra em estágios primários de desenvolvimento e poucos dados foram publicados até o presente momento.

2.5. Estudos proteômicos da relação nematóide-plantas

Proteoma é o conjunto de proteínas presentes numa organela, célula, tecido, órgão ou organismo vivo sob determinadas condições (ONG e MANN, 2005; SCHULZE e USADEL, 2010). A análise proteômica, por sua vez, é definida como sendo o conjunto de metodologias analíticas empregadas para caracterizar, quantitativamente e qualitativamente, um proteoma. Muitos experimentos usam a proteômica como uma ferramenta que permite a

comparação de amostras de proteínas numa condição de estresse a qual esteja submetido o organismo vivo, com aquelas presentes numa situação padrão. Esse tipo específico de abordagem é denominado de análise proteômica diferencial (para distinguir das análises proteômicas de amostra total). O estudo proteômico é uma área interdisciplinar da ciência que agrega química, física, biologia (bioquímica) e informática (ZHANG *et al.*, 2008). Neste contexto, muitas vezes é necessário não somente determinar o conjunto de proteínas presentes em uma amostra e seus níveis, o que, por si só, já apresenta elevados graus de dificuldades, mas, também, caracterizar as inúmeras e comumente presente isoformas das proteínas, produtos de modificações pós-traducionais sofridas pelas mesmas e, por fim, como essas proteínas interagem entre si. Tais estudos são bastantes desafiadores devido ao alto grau de complexidade das amostras, bem como às baixíssimas concentrações de determinadas proteínas, o que requer o uso de técnicas analíticas bastante sensíveis (CHEN *et al.*, 2007).

A eletroforese bidimensional (2D) é, atualmente, uma técnica que pode ser rotineiramente aplicada para a separação de misturas verdadeiramente complexas de proteínas. Além da informação qualitativa, a eletroforese 2D é capaz de prover resultados quantitativos, possibilitando o monitoramento dos níveis de expressão das proteínas avaliadas (SUCKAU *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008). Essa técnica promove a separação de proteínas em duas dimensões, de acordo com duas propriedades independentes. Na primeira dimensão, que é a focalização isoeletrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI). Após a IEF, as proteínas são transferidas para a segunda dimensão, onde são separadas de acordo com suas respectivas massas moleculares relativas em gel de poliacrilamida, na presença do agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (GÖRG *et al.*, 2000; LIEBOLD *et al.*, 2006).

Após a eletroforese 2D, a etapa de identificação das proteínas na mistura pode ser feita através do emprego de técnicas de espectrometria de massa [LC-MS/MS (*liquid*

chromatography coupled to tandem mass spectrometry)], por exemplo. Para isso, deverá ser feita fragmentação da(s) proteína(s) individualmente isolada(s) do gel 2D em seus peptídeos correspondentes, usando-se enzimas (tripsina, por exemplo) que promovem a clivagem das proteínas em locais específicos conhecidos. A mistura de peptídeos obtida é, então, analisada por espectrometria de massa que fornece os espectros de massas correspondentes, tendo como base a relação massa/carga (m/z), permitindo conhecer a massa molecular dos peptídeos [*peptide mass fingerprint* (PMF)]. Ao final do processo, as informações geradas de pl, massa molecular e sequência de aminoácidos são usadas para alimentar programas de busca disponíveis na internet, para tentar identificar as proteínas já depositadas em bancos de dados de acesso livre (XIE *et al.*, 2009)

Portanto, a separação de proteínas por meio da técnica de eletroforese bidimensional e subsequente identificação por MS constituem-se em umas das estratégias mais empregadas em análise proteômica e devem estar aliadas a algum tipo de análise de expressão gênica, como, por exemplo, a presença dos transcritos correspondentes. A união dessas tecnologias é muito útil quando se pretende realizar análises comparativas entre amostras de proteínas em diferentes condições. Isso inclui, por exemplo, a comparação entre amostras de proteínas extraídas de plantas saudáveis e plantas infectadas por patógenos, quando na busca de proteínas diferencialmente expressas, que possam servir como biomarcadores dessa situação de estresse biótico ou que possam indicar as vias metabólicas acionadas ou, ainda, proteínas envolvidas com a defesa da planta.

Recentemente, muitas pesquisas têm usado essa abordagem (proteoma associada à validação por análise de expressão gênica), tendo sido obtidos resultados surpreendentes. A grande maioria dos trabalhos faz análise proteômica de amostra total de um ou mais tecidos específicos da planta e avaliam, principalmente, a identidade de proteínas relacionadas ao crescimento, desenvolvimento, e alguns poucos tipos de respostas a estresses bióticos e abióticos (KATAM *et al.*, 2010). No entanto, quase não há nada na literatura que aborde, especificamente, a análise proteômica entre a interação plantas-

nematóides, muito menos com o feijão-de-corda. Existem trabalhos proteômicos publicados, focando apenas o nematóide das galhas, mas não a planta (BELLAFIORI, *et al.*, 2008). Um dos poucos artigos publicados sobre esse patossistema, utilizou o estudo proteômico associado à análise de expressão gênica por PCR semi-quantitativa para avaliar a interação planta (linhagens *near isogenic*) x nematóide (*Glycine max* x *Heterodera glycines*), através dos quais foi encontrada uma proteína correspondente a um alelo de resistência da planta contra o nematóide. Esse gene, validado por PCR após a análise do gel 2D, denominado *rhg1*, provavelmente trata-se de um gene regulador da expressão de vários outros genes (regulador multigênico), de modo que as linhagens que possuíam esse referido gene apresentavam alterações nos mapas 2D de plantas inoculadas. De fato, 30 spots de proteínas sofreram alteração de expressão de, pelo menos, 2x (subexpressos ou superexpressos), quando comparados com mapas de plantas controles (AFZAL, *et al.*, 2009).

Apesar da escassez de estudos proteômicos aplicados às relações plantas x nematóides, eles tendem a crescer, pois informações valiosas podem ser geradas através do emprego da abordagem experimental proteômica, quando devidamente validada por meio de análise de expressão gênica.

Considerando esses poucos achados e as respostas das plantas aos mais variados tipos de estresses, sobretudo os bióticos, quais seriam as proteínas que se expressariam, diferencialmente (super ou subexpressas), na raiz do cultivar de feijão-de-corda (CE-31) resistente ao nematóide das galhas, quando sob ataque desse patógeno?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Esse trabalho tem como objetivo geral identificar as proteínas que têm sua expressão diferenciada em raízes de feijão-de-corda em decorrência da infecção com *Meloidogyne incognita*. Esse estudo foi feito através de análises de mapas proteômicos (eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massas) de proteínas extraídas das raízes da cultivar Pitiúba (CE-31) que é, reconhecidamente, altamente resistente à meloidoginose, com o intuito de identificar proteínas e/ou rotas metabólicas envolvidas com a defesa do feijão-de-corda à infestação por esse nematóide.

3.2. Objetivos específicos

1. Obter géis de eletroforese bidimensional das raízes do feijão-de-corda, inoculado e não inoculado com o nematóide *M. incognita*, raça 3, em diferentes tempos.
2. Realizar análise diferencial desses géis, para identificar os *spots* de proteínas cujos padrões foram modificados, após a inoculação com o nematóide.
3. Investigar alterações de expressão de proteínas mitocondriais de raízes de feijão-de-corda, inoculado com *M. incognita* (raça 3).
4. Identificar proteínas das raízes de feijão-de-corda que foram alteradas em plantas infectadas com *M. incognita*, através de espectrometria de massas (MALDI-TOF e/ou ESI-Q-TOF).
5. Avaliar a expressão de transcritos de RNAm das raízes de feijão-corda que foram alterados em decorrência da infecção com *M. incognita*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Coomassie Brillhante Blue G-250, piridina, polietileno glicol (PEG), polivinilpolipirrolidona (PVPP), β -mercaptoetanol (2-ME), acrilamida, bis-acrilamida foram obtidos da Sigma-Aldrich, Brasil. 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), Ditiotretitol (DTT), ácido etileno diaminotetracético (EDTA), Fluoreto de Fenilmetil sulfonil (PMSF), iodoacetamida, óleo mineral, tiouréia, tiras para focalização isoelétrica, uréia, IPG buffer 3-10, dodecil sulfato de sódio (SDS) foram obtidos da GE Healthcare do Brasil. Tripsina, grau seqüenciamento (MS grade), modificada, foi obtida da Promega, Brasil. Ácido tricloroacético (TCA), ácido trifluoroacético (TFA) e os demais reagentes foram de grau analítico e obtidos de diferentes fornecedores.

4.2. Materiais Biológicos

4.2.1. *Meloidogyne incognita*

Nematóides da espécie *Meloidogyne incognita* Kofoid & White, raça 3, cedidos pelo Instituto de Agronomia do Paraná – IAPAR, foram mantidos em condições de casa de vegetal, infectando raízes de plantas de tomate, berinjela ou quiabo, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) UFC.

4.2.2. Feijão-de-corda

Sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], cv. CE-31 (ou Pitiúba), resistente à *Meloidogyne incognita* (raça 3), foram utilizadas. Essas sementes foram fornecidas pelo banco de sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

5. MÉTODOS

5.1. Cultivo das plantas, obtenção de fêmeas, massas de ovos, juvenis de segundo estágio (J2) e manutenção da cultura de *M. incognita*

Sementes de tomate, berinjela e quiabo, lavadas exaustivamente em água destilada, foram postas para germinar em jarros de plástico de tamanho médio (1,5 L), contendo areia de leito de rio, previamente lavada e autoclavada (121 °C, $9,8 \times 10^4$ Pa, 30 min), e húmus, na proporção de 2:1 (m/m). O húmus foi esterilizado nas mesmas condições descritas acima.

Passados 20 dias após plantio das sementes, cada planta foi inoculada com 2 mL de uma suspensão concentrada de juvenis do segundo estágio (1000 J2/mL), depositados na base do caule, em um orifício de 2 cm de profundidade, feito no substrato. As raízes foram coletadas trinta dias após inoculação e lavadas, cuidadosamente, em água corrente, para remoção das partículas de substrato aderidas. As massas de ovos foram coradas por imersão das raízes em solução de fucsina ácida 0,1%, durante 30 min (BYRD *et al.*, 1983) e coletadas com auxílio de microscópio estereoscópico e agulha de seringa, e acondicionadas em tubos de microcentrífuga (tipo eppendorf) contendo água destilada. Parte dessas massas de

ovos foi usada, imediatamente, na inoculação de novas plantas (tomate, berinjela e quiabo), com o objetivo de manter a cultura. A outra parte das massas de ovos foi utilizada para obtenção de juvenis de segundo estágio (J2). Nesse caso, as massas de ovos foram deixadas para eclodir em água destilada durante 3 dias.

Além desse inóculo, fêmeas foram retiradas, manualmente, das galhas, também com auxílio de microscópio estereoscópico e agulha de seringa, sendo transferidas para tubos tipos eppendorf, contendo tampão fosfato de sódio a 0,25 M, pH 6,0, na proporção de uma fêmea por microlitro de tampão, e utilizadas imediatamente (BYRD *et al.*, 1983). Essas fêmeas foram usadas, conjuntamente com J2, para análises 2D, a fim de verificar possíveis contaminações dos mapas protéicos de raízes de feijão-de-corda, infectadas com o nematóide, com proteínas próprias do patógeno.

5.2. Obtenção dos juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* para inoculação das plantas e análise 2D

Para assepsia das massas de ovos obtidas, estas foram imersas em solução de hipoclorito de sódio contendo 0,05% (v/v) de cloro ativo, por 3 min, seguida de 3 lavagens em água destilada, estéril, para retirada do hipoclorito (HUSSEY *et al.*, 2002). Após assepsia, as massas de ovos foram colocadas em câmaras de eclosão, consistindo de uma tela de nylon de malha fina com poros de 150 µm de diâmetro (especificado pelo fabricante), colocada sobre a lâmina de água grau Milli-Q, estéril, contida em placa de Petri de 2 cm de diâmetro. As câmaras de eclosão foram acondicionadas em recipientes fechados, forrados com papéis de filtro umedecidos e mantidas à temperatura ambiente. Os inóculos (J2) que eclodiram migraram através da malha, sendo coletadas na placa de Petri. Nas primeiras 24 horas, os J2 eclodidos foram descartados. J2 com tempo de eclosão variando entre 48 e 72

horas foram retirados a cada 12 horas, ajustados para a concentração estoque de 2000 J2/mL, armazenados em béquer à temperatura ambiente, e utilizados, imediatamente.

5.3. Extração de proteínas totais das raízes para análise proteômica

Inicialmente, sementes de feijão-de-corda (cv. CE-31) foram plantadas com a finalidade de realizar ensaios preliminares de definição do melhor protocolo de extração das proteínas das raízes de plantas saudáveis, visando os experimentos de 2D. Sementes esterilizadas, superficialmente, com solução de hipoclorito 0,5% (v/v) por 30 s, foram colocadas para germinar, sendo acomodadas entre duas folhas de papel-de-filtro (Germitest™) estendidas, dentro de bandejas de plástico fechadas, guardadas em câmaras escuras. Os papéis-de-filtro foram umedecidos 2x por dia. Após 3 dias, as plântulas que germinaram foram selecionadas e colocadas para crescer em 100 jarros de plástico de tamanho médio (1,5 L), acomodados em casa de vegetação, com temperatura média de 29 ± 5 °C, recebendo 700 μmol de fótons/ m^2/s , e déficit de pressão de vapor (VPD) de 1 kPa. Cinco plântulas foram colocadas por jarro (perfazendo 500 plântulas), contendo areia de leito de rio (aproximadamente 1500 g de areia por jarro), exaustivamente lavada e autoclavada (121 °C, $9,8 \times 10^4$ Pa, 30 min). Passados 12 dias após a transferência das plântulas para os jarros, as raízes foram excisadas, maceradas em nitrogênio líquido, até apresentarem textura de pó, sendo acondicionadas a -80 °C para utilização posterior. Para definir a solução que proporcionasse a melhor solubilização e extração das proteínas de raízes do feijão-de-corda, adequada às análises 2D, várias soluções tampões, de diferentes pHs, foram adicionados ao pó obtido anteriormente (**TABELA 2**).

Todos os diferentes tampões foram testados com pó da raiz na proporção de 1:2 (m/v) e deixados sob suave agitação, num agitador automático, em câmara fria, à

temperatura de 4 °C, durante 2 h. Logo após esse período, as amostras foram centrifugadas (2000 x g, 10 min), o sobrenadante coletado, a concentração de proteínas totais dosada (BRADFORD, 1976), sendo os géis bidimensionais, preliminares, feitos para estabelecer a melhor condição (tampão) de extração.

Após definição do melhor tampão de extração e avaliação das quantidades de proteínas extraídas, mapas eletroforéticos 2D foram gerados aplicando 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 µg de proteínas de raiz/gel, para avaliar, dessa vez, a condição de melhor resolução visual do gel 2D, sem que houvesse saturação.

Uma vez definida a condição mais adequada para a obtenção de géis 2D, uma nova plantação foi feita, semelhante à citada anteriormente. Metade das plantas de *V. unguiculata*, cv. CE-31, com 12 dias após o plantio, foram inoculadas com 2 mL de uma suspensão concentrada de J2 (1000 J2/mL) depositada na base do caule, em um orifício de 2 cm de profundidade, feito no substrato. A outra metade das plantas foi tratada apenas com água destilada (plantas controles). As plantas foram regadas, 1 vez por dia, ao final da tarde, com 100 mL de solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) por jarro. Os jarros foram alojados dentro de armações metálicas cobertas com tecido de nylon de trama fina, para minimizar quaisquer eventuais ataques de vírus, bactérias, esporos/fungos, insetos ou outros possíveis elicitores, para não interferir nas respostas de defesa da planta frente à infecção pelo nematóide *M. incognita*. As raízes foram coletadas nos tempos 0, 12, 24 h, e 2, 4, 6, 8, 10 dias após a inoculação, sendo o total de 12 jarros (5 plantas por jarro) por tempo coletado (6 controles e 6 inoculados), totalizando, assim, 96 jarros para o experimento. Logo após cada coleta, as raízes foram lavadas com água destilada, secadas, cuidadosamente, em papel-toalha, excisadas a, aproximadamente, 1 cm abaixo do colo, pesadas e, imediatamente, maceradas, secadas cuidadosamente em papel-toalha, excisadas a, aproximadamente, 1 cm abaixo do colo, pesadas e, imediatamente, maceradas em nitrogênio líquido, até obtenção de amostras de pó de textura fina, sendo acondicionadas em sacos plásticos, limpos, selados (6 sacos contendo amostras de raízes

inoculadas e 6 controles, para cada tempo de coleta) e armazenados a -80 °C, até o momento de uso. Os experimentos foram realizados em triplicatas, para cada tempo de coleta e cada condição (controle e inoculado). Foram utilizados 6 g de raiz para cada repetição e por cada tempo de coleta. Após ficar em contato com o tampão de extração (12 mL) por 2 h, sob agitação suave, em agitador automático, a 4 °C, as amostras foram centrifugadas (2000 x g, 10 min) e o sobrenadante coletado. As proteínas contidas no sobrenadante foram precipitadas com TCA a 10% (v/v) em acetona, a -80 °C, por 12 h, e, posteriormente, centrifugadas (10000 x g, 4 °C, por 10 min). O precipitado foi coletado, lavado com metanol (1:1, v/v, 2 vezes) e acetona (1:1, v/v, 2 vezes), nessa ordem, secado em dessecador a vácuo e ressuspendido em 300 µL de solução de uréia (7M) tiouréia (2M). A concentração de proteínas totais foi estimada (BRADFORD, 1976) com base numa curva padrão construída com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA), sendo descontada da leitura de absorvância produzida pela solução de uréia (7M)/tiouréia (2M). Após ajuste das concentrações, as amostras foram submetidas à separação por focalização isoelétrica (IEF).

5.4. Extração da Fração Mitocondrial e determinação de pureza

Para purificação das mitocôndrias, experimentos preliminares foram feitos usando plantas híidas, com 16 dias de plantio, com o objetivo de estabelecer um protocolo ótimo de extração dessas organelas.

TABELA 2. Soluções tampões testadas para definir a melhor condição de extração das proteínas de raízes de feijão-de-corda, para aplicação na eletroforese bidimensional

Piridina 0,05 M, tiouréia 0,01 M, SDS 1% (m/v), HCl 0,1M, pH 5,0.
Piridina 0,05 M, tiouréia 0,01 M, SDS 1% (m/v), HCl 0,1 M, pH 5,0, contendo PVPP 1:2 (m/v).
Tris-HCl 0,02 M, pH 6,0, contendo glicerol 20% (v/v) + PEG 3% (v/v).
Tris-HCl 0,02 M, pH 6,0, contendo glicerol 20% (v/v) + PEG 3% (v/v) e PVPP 1:2 (m/v).
Tris-HCl 0,04 M, pH 7,0, contendo sacarose 0,25 M, Triton X-100 1% (v/v), EDTA 0,01 M, DTT 10^{-3} M e PMSF 10^{-3} M.
Tris-HCl 0,04 M, pH 7,0, contendo sacarose 0,25 M, Triton X-100 1%, EDTA 10^{-3} M, DTT 10^{-3} M PMSF 10^{-3} M e PVPP 1:2 (m/v).
Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo glicerol 20% (v/v) + PEG 3% (v/v).
Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo glicerol 20% (v/v) + PEG 3% (v/v) e PVPP 1:2 (m/v).
Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo glicerol 20% (v/v), PEG 3% (v/v), PVPP 1:2 (m/v), EDTA 0,01 M, DTT 10^{-3} M, PMSF 10^{-3} M.
Tris-HCl 0,1 M, pH 9,0, contendo EDTA 0,01 M, Triton X-100 1% (v/v).
Tris-HCl 0,01 M, pH 9,0, contendo EDTA 0,01 M, Triton X-100 1% (v/v), PVPP 1:2 (m/v).

O plantio foi realizado nas mesmas condições descrita no item 5.3. As amostras de raízes, coletadas frescas, foram imediatamente usadas para purificação das mitocôndrias. Porém, nesse caso, não houve maceração das raízes com nitrogênio líquido, para evitar destruição das estruturas mitocondriais, comumente causada por cristais formados pelo rápido resfriamento propiciado pela imersão em nitrogênio líquido. Estabelecido o protocolo de purificação das mitocôndrias puras e funcionais, de acordo com a descrição de Millar *et al.* (2001), com algumas modificações, um novo cultivo foi feito com plantas não-inoculadas e inoculadas com *M. incognita*, como já descrito no item 5.3. Raízes (500 g) excisadas de plantas, 4 e 5 dias após inoculação, foram maceradas em graal com auxílio de pistilo, usando 500 mL (1:1, m/v) de meio constituído por: 0,3 M de manitol; 0,5% (m/v) de BSA; 0,5% (m/v) de polivinilpirrolidona-40; 2×10^{-3} M de EDTA; e 2×10^{-2} M de cisteína, pH 8,0 (solução manitol). A suspensão foi filtrada em tecido de trama fina (Nylon, 150 μ m) para remoção do resíduo, centrifugada (1000 x g, 5 min, 4 °C), e o sobrenadante obtido centrifugado agora a 18000 x g, 15 min, a 4 °C. O precipitado formado foi lavado com a solução manitol, centrifugado (1000 x g, 5 min, 4 °C), sendo o sobrenadante obtido novamente centrifugado (18000 x g, 15 min, 4 °C). O novo precipitado resultante foi ressuspenso, suavemente, com o auxílio de um pincel fino no menor volume possível de tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5, contendo 0,3 M de manitol e 0,1% (m/v) de BSA (tampão de lavagem), sendo, em seguida, depositado no topo de um gradiente descontínuo formado por 40%, 23% e 18% de Percoll (do fundo ao topo do tubo de centrifuga), na proporção de 1:4:2 (v/v), preparado no tampão de lavagem. O sistema foi ultracentrifugado (40000 x g, 45 min, 4 °C), ficando a fração enriquecida de mitocôndrias numa banda opaca na interface entre 23% e 40% de percoll. Esta banda foi aspirada com auxílio de pipeta Pasteur, lavada e concentrada por centrifugação (no tampão de lavagem) a 15000 x g por 15 min, 4 °C. A seguir, foi depositada num tubo contendo Percoll a 28%, acrescido de 0,3 M de sacarose, 0,1% (m/v) de BSA, e tamponado com Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5. O sistema foi ultracentrifugado a 40000 x g por 30 min, 4 °C. As mitocôndrias, presentes numa banda

formada próximo ao topo do gradiente autogerado, foram aspiradas, lavadas, e concentradas através de duas centrifugações (15000 x g, 15 min, 4 °C) sucessivas, em tampão de lavagem. Durante o processo de purificação das mitocôndrias, na etapa inicial e final do procedimento, alíquotas foram coletadas para determinar o grau de pureza das organelas. Esse controle foi feito através da avaliação das enzimas marcadoras de compartimentalização celular: citocromo c oxidase (mitocondrial); catalase (peroxissomos); e álcool desidrogenase (citosólica) (NEUBERGER, 1985). Uma vez confirmada a pureza da fração, as mitocôndrias foram lisadas em acetona (4x o volume inicial, a -20 °C), centrifugadas (10000 x g, por 10 min a 4 °C), o sobrenadante descartado, e o precipitado secado à temperatura ambiente e ressuscitado em 300 µL de uréia (7M)/tiouréia (2M). O teor de proteínas totais foi avaliado (BRADFORD, 1976) nas mesmas condições já descritas na seção anterior. A seguir, as proteínas foram separadas por IEF (1ª dimensão).

5.5. Eletroforese Bidimensional e Análise diferencial *in silico* dos géis

Para a análise diferencial de expressão de peptídeos e/ou proteínas, as amostras protéicas de todos os tempos de coleta de raiz e mitocôndrias de raiz foram submetidas, separadamente, à IEF, utilizando o aparelho Ettan IPGphor II (Amersham Bioscience) e fitas de 13 cm contendo gradiente de pH imobilizado (pH 3-10 e pH 4-7), produzidos pela Amersham Bioscience. Após ressuspensão das amostras (precipitados finais de proteínas das raízes e de mitocôndrias, com concentração de proteínas ajustadas) em solução de reidratação, constituída por uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 0,065 M, CHAPS 0,5%, IPG buffer 0,5% e traços de Azul de Bromofenol, as amostras foram aplicadas nas fitas desidratadas. Essas fitas foram reidratadas durante 10 h, com 250 µL da solução de reidratação, encerrando 200 µg de proteínas de raízes, e 300 µg de proteínas de mitocôndrias isoladas (quantidades estabelecidas em testes preliminares). Como controle, proteínas extraídas da

mistura de 2000 J2, 50 fêmeas e 50 massas de ovos foram também eletrofocalizadas para detecção de possíveis contaminações com proteínas originárias dos nematóides. Nesse caso específico, a quantidade de J2, fêmeas e massas de ovos ensaiadas foi, aproximadamente, 50x superior àquela naturalmente encontrada na raiz do cultivar resistente CE-31, quando infectado pelo nematóide (ANDRADE, 2003). As fitas contendo as amostras foram colocadas em cubas de reidratação [*Reswelling Tray* (Pharmacia Biotech)] por 10 h, à temperatura ambiente e, em seguida, as proteínas foram separadas de acordo com seus pontos isoelétricos, usando o seguinte programa: 1º passo, 200 V por 1 h; 2º passo, 500 V por 2 h; 3º passo, 5000 V por 2:30 h; e 4º passo, 10.000 V, até atingir 22.000 Volts/hora totais. A focalização foi mantida à temperatura constante de 25 °C.

Após o término da corrida na primeira dimensão, as fitas foram imersas em solução de equilíbrio, consistindo de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo glicerol 30% (v/v), uréia 6 M, SDS 2% (m/v) e azul de Bromofenol (traços). Para cada 3 mL dessa solução, volume suficiente para o equilíbrio de uma fita de 13 cm, 50 mg de DTT foram adicionados, após o que a fita foi deixada sob agitação lenta, por 10 min, seguido de re-imersão, por 10 min, na mesma solução de equilíbrio, agora contendo 50 mg de IAA (iodoacetamida) para cada volume de 3 mL. A seguir, as fitas foram mergulhadas em tampão de corrida para eletroforese desnaturante [Tris-glicina 0,25 M, pH 8,3, contendo 2% (m/v) de SDS] por 10 s, para retirada do excesso de solução de equilíbrio, e depositadas, em íntimo contato, sobre a parte superior do gel de poliacrilamida (15% de acrilamida, dimensão de 150 x 180 x 1,5 mm), usando ágar 0,5% (m/v), preparado no tampão de corrida, para realização da corrida em segunda dimensão (SDS-PAGE). A corrida eletroforética desnaturante (LAEMMLI, 1970) foi realizada em sistema vertical (Amersham Biosciences), acoplado a um banho-maria (Pharmacia) com sistema de circulação forçada de água, mantida a 4 °C. Uma fonte EPS-601 (Amersham Biosciences) forneceu a corrente de 40 mA aplicada ao gel, até saída do azul de bromofenol. A revelação das proteínas foi feita com Coomassie Blue-G 250 (Coomassie coloidal) (CANDIANO *et al.*, 2004), uma vez que essa metodologia é

perfeitamente compatível com a espectrometria de massas e significativamente mais sensível que o Comassie Blue-R 250. No caso da 2D com as proteínas da mistura de J2, fêmeas e massas de ovos do nematóide, foi utilizada revelação com nitrato de prata (MERRIL *et al.*, 1979) que é bem mais sensível que Coomassie coloidal (G-250).

Os géis, feitos em triplicatas para cada tempo de coleta das amostras de plantas controles e inoculadas, foram escaneados utilizando-se o programa LabScan v. 6.0 (GEHealthcare), no ImageScanner (Amersham Biosciences), com sistema integrado de transparência. As imagens foram analisadas através do programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE-Healthcare), combinando detecção automática dos *spots* protéicos, executada pelo programa, e detecção manual. O critério para considerar um *spot* significativamente alterado utilizando-se triplicatas, era que o mesmo se apresentasse diferencialmente expresso, ou seja, 2x para mais ou para menos, quando comparado com o *spot* correspondente no gel controle, levando em consideração os valores numéricos do volume virtual do *spot*, que são derivados da densidade óptica do *spot* no gel e gerados por avaliações estatísticas comparativas com os outros *spots* do mesmo gel, sendo, portanto, um valor adimensional (LILLEY & FRIEDMAN, 2006). Por esse mesmo programa, os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada *spot* protéico significativamente alterados foram também estimados. Os *spots* que se apresentaram superexpressos foram excisados dos géis de amostras de plantas inoculadas com o nematóide, enquanto os subexpressos foram excisados dos géis controle (plantas não-inoculadas) de posições correspondentes, onde se apresentavam, obviamente, mais intensos. Esses *spots* foram utilizados para ensaios de espectrometria de massa, visando identificação das proteínas.

5.6. Excisão e processamento dos *spots* para espectrometria de massas

As proteínas de raiz e de mitocôndrias de raiz foram excisadas dos géis bidimensionais com o auxílio de bisturi e transferidas, imediatamente, para tubos tipo eppendorf de 600 µl, estéreis, onde se procedeu a digestão com tripsina. Todo o material utilizado e o ambiente de trabalho foram cuidadosamente higienizados para tentar evitar eventuais contaminações. Indumentárias de trabalho tais como toucas, máscaras, luvas e jaleco também foram utilizados com esse propósito. Os *spots* selecionados foram fragmentados em pedaços de cerca de 1 mm³, totalmente descorados em solução de bicarbonato de amônio 0,025 M/acetoneitrila (ACN) (1:1, v/v) em, pelo menos, 3 lavagens de 30 min, e desidratados, duas vezes, com ACN 100%, por 5 min. O solvente remanescente foi removido dos fragmentos de gel por volatilização em dessecador a vácuo. Os géis foram reidratados com 20 µl de uma solução de bicarbonato de amônio 0,05 M, contendo 0,2 µg de tripsina [grau sequenciamento, modificada para espectrometria de massa (MS-grade Promega)], em banho de gelo, por 1 h. Após esse período, as amostras foram colocadas em banho-maria e a digestão realizada a 37 °C, por 16 h. Em seguida, os peptídeos foram extraídos do gel com solução aquosa de ACN 50% e TFA 5%, com auxílio de sonicador, por 5 min, sendo desidratados em dessecador, a vácuo (JUNQUEIRA, 2008).

5.7. Espectrometria de Massa e identificação dos *spots*

Para serem analisadas, as misturas de peptídeos desidratadas, provenientes da digestão tríptica de cada *spot* selecionado para análise por espectrometria de massa, foram processadas no Laboratório de Espectrometria de Massas, pertencente ao Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Antes da análise dos peptídeos, estes foram desidratados e dissolvidos em solução de ácido fórmico a 1% (v/v). Análises de MS/MS foram realizadas em espectrômetro de massa composto por uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), dois analisadores de massas - um quadrupolo (Q)

associado a um tubo no qual se mede o tempo de vôo dos íons (TOF) - e um detector de íons: ESI-Q-TOF (*electro spray ionization quadrupole time of fly* da WATERS®). Um sistema de cromatografia líquida de ultra-eficiência (UPLC, Waters, Milford, US) foi acoplado *on-line* ao ESI-Q-TOF. Os peptídeos foram separados em coluna capilar nano-C18 (75 µm ID) por eluição com gradiente de água-ACN, contendo ácido fórmico a 0,1% (v/v). Os dados foram adquiridos em modo de dados independentes (DDA), e íons de múltiplas cargas (+2 e +3) foram automaticamente selecionados e dissociados em experimentos MS/MS. As condições de ionização e cromatografia líquida foram: fluxo, 600 nL/min; voltagem do capilar de nanofluxo, 3,5 kV; temperatura do bloco, 100 °C; voltagem do cone, 50 V. Os espectros de massas adquiridos foram processados usando o software Mascot Distiller (Matrix Science, London, UK) e os arquivos do tipo *Mascot Generic Format* (MGF) gerados foram consultados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), aplicando o software MASCOT v.2.2 (Matrix Science – www.matrixscience.com). Buscas foram conduzidas com os seguintes critérios: tolerância de, no máximo, uma perda de clivagem para os peptídeos; carbamidometilação da cisteína; possível oxidação da metionina; tolerância do peptídeo de 0,2 Da; e tolerância de MS/MS de 0,2 Da. O limite de significância foi estabelecido em $p < 0,05$, sendo o teste estatístico (ANOVA) realizado, automaticamente, pelo próprio software de identificação. Buscas de similaridades foram realizadas em banco de dados protéico do NCBI, escolhendo “*Viridiplantae taxa*” como categoria taxonômica.

5.8. Transferência de proteínas para membrana de PVDF e sequenciamento de Edman

Para tentar identificar *spots* que não foram resolvidos por espectrometria de massa, foi feito sequenciamento de Edman de proteínas transferidas para membrana de PVDF. As esponjas, papéis de filtro e a membrana de PVDF foram embebidos no tampão de transferência CAPS (3-[ciclohexilamino]-1-ácido propanosulfônico 0,01 M, pH 11). Em

seguida, o gel proveniente da corrida de eletroforese 2D foi disposto na forma de sanduiche, entre as esponjas e os papéis de filtro, em contato direto com a membrana de PVDF. Essa membrana foi tratada previamente com metanol 100% por 5 s, depois lavada em água grau Milli-Q, por 2 min, e, finalmente, imersa no tampão de transferência CAPS, por 5 min. A transferência foi feita a 50 V, 150 mA, por 1 h. Ao término da transferência, a membrana foi cuidadosamente retirada, imersa em água grau Milli-Q, por alguns segundos, depois imersa novamente em metanol 100%, por mais alguns segundos, e, imediatamente, colocada em solução de coramento "ProBlott", consistindo de 0,1% de Coomassie Blue R-250 em metanol 40% (v/v) e ácido acético 1% (v/v), até aparecimento dos *spots* (aproximadamente 1 min). Logo em seguida, a membrana foi descorada em solução de metanol 50% (v/v) sob agitação branda. Essa solução foi trocada a cada 5 min, até que os *spots* ficassem evidenciados. A membrana de PVDF foi exaustivamente lavada em água grau Milli-Q e os *spots* de interesse excisados com auxílio de bisturi estéril, foram previamente descorados e sequenciados automaticamente (Edman, sequenciador PPSQ-23^a, da Shimadzu). Neste procedimento de identificação dos aminoácidos, os derivados de feniltioidantoína dos aminoácidos (PTH-aminoácidos) foram separados em coluna de fase reversa C₁₈ (4,6 x 2,5 mm) e detectados através de leituras de absorbância a 269 nm, automaticamente.

5.9. Análise de expressão gênica

5.9.1. Desenho de iniciadores

Para análise dos transcritos de RNAm correspondentes às proteínas cujos níveis de expressão foram alterados em comparação com controles, nucleotídeos iniciadores

(*primers*) foram desenhados e sintetizados (Invitrogen, Life Technologies) com base nas sequências das proteínas identificadas por MS e disponíveis no NCBI. As sequências dos nucleotídeos iniciadores foram obtidas através de uma ferramenta virtual chamada “*tblastn*”(disponível no NCBI), que identifica a sequência de nucleotídeos a partir da sequência de aminoácidos. Os principais critérios obedecidos para a validação dos iniciadores foram: a) o oligonucleotídeo iniciador não deveria se auto-anelar; b) o par de nucleotídeos iniciadores (*forward* e *reverse*) para o mesmo gene não deveriam se anelar entre si; c) o par de nucleotídeos iniciadores deveriam ter temperaturas de anelamento mais próximas possíveis; d) nenhum dos nucleotídeos iniciadores deveriam formar grampos (*hairpin*); e) as sequências de oligonucleotídeos iniciadores contivessem entre 12 a 21 bases nitrogenadas. Todos esses critérios foram avaliados *in silico* usando programas (PCR primers status) disponíveis “on line” (<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>). Para garantir que não havia infestação das amostras das raízes de feijão-de-corda com *Rhizobium spp.*, foram utilizados, também, nucleotídeos iniciadores específicos desenhados para estes organismos, sendo concebidos a partir de regiões bem conservadas do seu genoma denominadas de genes “*nod*” (SARITA *et al.*,2005), em reações de PCR com as amostras de cDNA obtidos a partir dos RNAm extraídos das raízes do CE-31, inoculado e não inoculado com *M. incognita*, raça 3.

5.9.2. Obtenção de DNA genômico

Inicialmente, foi feita extração de DNA genômico para realização de testes de temperatura de anelamento dos nucleotídeos iniciadores com o protocolo de extração usando CTAB, adaptado de Foster e Twell (1996). Os mesmos cuidados de higienização e precauções contra contaminações previamente descritos (tópico XXX) foram tomados. Raízes frescas de feijão-de-corda (cv. CE-31) foram maceradas na presença de nitrogênio

líquido, com o auxílio de graal e pistilo até adquirirem textura de pó. Dois gramas de pó foram adicionados, individualmente, a 4 tubos Falcon (cap. 15 mL) contendo, cada um, 6 mL de tampão de extração [Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo 2% de CTAB (m/v), NaCl 2 M, EDTA 0,025 M], previamente aquecido a 65 °C, em banho-maria. O material foi incubado nessa temperatura por 1 h, sendo agitado, suavemente, por inversão, em intervalos de 10 min. Após incubação, igual volume da solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v) foi adicionado e a mistura agitada por inversão, várias vezes, sendo, depois, centrifugada (2500 x g, 25 °C, 15 min). O sobrenadante obtido foi transferido para outro tubo Falcon com o auxílio de pipeta automática, e isopropanol a 100% (num volume correspondente a 2/3 do volume total resultante) foi, imediatamente, adicionado e misturado por inversão, sendo deixado precipitar por 12 h, a 4 °C. O precipitado formado foi concentrado por centrifugação (1000 x g, 25 °C, 5 min), e o sobrenadante descartado. O novo precipitado foi ressuscitado em 1 mL de NaCl 1M e a ele adicionados 2,5 volumes de etanol 100%. Após homogeneização por inversão, seguido de centrifugado (1000 x g, 25 °C, 2 min), o sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta, o novo precipitado formado ressuscitado com 1 mL de etanol 70% (v/v) e centrifugado (1000 x g, 25 °C, por 2 min). O sobrenadante foi descartado e o precipitado (DNA genômico) deixado secar a 25 °C (temperatura ambiente). Durante a lavagem final com etanol 70% (v/v), os conteúdos dos 4 tubos Falcon foram concentrados em um único tubo e, posteriormente, ressuscitados em 500 µL de tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, contendo EDTA 0,001 M, estéril. A concentração de DNA genômico obtido foi estimada por leitura de absorbância a 260 nm, onde 40 µg/mL corresponde à absorbância igual a 1,00 (usando uma diluição de 1:10). A qualidade da preparação de DNA genômico obtida foi sempre avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v).

5.9.3. Obtenção de RNA total e cDNA

A extração do RNA total foi feita com cloreto de Lítio (CHANG et al., 1993) com algumas modificações. Amostras de raízes de plantas controles e de plantas inoculadas com o nematóide das galhas, encerrando 8 gramas de material, para cada tempo de coleta, foram previamente maceradas em nitrogênio líquido, com o auxílio de graal e pistilo, até obtenção de um pó fino, que foi dividido em alíquotas de 2 g por tubo Falcon (cap. 15 mL). Em seguida, a cada tubo, 6 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo 2% (m/v) de CTAB, NaCl 2 M, e EDTA 0,025 M, foram adicionados e a mistura incubada a 25 °C por 1 h, sob agitação branda, por inversão, em intervalos de 10 min. Após esse período, igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v) foi adicionado. A mistura foi deixada incubando à temperatura ambiente (25 °C), sob agitação suave, por 20 min, e, em seguida, centrifugada (6500 x g, 10 min, 25 °C). A fase superior foi transferida para um novo tubo Falcon e 7,0 mL da mistura de clorofórmio:álcool isoamílico, novamente adicionados, sendo os tubos suavemente agitados (manualmente) por mais 5 min e, novamente, centrifugados (6800 x g, 10 min, 4 °C). O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo Falcon, sendo adicionado cloreto de lítio 1 M, correspondendo a 1/3 do volume do sobrenadante. A solução foi deixada precipitar por 12 h, em banho de gelo, dentro de geladeira. Após esse período, a mistura foi centrifugada (8000 x g, 4 °C, 45 min), e o sobrenadante descartado, cuidadosamente, para não perder o precipitado. Esse precipitado foi lavado duas vezes, num intervalo de 15 min, com etanol 70% (v/v), preparado com água tratada com Dietil pirocarbonato (DEPC), sob agitação branda, e centrifugado (8000 x g, 4 °C, 10 min), após cada lavagem. Durante a lavagem final com etanol 70% (v/v), os conteúdos dos 4 tubos Falcon foram concentrados em um único tubo. Ao final da última centrifugação, o precipitado foi deixado secar à temperatura ambiente (25 °C), por 2 h, e ressuspenso em 500 µL de água tratada com DEPC.

A concentração das amostras de RNA total foi determinada espectrofotometricamente a 260 nm, considerando que a concentração de 40 µg/mL corresponde à absorbância igual a 1,00. A pureza das amostras de RNAs, quanto à contaminação por proteínas, açúcares e ou polissacarídeos, foi avaliada pelas relações de absorbância A_{260}/A_{280} (valores ótimos entre 1,8 e 2) e A_{260}/A_{230} (valores ótimos acima de 2). A integridade do RNA total e contaminação com DNA genômico foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose (1,0%). As amostras de RNA total foram descontaminadas de DNA genômico por digestão com DNase e posterior purificação com o mini Kit RNeasy (Quiagen), seguindo as instruções do fabricante. O volume da amostra foi ajustado para 100 µL com água livre de RNase, sendo adicionados 350 µL de tampão RLT (fornecido pelo kit) e 250 µL de etanol 100% ao RNA diluído. A solução foi transferida, imediatamente, para uma coluna *RNeasy Mini spin Column* acoplada a um tubo de 2 mL (*collection tube*). O sistema foi centrifugado a 8000 x g, 4 °C, 15 s, e o fluido não retido descartado. Nova lavagem, com 500 µL do tampão RPE (fornecido pelo kit), e centrifugação (8000 x g, 2 min, 4 °C) foram feitas, sendo o eluato descartado mais uma vez. A coluna foi acoplada a um novo tubo de coleta (2 mL) e 50 µL de água livre de RNase foram adicionados à coluna. Após centrifugação (8000 x g, 4 °C, 1 min), o RNA eluído foi armazenado a -80 °C para ser usado nas reações de RT-PCR.

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita através de transcrição reversa do mRNA presente nas amostras de RNA total. Inicialmente, o RNA total (2 µg) foi aquecido a 70 °C por 5 min e, depois, resfriado a 4 °C por 5 min para desnaturação de possíveis estruturas secundárias. Além do RNA total (2 µg), a mistura de reação (20 µL) foi, também, constituída de tampão de reação da RT 5x concentrado (4 µL), $MgCl_2$ 0,025 M (2,4 µL), dNTPs 0,01 M (1 µL), Oligo dT18 (2 pmols/µL) e transcriptase reversa (Improm II RT) (1 µL). A reação de transcrição reversa foi realizada a 25 °C por 5 min, a 42 °C por 1 h, 70 °C por 15 min e 4 °C por 12 h. Os produtos da reação de PCR foram armazenados a -20° C para serem usados nas reações de amplificação dos genes (SAMBROOK *et al.*, 1989).

5.9.4. Análise semi-quantitativa de transcritos

Os genes analisados foram amplificados por PCR (reação em cadeia de polimerase). A mistura de reação (10 μL) da PCR foi constituída de produtos de RT (2 μL contendo 700 μg de cDNA total), o par de nucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para cada gene de interesse, sendo adicionados 5×10^{-6} M (1 μL) de cada iniciador (*Forward* e *Reverse*), tampão de reação da Go Taq DNA polimerase 5x concentrado (2 μL), dNTPs (10^{-3} M), e Go Taq DNA polimerase (0,25 μL) completando o volume de reação com 1,75 μL de água ultra pura. A reação foi processada em termociclador (PTC-200 Thermocycler, BIO-RAD®). O programa foi desenvolvido em três etapas: desnaturação (95 °C, 1 min), anelamento (50 a 65 °C, 1 min) e extensão (72 °C, 3 min), perfazendo um total de 35 repetições desse ciclo e, posteriormente, 4 °C, até que as amostras fossem retiradas do equipamento. A temperatura ótima de anelamento de cada um dos pares de nucleotídeos iniciadores foi previamente determinada, utilizando-se DNA genômico.

Experimentos preliminares com variado número de ciclos de PCR, para os diferentes pares de nucleotídeos iniciadores, foram realizados para assegurar que as amplificações não estariam saturadas (fase de platô), e que, portanto, seria possível avaliar, semi-quantitativamente, a presença ou não de transcritos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), posteriormente impregnado com brometo de etídio e irradiado por luz UV em um fotodocumentador digital. As bandas correspondentes aos cDNAs amplificados foram fotografadas e analisadas utilizando-se actina como controle.

6. RESULTADOS

6.1. Extração de proteínas das raízes de feijão-de-corda

Dentre os tampões testados para otimização da extração de proteínas de raízes de feijão para análise proteômica, tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, contendo Glicerol 20%, PEG 3%, PVPP 1:1 (m/v), EDTA 10 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM foi o que forneceu melhor resultado. Com relação à quantidade de proteína aplicada, o melhor perfil foi obtido quando as tiras de eletrofocalização foram carregadas com 200 µg de proteínas. A **FIGURA 1** resume o procedimento de extração. Quantidades menores que 200 µg de proteína geraram perfis rarefeitos enquanto valores acima tornavam bastante borradas as regiões que representavam proteínas com pI ácido e de alta massa molecular, dificultando, assim, análises posteriores. A **FIGURA 2** mostra um gel bidimensional típico de proteínas de raiz de feijão-de-corda gerado de acordo com as condições acima estabelecidas em experimentos pilotos.

6.2. Purificação de mitocôndrias de raízes de feijão-de-corda

O procedimento de extração das proteínas de mitocôndrias intactas isoladas de raiz de feijão-de-corda seguindo o método de Millar *et al.* (2001), ligeiramente adaptado foi bem sucedido. Para validar a eficiência desta extração, uma alíquota da fração das mitocôndrias purificadas foi retirada para os testes de oxigrafia e ensaios

de enzimas marcadoras de pureza. Os testes feitos no oxígrafo demonstraram a existência abundante de mitocôndrias intactas devido ao perfil do gráfico gerado ser bastante semelhante ao padrão esperado. Ou seja, quando foram adicionados substratos para a cadeia transportadora de elétrons (como o ADP + Pi ou NADH, por exemplo) o consumo de oxigênio aumentava vertiginosamente e quando eram inseridos inibidores conhecidos (tais como KCN), o consumo de oxigênio cessava. O gráfico da oxigrafia está mostrado na **FIGURA 3**. Os resultados da avaliação das atividades de enzimas reconhecidamente marcadoras de compartimentação celular, a saber: citocromo c oxidase (mitocondrial), catalase (peroxissomos) e álcool desidrogenase (citosólica) (NEUBERGER, 1985), comprovaram o extremo grau de pureza das mitocôndrias. De fato, não foi detectada atividade de catalase nem de álcool desidrogenase na fração das mitocôndrias purificadas, forte indicativo de que na preparação mitocondrial obtida não havia, aparentemente, contaminantes de origem citosólica e nem de peroxissomos. Em contrapartida, a enzima citocromo c oxidase, um transportador de elétrons presente nas mitocôndrias, exibiu altíssima atividade, conforme mostrado na **FIGURA 4**. Esses dados são condizentes com aqueles obtidos por Millar *et al.* (2001). Destarte, os resultados da oxigrafia em conjunto com os ensaios enzimáticos obtidos, indicam, fortemente, que as mitocôndrias estavam em elevado grau de pureza e que suas membranas estavam intactas, sendo, portanto, adequadas para análise proteômica.

FIGURA 1. Fluxograma geral do protocolo de extração de proteínas de raízes de feijão-de-corda para eletroforese

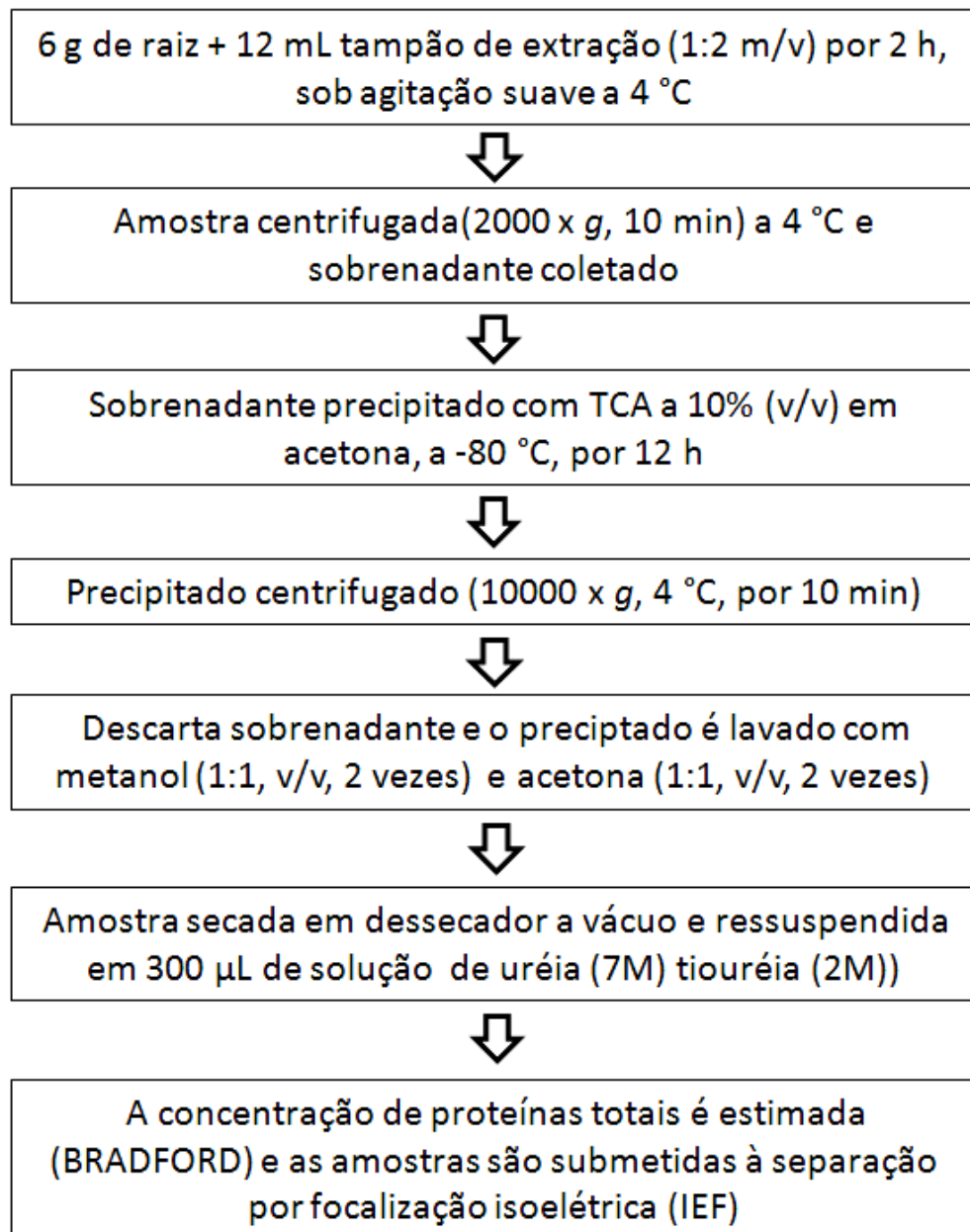


FIGURA 2. Mapa bidimensional de proteínas (SDS-PAGE), gerado a partir da aplicação de 200 µg de proteínas extraídas de raízes de feijão-de-corda, cv. CE-31, com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, contendo Glicerol 20%, PEG 3%, PVPP 1:1 (m/v), EDTA 10 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM, isofocalizadas em fita de 13 cm, em gradiente linear de pH variando de 4-7. Gel corado pelo método do "blue-silver" (Coomassie coloidal).

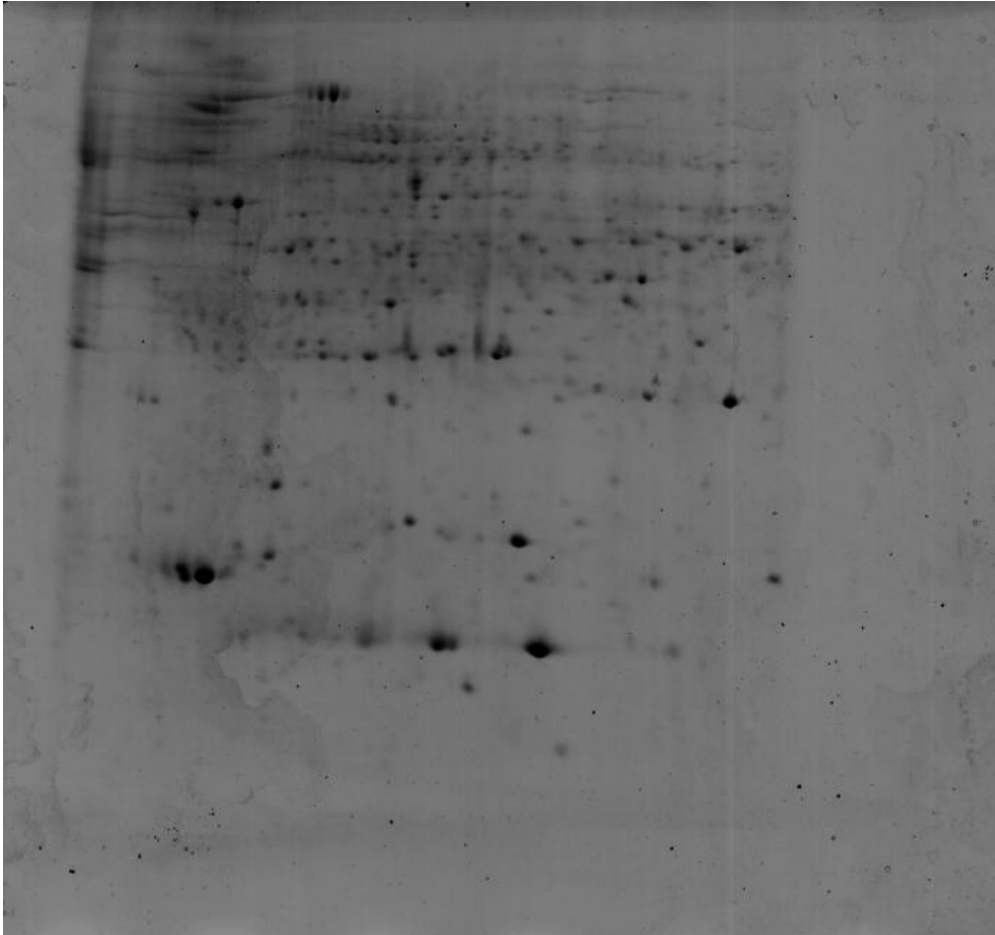


FIGURA 3. Gráfico de oxigrafia típico de solução mitocondrial concentrada mostrando um alto consumo de oxigênio indicando integridade de membranas.

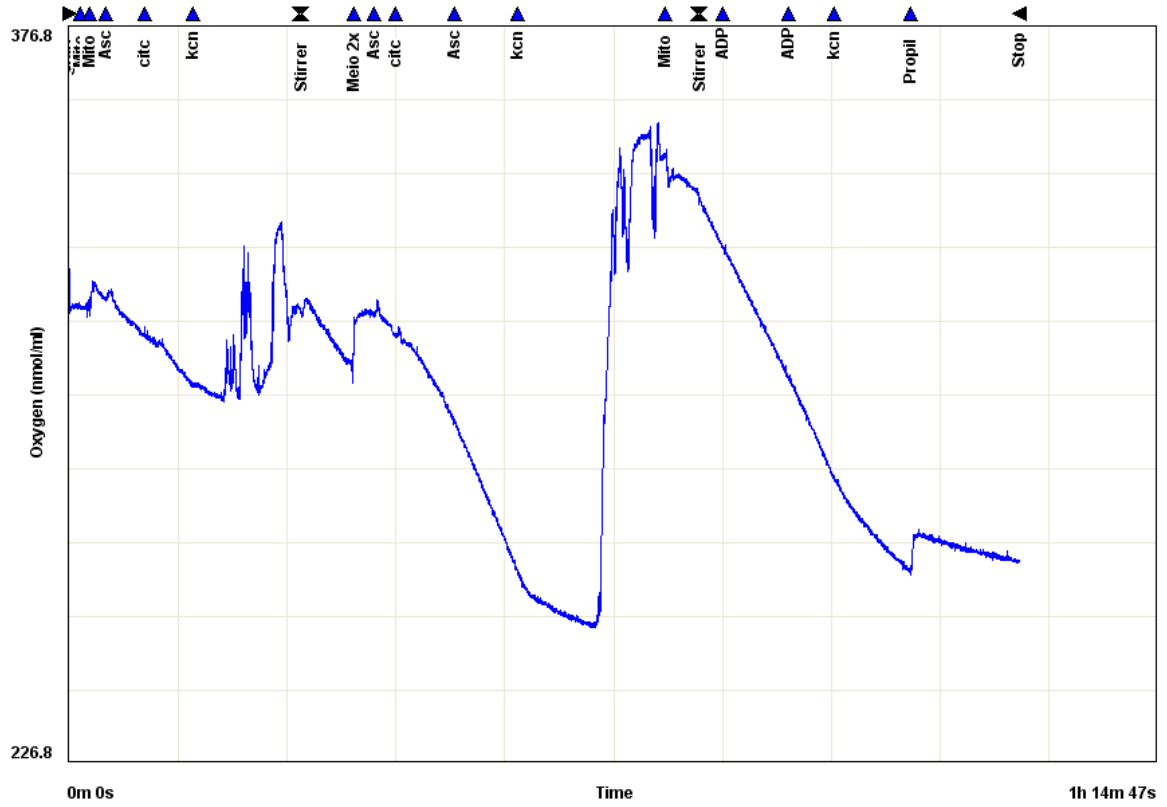
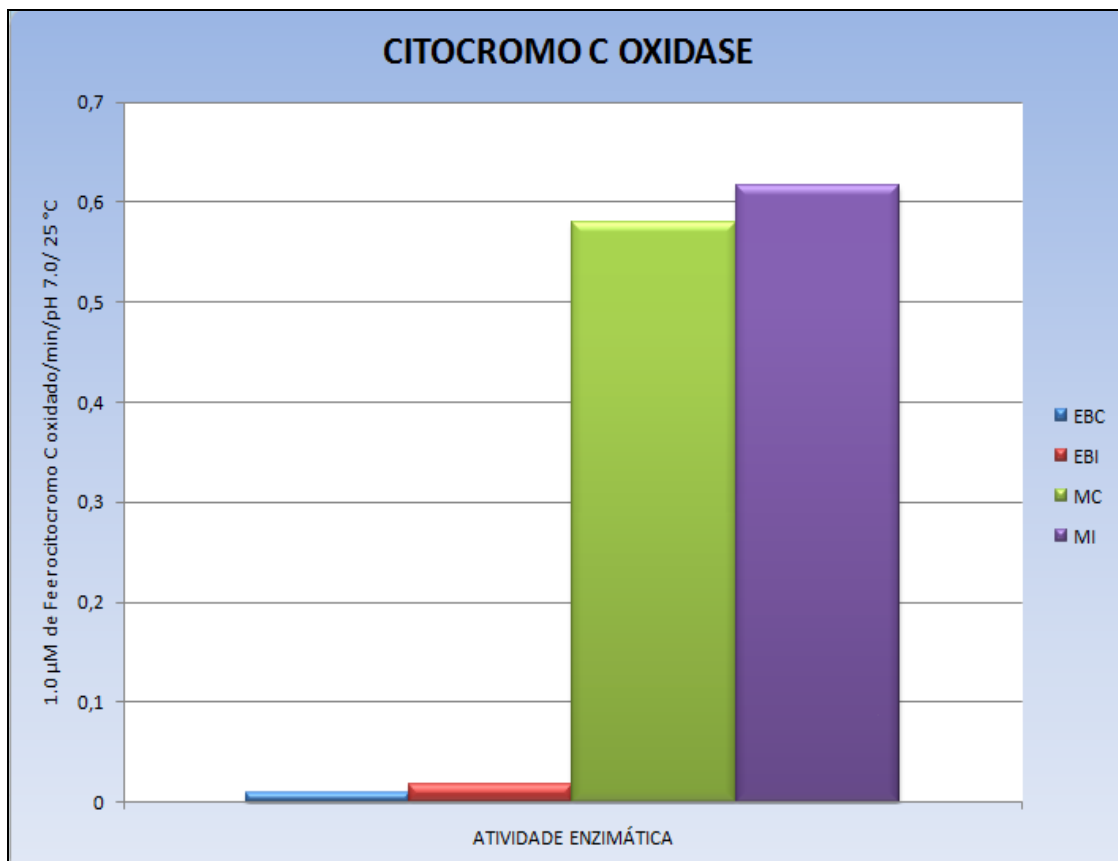


FIGURA 4. Gráfico de atividade da enzima citocromo c oxidase. (EBC)=extrato bruto de raízes de feijão-de-corda controle, (EBI)= extrato bruto de raízes de feijão-de-corda inoculadas com o nematóide das galhas, (MC)= mitocôndrias isoladas controle e (MI)= mitocôndrias isoladas de amostras de raízes de feijão-de-corda inoculadas com o nematóide das galhas.



6.3 Eletroforese Bidimensional e Análise diferencial *in silico* dos géis

Inicialmente, para se ter um perfil bidimensional mais panorâmico das proteínas totais de raízes e de mitocôndrias de raízes de feijão-de-corda inoculado e não-inoculado (controle) com *M. incognita*, fitas com gradiente de pH 3-10, imobilizado, de 13 cm, foram usadas. Entretanto, as modificações visuais mais significativas nos *spots* protéicos (super ou subexpressos, pelo menos 2x) se concentraram, em todos os casos estudados, numa faixa de pI entre 4 a 7. Esse resultado sugeria que a utilização de uma fita com pH imobilizado na faixa de 4-7 seria mais eficiente para aumentar a resolução dos géis nas regiões de interesse. Dessa forma, todos os géis 2D foram gerados a partir de eletrofocalização das proteínas em fitas de 13 cm, com pH imobilizado variando entre 4-7. Os géis foram feitos em triplicatas com o intuito de gerar dados significativos e conferir maior segurança na interpretação dos resultados, com base em critérios estatísticos previamente descritos (Lilley & Friedman, 2006) para este tipo de ensaio. Nessas condições, foram observados, com o auxílio do programa ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE-Healthcare), um total de 22 *spots* presentes nos géis gerados a partir da eletroforese 2D de proteínas solúveis de raízes de feijão-de-corda (cv, CE-31) resistente, quando inoculado com o nematóide das galhas, que apresentaram diferenças significativas de expressão e que, também, eram possíveis de serem excisados, uma vez que exibiam alta intensidade e excelente definição a olho nu. Além dos 22 *spots* já citados, outros 10 se apresentaram, também, estatisticamente alteradas (9 superexpressos e 1 subexpresso) quando comparadas com os perfis de géis controles, mas sua fraca intensidade e baixa definição só permitia visualização

após grande ampliação (*Zoom*) e contraste ajustado (*Gray adjust contrast*) do programa. Assim, não foi possível, a olho nu, mesmo sob iluminação adequada, excisão desses *spots* para análises posteriores de identificação. Dentre os 22 *spots* referidos acima, 17 foram superexpressos e 5 subexpressos nas raízes de feijão-de-corda inoculado com *M. incognita*, quando comparados com àqueles correspondentes em raízes controles não-inoculadas. Esses perfis estão mostrados na **FIGURA 5**. As alterações de expressão desses *spots* só foram possíveis de identificar comparando-se os géis controles e inoculados a partir do 4º dia após inoculação, tendo seu apogeu no 6º dia. Antes desse período, todos os géis exibiam perfis muito semelhantes quando comparados entre si.

Uma vez que foi apenas no 4º e 6º dias após inoculação quando foram detectadas os resultados mais significativos nos géis 2D de raiz, para suas mitocôndrias correspondentes esses mesmos períodos foram escolhidos para facilitar comparações. Interessantemente, os géis 2D de proteínas de mitocôndrias de raízes exibiram, também, um total de 22 *spots* significativamente alterados, sendo que, neste caso, não houve subexpressão, mas sim superexpressão (**FIGURA 6.**)

Nos géis 2D feitos com proteínas oriundas de J2 (2000 indivíduos), massa de ovos (50) e fêmeas (50), representando quantidade de animais aproximadamente 50x superior à encontrada naturalmente infectando as raízes do cultivar resistente CE-31 (ANDRADE 2003), não foi detectado nenhum *spot* protéico, independentemente se revelados com coomassie coloidal ou nitrato de prata **FIGURA 7**. Dessa forma, ficou patente que nenhum *spot* encontrado nos géis 2D de proteínas de raízes inoculadas era oriundo de nematóides, mas sim da planta em análise.

FIGURA 5. Mapas bidimensionais de proteínas, gerados com aplicação de 200 µg de proteínas extraídas de raízes de feijão-de-corda, cv. CE-31, com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, contendo Glicerol 20%, PEG 3%, PVPP 1:1 (m/v), EDTA 10 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM, isofocalizadas em fita de 13 cm, em gradiente linear de pH variando de 4-7. Gel corado pelo método do “blue-silver” (Coomassie coloidal) mostrando géis de raízes 6 dias após inoculação. **(A)** amostra controle e **(B)** inoculada. As setas vermelhas evidenciam os *spots* super-expressos e as setas pretas os *spots* sub-expressos nas raízes inoculadas. No gel controle os círculos pretos mostram as proteínas constitutivas que mantiveram sua expressão quando comparadas com o gel de raiz inoculada no qual essas mesmas proteínas foram subexpressas.

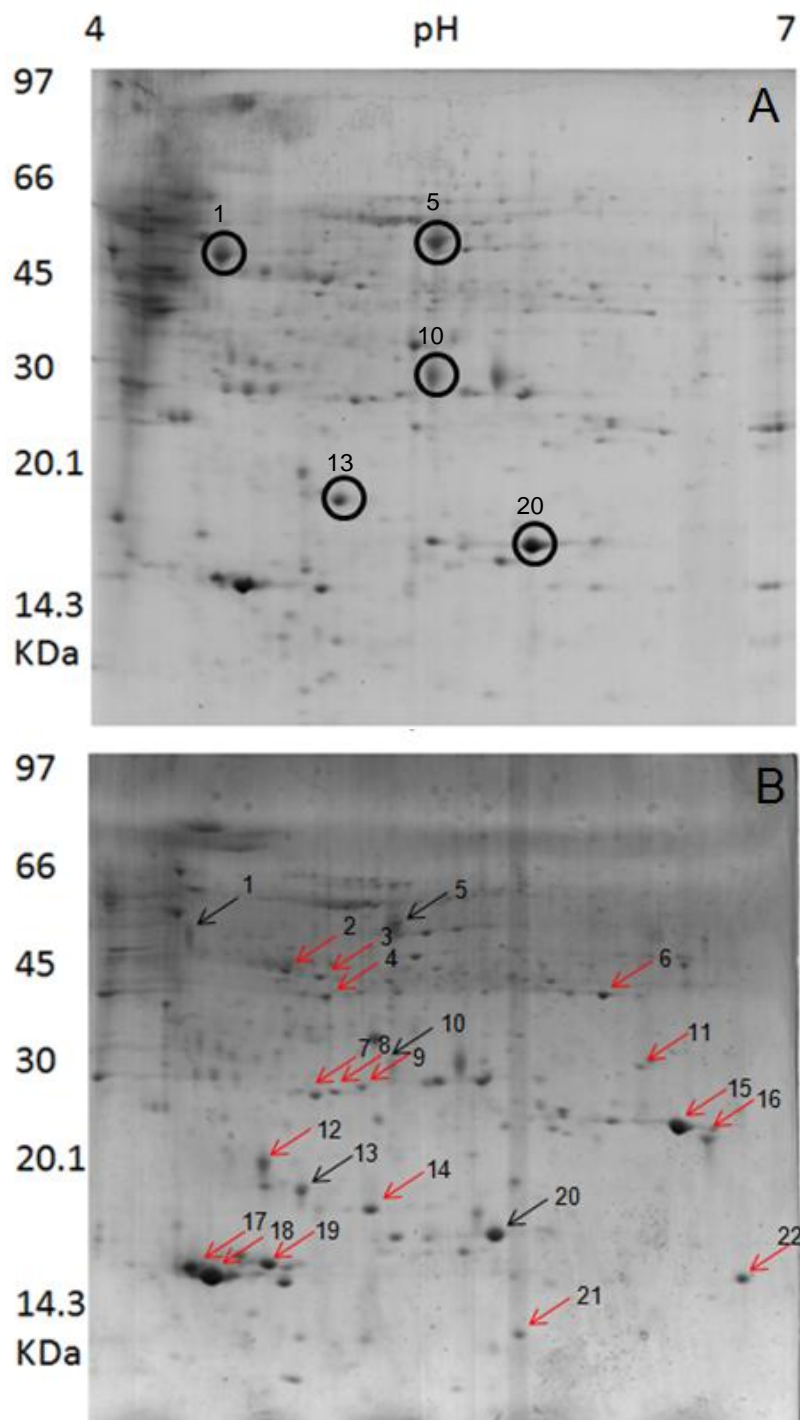


FIGURA 6. Perfil bidimensional de proteínas de mitocôndrias de raízes de feijão-de-corda. A e B correspondem respectivamente aos perfis de mitocôndrias de raízes controles e inoculadas com o nematóide das galhas. A e B não estão marcadas com a ferramenta de detecção automática do software ImageMaster 2D Platinum 6.0. C e D correspondem respectivamente aos perfis de mitocôndrias de raízes controles e inoculadas com o nematóide das galhas marcadas com a ferramenta de detecção automática do software. Um total de 22 *spots* protéicos foram superexpressos apenas nos géis provenientes de raízes inoculadas (B e D) e não houve subexpressão quando comparados com os controles. Os círculos pretos em D indicam os *spots* superexpressos.

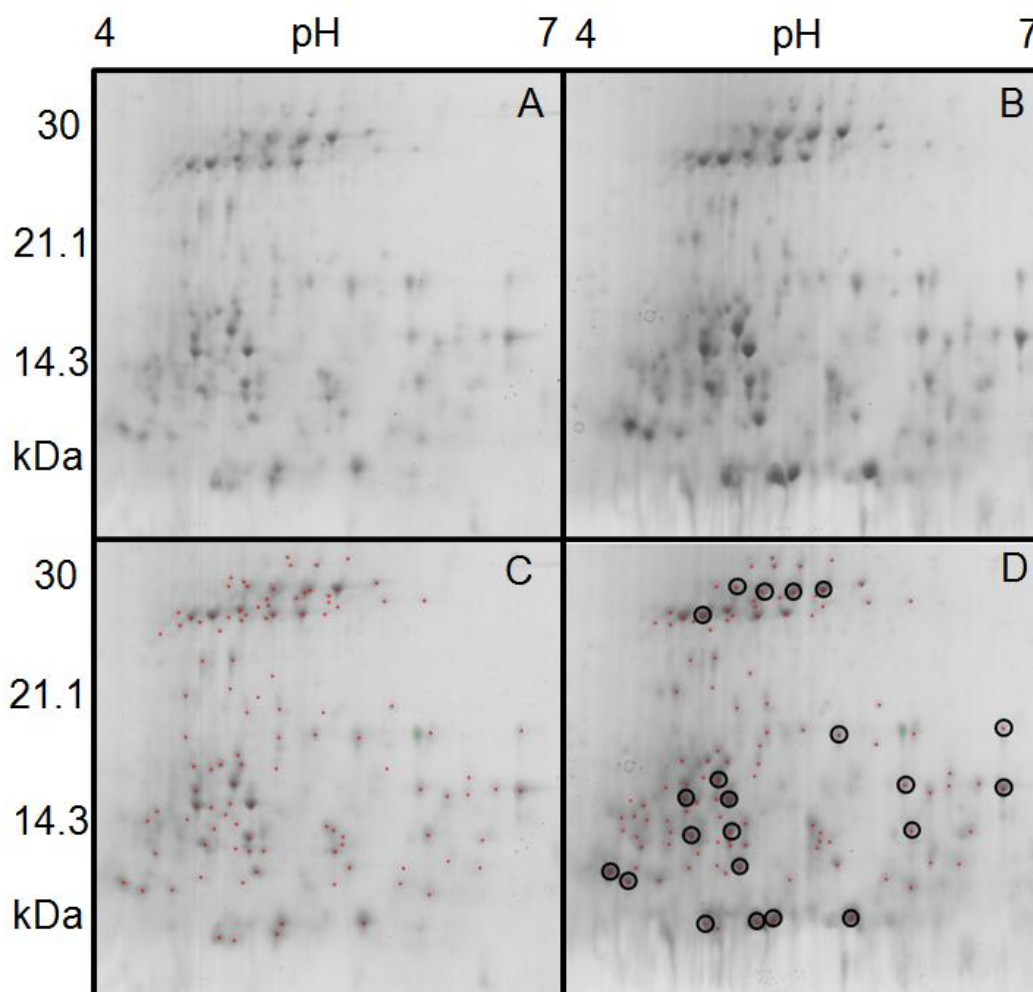
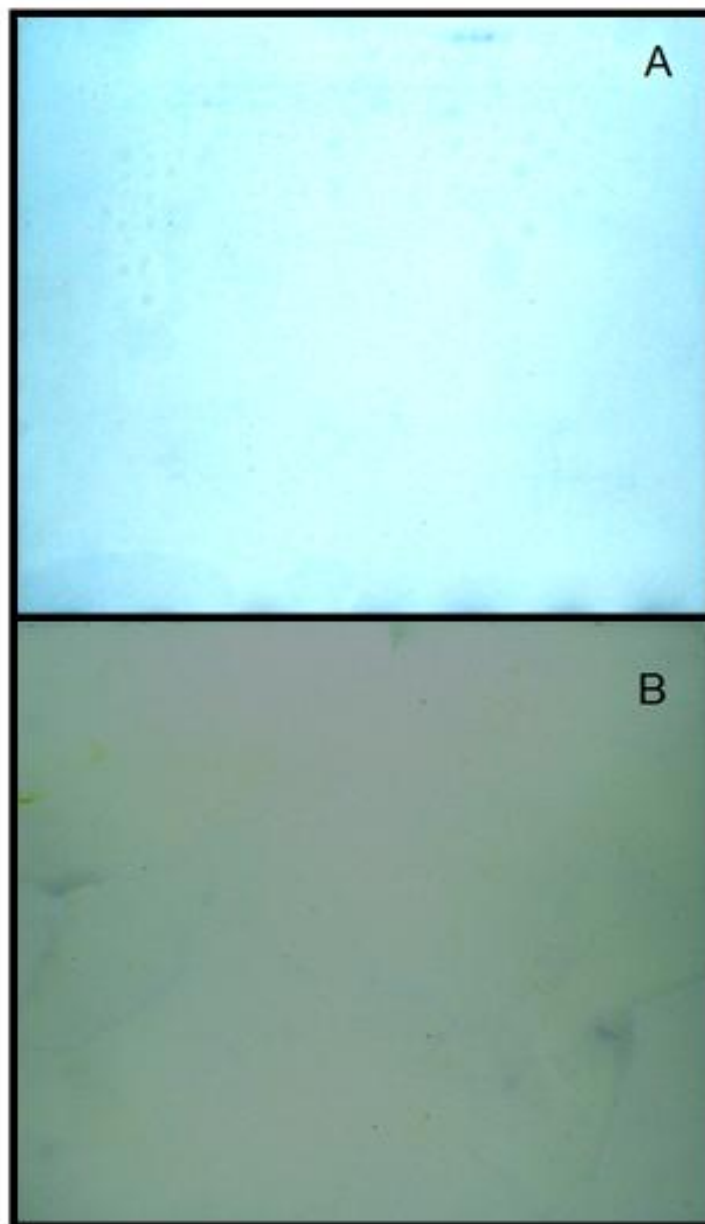


FIGURA 7. Mapa bidimensional de proteínas (SDS-PAGE), gerado a partir da aplicação de proteínas de nematóides (2000 J2, 50 massas de ovos e 50 fêmeas) extraídas com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, contendo Glicerol 20%, PEG 3%, PVPP 1:1 (m/v), EDTA 10 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM, isofocalizadas em fita de 13 cm, em gradiente linear de pH variando de 4-7. (A) Gel corado pelo método do “blue-silver” (Coomassie coloidal) e (B) Gel revelado com nitrato de prata. Nenhum *spot* foi detectado visualmente e nem pelo software ImageMaster 2D Platinum 6.0.



6.4. Processamento dos *spots*, identificação por espectrometria de massa e sequenciamento de Edman

Dos 22 *spots* de raízes inoculadas selecionados, excisados, tripsinizados e submetidos à identificação por espectrometria de massa, apenas 15 (2 subexpressos e 13 superexpressos) puderam ser perfeitamente identificados. Os 13 *spots* que foram superexpressos, a saber: ACC sintase (*spot* 2), ACC oxidase (*spot* 3), Cisteinil endopeptidase (*spot* 4), Chalcona-flavona isomerase (*spot* 6), Ascorbato peroxidase (*spot* 11), Proteínas induzida por auxina (*spot* 12), Superóxido-dismutase CuZn dependente (*spot* 15), Proteína de choque térmico Classe I (*spot* 16), PR-1 (*spot* 17), PR-3, (*spot* 18), PR-2 (*spot* 19), Leghemoglobina (*spot* 21) e Nucleosídeo difosfato quinase (*spot* 22), apresentaram valores de escores significativamente acima do limite mínimo de confiabilidade que foi calculado, automaticamente, pelo programa de análise de espectros de massas (Mascot), indicando assim, expressiva significância estatística de similaridade considerando $p < 0.05$ nas buscas pelo NCBI, garantindo, desta forma, robustez dos dados e excelente confiança na identificação.

Os dois *spots* identificados que exibiram subexpressão: Asparaginil endopeptidase (*spot* 1) e ARG 10 (*spot* 10), igualmente aos superexpressos, exibiram ótimos escores e significância estatística. Todos esses 15 *spots* que foram devidamente identificados demonstraram semelhança de espectros com espécies vegetais pertencentes às leguminosas (Fabaceae), inclusive 6 deles (*spots* 1, 2, 3, 4, 10, e 12,) assemelhavam-se a fragmentos de peptídeos do gênero estudado neste trabalho (*Vigna*) e 3 (*spots* 11, 18, e 21) pertenciam, precisamente, à espécie alvo

dessa pesquisa (*Vigna unguiculata*). Essa estreita relação taxonômica confere confiabilidade ainda maior aos resultados.

Para os 7 *spots* remanescentes, não identificados, 2 deles (*spots* 7 e 9) foram relacionados como proteínas preditas (*predict protein*), cujas sequências deduzidas *in silico*, baseadas nos arquivos dos bancos de dados, são conhecidas, mas sem identificação e funções biológicas resolvidas. Com relação aos outros 5 *spots* (*spots* 5, 8, 13, 14, e 20), não foi obtido êxito em nenhuma das tentativas de identificação por MS. Inicialmente, foi suposto que a intensidade do sinal gerado pelo *spot* no espectrômetro de massa não fosse suficiente para análise. Portanto, foi feita concentração de cada um desses *spots* através da sua excisão de géis 2D em triplicata, e digestão trípica para tentar aumentar a intensidade do sinal, mas, ainda assim, não foi possível identificação, o que leva a crer que não há, ainda, sequências depositadas nos bancos de dados referentes a essas proteínas. Esses mesmos *spots* protéicos de raízes inoculadas, não resolvidas por MS, foram submetidos ao sequenciamento automático de Edman, mas também não foi obtido êxito, neste caso, provavelmente, por causa da sensibilidade do método que necessitaria de concentrações bem maiores de proteínas que não são providas por *spots* de géis 2D, mesmo sendo concentrados em triplicatas. A **FIGURA 8** mostra o gráfico de pizza (em %) contendo a classificação dos 22 *spots* selecionados, devidamente agrupados por suas funções biológicas. Os dados complementares provenientes da espectrometria de massas (pI, MW, sequência dos fragmentos identificados, e valores numéricos da estatística dos escores e porcentagens das coberturas das sequências) são mostrados na **TABELA 3**.

Para os géis 2D de proteínas de mitocôndrias de raízes inoculadas, que demonstraram, também, 22 proteínas com alterações de expressão, a identificação

por espectrometria de massas não foi bem sucedida devido à interferência da BSA, um dos constituintes do protocolo de purificação das mitocôndrias. Ainda assim, foi possível a identificação de 8 *spots* protéicos, mas com baixíssimo escore (**TABELA 4.**). Alternativamente, nestas circunstâncias, foi realizado sequenciamento de Edman, mas, assim como no caso de alguns *spots* protéicos de raízes, os resultados foram repetidamente inconsistentes.

FIGURA 8. Gráfico em pizza mostrando as porcentagens das classes de proteínas que sofreram alterações nas análises dos géis de eletroforese bidimensionais das raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparados com seus respectivos controles.

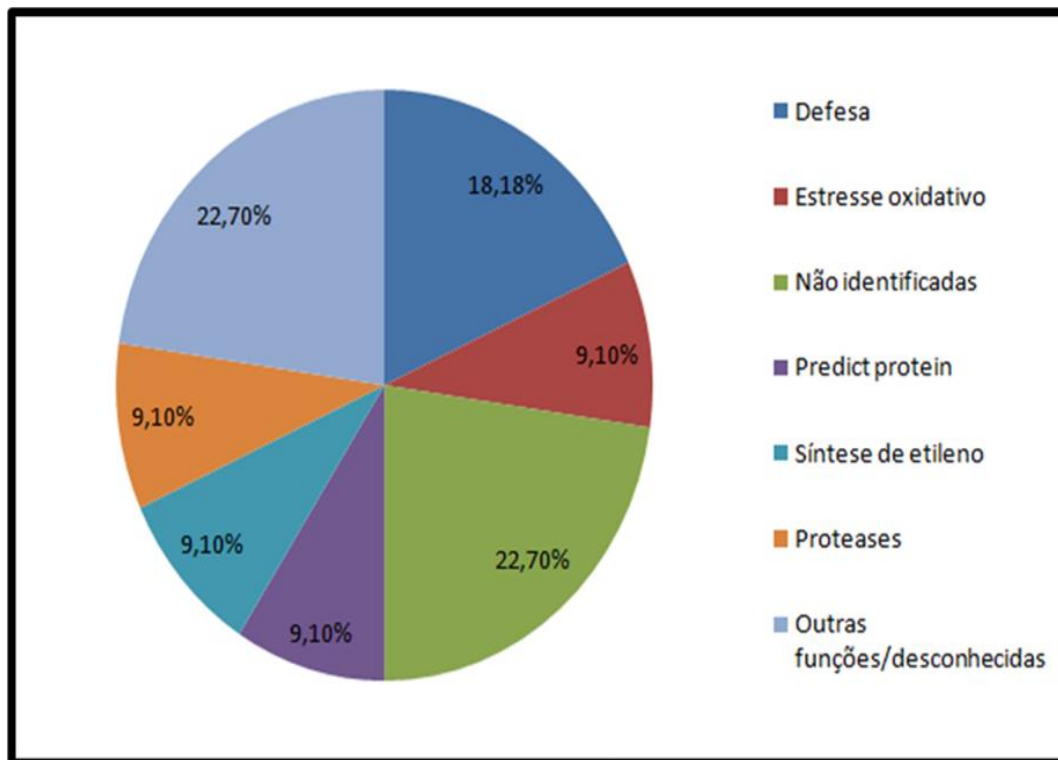


TABELA 3. Lista das proteínas que sofreram alterações nas raízes de feijão-de-corda inoculadas com *M. incognita*, através de análise por nano-UPLC-ESI-Q-TOF e ferramentas de bioinformática

Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/MW (kDa)		Escore ^(a)	Cobertura da seqüência (%)	Seqüência
			Experimental	Teórico			
1↓ gi/4589396	Asparaginyl endopeptidase	<i>Vigna mungo</i>	4.38/ 49.316	5.14 / 52.982	77	6.83	FPIIFVVANLITLVSGGR NSLVPPSK APLGSSR
2↑ gi/297493	ACC synthase	<i>Vigna radiata</i>	4.89/ 39.678	5.40 / 43.768	79	7.98	YFDGWK VHIVYLSK VGTIYSYNDVVTAR
3↑ gi/86197901	ACC oxidase	<i>Vigna radiata</i>	5.05/ 38.056	5.86/ 40.236	111	12.30	GAAMEMIK EMVANK VSNYPCCPTPDLIK DDQWIDVPPMR
4↑ gi/1223922	Cysteiny endopeptidase	<i>Vigna radiata</i>	5.10/ 35.289	5.44/ 37.332	64	6.35	LLWVVLSSLVSLVGVANSFDFHEK
5↓ Não identificado	Não identificado	Não identificado	5.42/ 45.376	X	X	X	Não identificado
6↑ gi/27530706	Chalcone-flavone isomerase	<i>Lotus japonicus</i>	6.41/ 35666	5.94/ 36.987	97	11.11	SYFLGGAGER STGTYGEAEAAAIGK
7↑ gi/297849580	Predicted protein	<i>Arabidopsis lyrata</i>	5.03/ 25.370	6.22/ 33.633	119	12.58	EVETLPPEAFEEEEEDK EILENHGGEER IMDEAVNASR
8↑ Não identificado	Não identificado	Não identificado	5.13/ 25.607	X	X	X	Não identificado
9↑ gi/297824991	Predicted protein	<i>Arabidopsis lyrata</i>	5.26 25.967	7.97/ 39.819	58	5.54	QVVDTEPK VYGSIEEHYYR
10↓ gi/2970051	ARG 10	<i>Vigna radiata</i>	5.33/ 30.326	5.62 / 25.480	133	14.34	DEIFCLFEGALDNLGSLR VVCHLSGSAFIVFDK
11↑ gi/42795352	Ascorbate peroxidase	<i>Vigna unguiculata</i>	6.62/ 28238	6.67 / 31.746	108	11.84	NCAPMLLR EIVALSGGHTLGR SGFDGPWTEPLK

12↑	gi/416640	Auxin-induced protein	<i>Vigna radiata</i>	4.81/ 19.354	4.65/ 21.345	104	11.34	EGLGLEITELR GYSDLFALEK
13↓	Não identificada	Não identificado	Não identificado	4.98/ 19.155	X	X	X	Não identificado
14↑	Não identificada	Não identificado	Não identificado	5.3/ 18.381	X	X	X	Não identificado
15↑	gi/13274148	CuZn-superoxide dismutase	<i>Populus tremula</i>	6.76/ 23.114	5.87 / 29.203	142	14.74	AVAVLK LTHGAPDEIR GGHELSTTGNAGGR
16↑	gi/123539	17.5 kDa class I heat shock protein	<i>Glycine max</i>	5.87/ 22.268	6.12/ 17.412	177	18.18	DFHVPTSSVSAENSAFVSTR VLQISGER
17↑	gi/130829	PR-1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	4.44/ 16.126	4.83 / 16.528	168	18.58	ALPDSFK ISFVEDGETK LSDGPNNGSLIK
18↑	gi/4850337	PR-3 (Chitinase)	<i>Vigna unguiculata</i>	4.55/ 15.971	4.75 / 16.265	122	14.28	ISFLEDGETK LSDGSNGGSVVK
19↑	gi/ 130835	PR-2 (β-1,3-glucanase)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	5.11/ 16.352	4.85 / 16.402	86	10.96	ISIDSK GDAPPNEDELK
20↓	Não identificada	Não identificado	Não identificado	5.9/ 17.337	X	X	X	Não identificado
21↑	gi/ 20138591	Leghemoglobin	<i>Vigna unguiculata</i>	6.00/ 14.722	5.68 / 15.341	225	31.03	ADIPK NLFSFLANGVDATNPK ASGGVVADAALGAVHSQK EAVGDK
22↑	gi/ 26245403	nucleoside diphosphate kinase	<i>Glycine max</i>	6.89/ 15.964	6.30/ 16.254	183	21.08	PDGVQSGLIGEIISR IIGATNPAQSEPGTIR

(a) Todos os valores de escores listados estão acima do escore limite, calculado automaticamente pelo Mascot, e indicam expressiva significância estatística de similaridade ($p < 0.05$) nas buscas pelo NCBI.

TABELA 4.Lista de Identificação das proteínas que sofreram alterações, exibindo não relevância estatística, nas mitocôndrias de raízes de feijão-de-corda inoculadas com *M. incognita*, através de análise por nano-UPLC-ESI-Q-TOF e ferramentas de bioinformática.

Acesso (NCBI)	Proteína	Espécie	pI/MW (kDa)		Score ^(a)	Cobertura da seqüência (%)	Seqüência
			Experimental	Teórico			
2↑ gi/7458901	triacyl glycerol lipase	<i>Mycoplasma mobile</i>	5.04/ 29.675	8.98 / 33.037	23	5.96	IQILGETISYIFEDTGR
3↑ gi/283953230	OstA family protein	<i>Acidaminococcus fermentans</i>	4.92/ 29.011	5.61 / 29.917	21	5.61	LTGSVVADQK LISPPR
5↑ gi/63028586	malate dehydrogenase	<i>Escherichia coli</i>	5.30/ 25.503	6.22 / 27.508	19	5.28	PGMDR SNTFVAELK
6↑ gi/15220073	mitochondrial elongation factor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5.58/ 19.681	5.92 / 83.178	14	3.31	FPTSPAPNR IHEIHEVR MDSMDLER
7↑ gi/4103111	cytochrome c oxidase subunit	<i>Pinus strobus</i>	6.21/ 18.285	9.71 / 49.886	21	2.76	LNNIPSR SPLFVR
9↑ gi/ 44888108	Predicted mitochondrial protein AtMg00120	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6.11/ 15.680	5.21 / 16.024	17	4.89	MEIFFSK
10↑ gi/ 45477076	Predicted mitochondrial protein AtMg01310	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6.98/ 15.222	6.29/ 15.974	12	8.82	FFEIEICAHSWK
14↑ gi/45477063	Predicted mitochondrial protein AtMg01130	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4.90/ 14.183	5.11/ 11.758	13	7.54	EMLSISQK

(a) Todos os valores de escores listados estão acima do escore limite, calculado automaticamente pelo Mascot, e indicam expressiva significância estatística de similaridade ($p < 0.05$) nas buscas pelo NCBI.

6.5. Análise semi-quantitativa de expressão gênica

Foram feitos iniciadores (*primers*), apenas para *spots* diferencialmente expressos identificados das amostras de raízes totais para as seguintes proteínas: Asparaginil endopeptidase, ACC sintase, Cisteinil endopeptidase, Chalcona-flavona isomerase, ARG 10, Ascorbato peroxidase, Superóxido dismutase e leghemoglobina, totalizando assim 8 pares (*Forward* e *Reverse*) de iniciadores. Os *primers* de quitinases classes I, IIIa, IIIb e IV e actina foram gentilmente cedidos pelo laboratório de genética do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) coordenado pelo Prof. Dr. Thalles Grangeiro. A actina foi usada como controle para todas as análises. Para as demais proteínas de raízes totais, não foi possível serem feitos *primers* por causa da ausência de seqüências identificadas ou por que as eventuais seqüências desenhadas não satisfaziam, *in silico*, os requisitos de eficiência previamente referidos. No caso das proteínas de mitocôndrias de raízes, não foram desenhados iniciadores.

Todas as seqüências de iniciadores desenhados, que quando avaliados *in silico* exibiram propriedades excelentes para serem utilizados nos ensaios de análise de expressão gênica, foram sintetizadas. As especificidades para cada proteína, bem como as seqüências e suas características estão descritas na **TABELA 5**. Levando-se em consideração que houve modificação de expressão de algumas proteínas, como visto nos géis de eletroforese bidimensional, particularmente, no 4^o e 6^o dia após a inoculação (dai) com o nematóide, foram feitos cDNAs exclusivamente para os dias 4, 5 e 6 após inoculação, e dos seus

respectivos controles, para que os resultados das análises de expressão gênica fossem comparados com os dados dos géis bidimensionais gerados de amostras nos mesmos períodos. Infelizmente, por motivos desconhecidos, os *primers* feitos para a enzima Ascorbato peroxidase (*spot* 11) não exibiram nenhum tipo de amplificação, em nenhuma das temperaturas ensaiadas, nem com o aumento de número de ciclos. Isso não foi resolvido nem mesmo usando 1 µg de cDNA (para as outras amostras eram colocados apenas 700 ng).

TABELA 5. Sequencias dos iniciadores desenhados para as algumas proteínas que tiveram sua expressão alterada na análise proteômica diferencial de raízes de feijão-de-corda

Asparaginil endopeptidase Forward	5' AACGGCTATTGGA ACTAC 3'
Asparaginil endopeptidase Reverse	5' GAGATCAGCATCCCTTTG 3'
ACC sintetase Forward	5' CAAATGGGTCTTGCTGAGAAT 3'
ACC sintetase Reverse	5' TCTCAGCCTCTCCCTGTT 3'
ARG 10 Forward	5'CGAACACCATCGCCAAAG 3'
ARG 10 Reverse	5' AGGGAAAGAAGCAAGCGA 3'
Chlacona-flavona Isomerase Forward	5' GAGAGGGGTTGACGATT 3'
Chlacona-flavona Isomerase Reverse	5' GCCAATCATCGTCTCCAA 3'
Cisteinil endopeptidase Forward	5' TACGAGAGATGGAGGAGT 3'
Cisteinil endopeptidase Reverse	5' TCCGACAATTGCTACACC 3'
Ascorbato Peroxidase Forward	5' TCAGAGTACCTCAAGGAG 3'
Ascorbato Peroxidase Reverse	5'CTTCCCTCTTTTGCGAAC 3'
Leghemoglobina Forward	5' ATGGTTGCTTTCTCTGACAAG 3'
Leghemoglobina Reverse	5' TTCATCACTCCATTTGTCTCC 3'
Superóxido dismutase CuZn Forward	5'AAAGCGGTGGCGGTGCTGAAA 3'
Superóxido dismutase CuZn Reverse	5' GCTCAGTTCATGGCCGCCTTT 3'

Os *primers* para o gene da asparaginil endopeptidase (*spot 1*), subexpressa nos géis 2D de raízes inoculadas (**FIGURA 5**), permitiram a amplificação de um fragmento de cerca de 876 pb. As bandas desse gene apareceram muito bem definidas apenas nos cDNA extraídos das amostras controle, como esperado, e não apresentaram, aparentemente, diferença visual, entre os dias 4, 5 e 6 dias após inoculação(dai). A temperatura de anelamento (T_m) foi de 52, 5 °C, e foram necessários 35 ciclos no termociclador (**FIGURA 9**).

Para o gene da ARG 10 (*spot 10*), também subexpressa nos géis 2D de raízes inoculadas com o nematóide das galhas (**FIGURA 5**), os *primers* permitiram a amplificação de um fragmento de cerca 498 pb. A banda correspondente a esse gene apareceu com uma definição bastante razoável nos cDNA extraídos das amostras controle, como esperado, e não apresentaram, aparentemente, diferença visual, entre os dias 4,5 e 6. Na amostras de cDNA de raízes inoculadas, a raia correspondente ao 4º dia pós inoculação exibiu uma banda bem fraca, indicando que houve discreta amplificação desse respectivo gene. Entretanto, para os dia 5 e 6 após a inoculação, não houve visualização de bandas. A temperatura de anelamento foi de 56, 4 °C, tendo sido utilizados 35 ciclos de amplificação no termociclador (**FIGURA 10**).

FIGURA 9. Análise de alteração da asparaginil endopeptidase (*spot 1*). Houve subexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2) Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco.

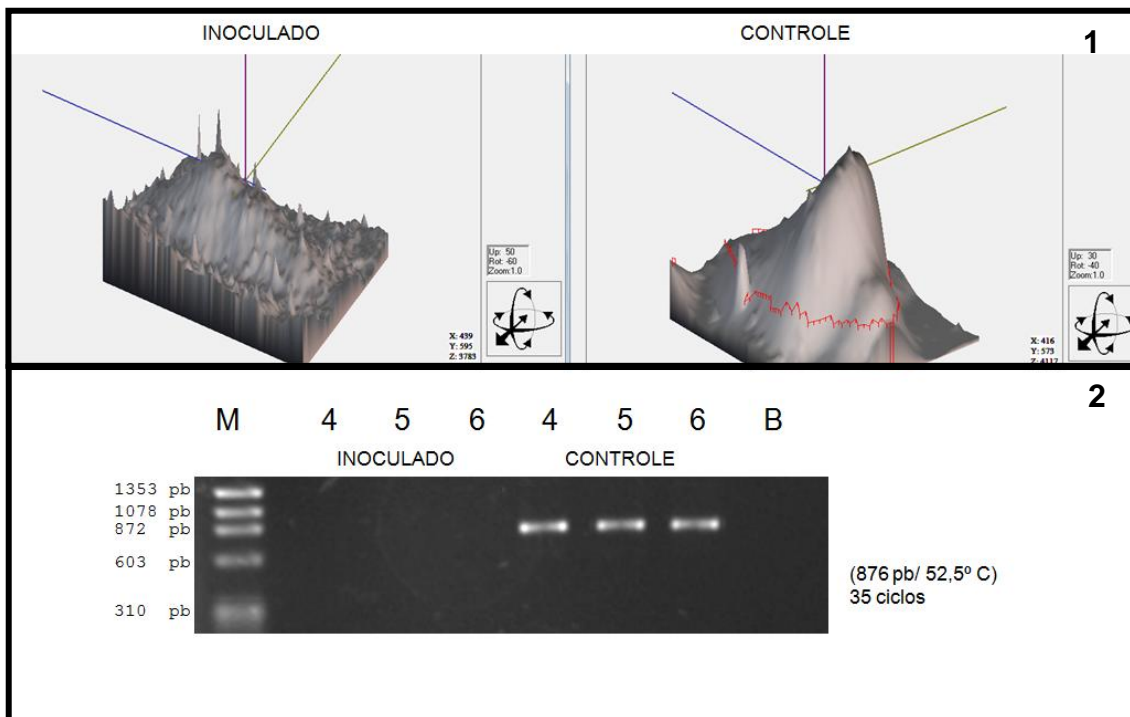
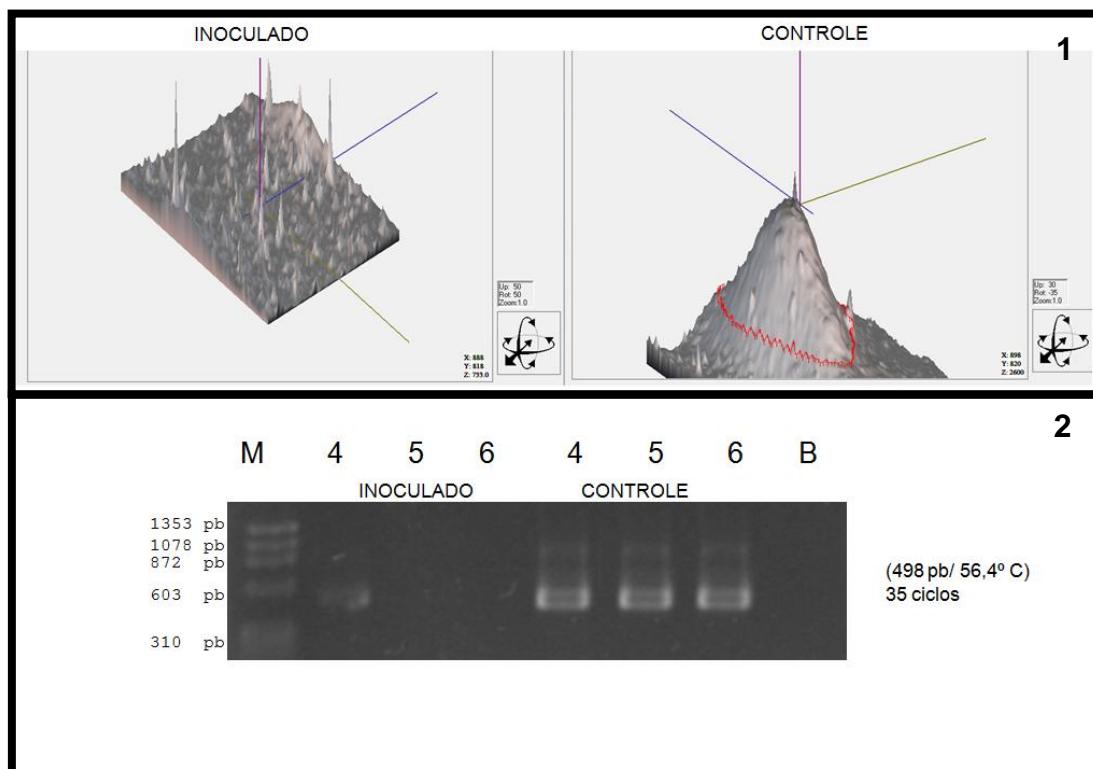


FIGURA 10. Análise de alteração da ARG 10 (*spot 10*). Foi constatada a subexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2) Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco.



Os iniciadores para o gene da ACC sintetase (*spot 2*), que foi superexpressa nos géis 2D de raízes inoculadas (**FIGURA 5**), amplificaram um fragmento de cerca de 858 pb. A banda correspondente a esse gene apareceu muito bem definida, sobretudo no 6º dai apenas nos cDNA extraídos das amostras inoculadas, e apresentaram, claramente, diferença de intensidade entre os dias 4, 5, e 6 após tratamento, destacando-se a observação de que as bandas se intensificaram do 4º para o 6º dai. Não houve amplificação em nenhuma das amostras de raízes controle (**FIGURA 11**). A temperatura de

anelamento foi de 58,9 °C e 20 ciclos foram programados no termociclador, uma vez que 35, 30 e 25 ciclos saturavam a amplificação das amostras (controle e inoculadas), tornando todas as bandas indistinguíveis.

Para o gene da Cisteinil endopeptidase (*spot 4*), que foi, também, superexpressa nos géis 2D de raízes inoculadas (**FIGURA 5**) houve amplificação de um fragmento de cerca de 765 pb. A banda correspondente a esse gene apareceu bem definida, exclusivamente nos cDNA extraídos das amostras inoculadas, e não apresentaram diferença de intensidade entre o 4^o, 5^o, e 6^o dai. Não houve amplificação em nenhuma das amostras de raízes controle (**FIGURA 12**). A temperatura de anelamento foi de 51,2 °C, tendo sido utilizados 25 ciclos no termociclador, uma vez que 35 ou 30 ciclos saturavam a amplificação das amostras (controle e inoculadas) tornando as todas as bandas indistinguíveis.

FIGURA 11. Análise de alteração da ACC sintetase (*spot 2*). Foi constatada a superexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2) Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco.

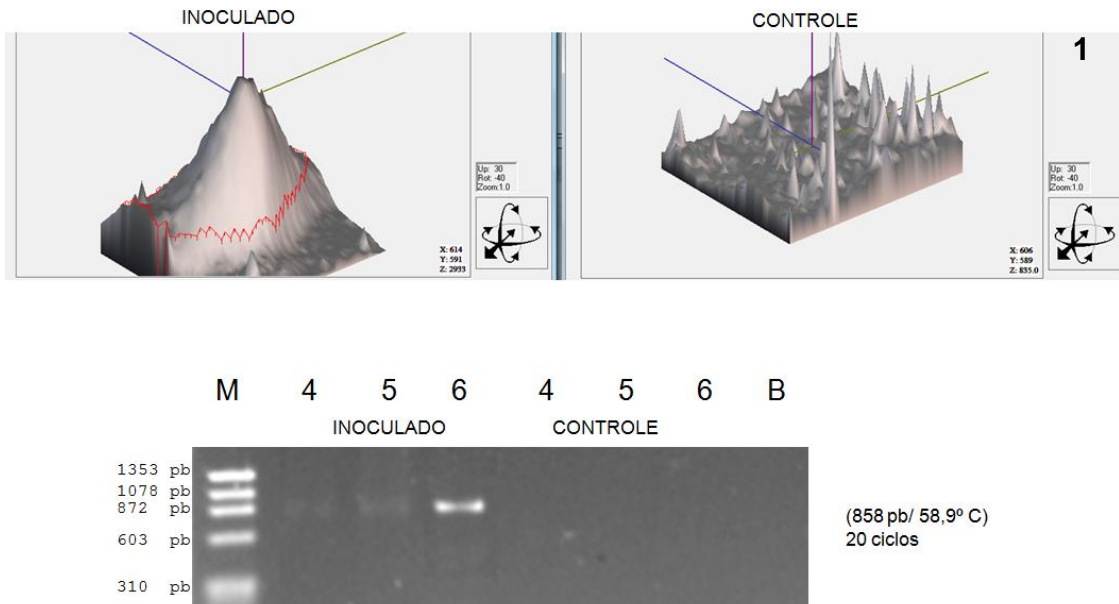
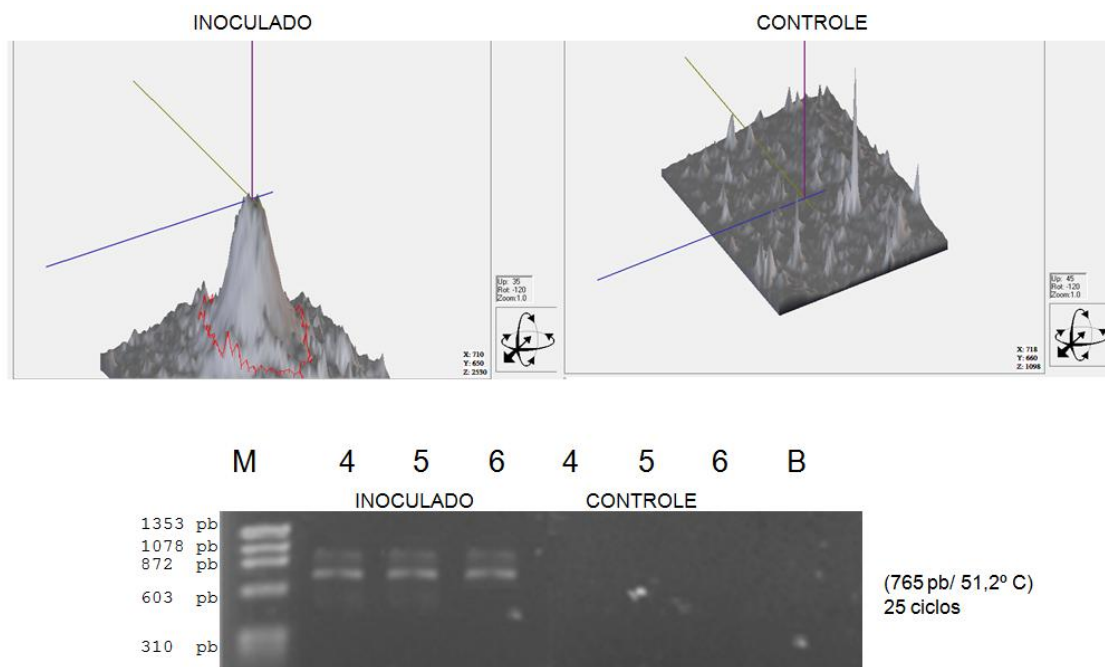


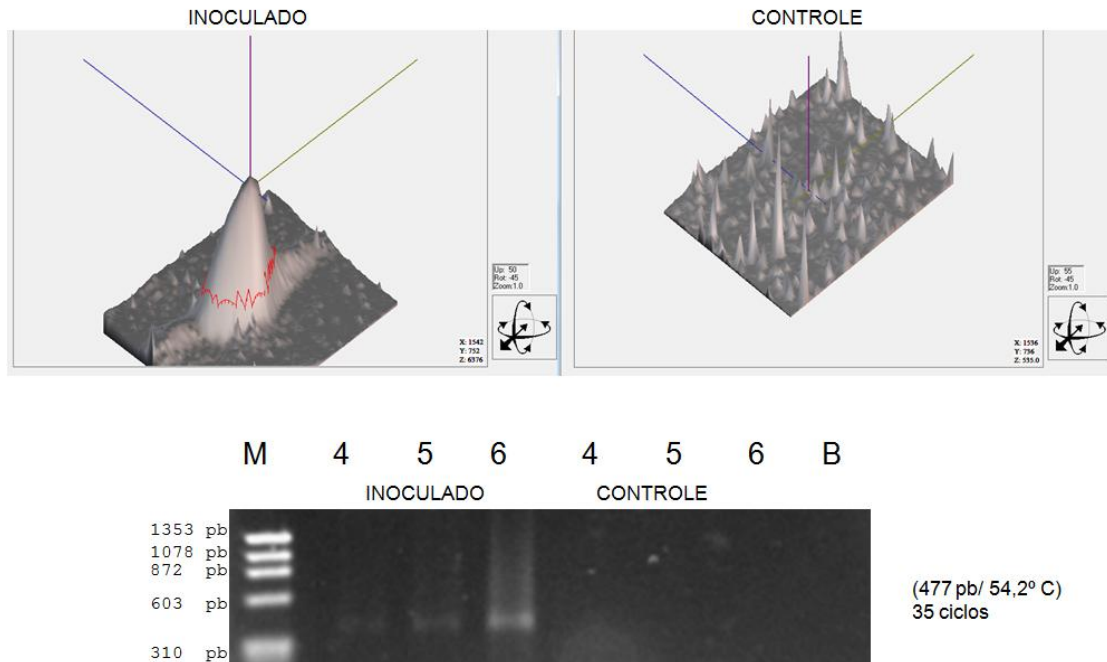
FIGURA 12. Análise de alteração da cisteinil endopeptidase (*spot 4*). Foi constatada a superexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2) Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco.



Os iniciadores para o gene da Chalcona-flavona isomerase (*spot 6*), que foi superexpressa nos géis 2D de raízes inoculadas (**FIGURA 5**), amplificaram um fragmento de cerca de 477 pb. A banda correspondente a esse gene mostrou uma boa definição, sendo observada sua maior expressão no 6° dai para os cDNAs extraídos das amostras inoculadas, tendo sua intensidade aumentada, gradualmente, entre o 4° e 6° dai . Não houve amplificação em nenhuma das amostras de raízes controle. A temperatura de anelamento foi de 54, 2 °C e 35 ciclos foram utilizados no termociclador (**FIGURA 13**).

Os *primers* para o gene da superóxido dismutase CuZn dependente (*spot 15*), superexpressa nos géis 2D de raízes inoculadas (**FIGURA 5**), permitiram a amplificação de um fragmento de cerca de 393 pb. A banda associada a esse gene exibiu boa definição, sendo sua maior expressão observada no 6° dai, para os cDNA extraídos das amostras inoculadas. Houve diferença de intensidade, também, entre o 4°, 5°, e 6° dai, ocorrendo gradual aumento de intensidade do 4° para o 6° dai. Houve fraquíssima amplificação nas raias das amostras de raízes controles, entre o 4° e 5° dai e nenhuma amplificação visível no 6° dai. A temperatura de anelamento foi de 61 °C. Foram utilizados 35 ciclos no termociclador (**FIGURA 14**).

FIGURA 13. Análise de alteração da chalcona-flavona isomerase (*spot 6*). Foi visto a superexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2) Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco.



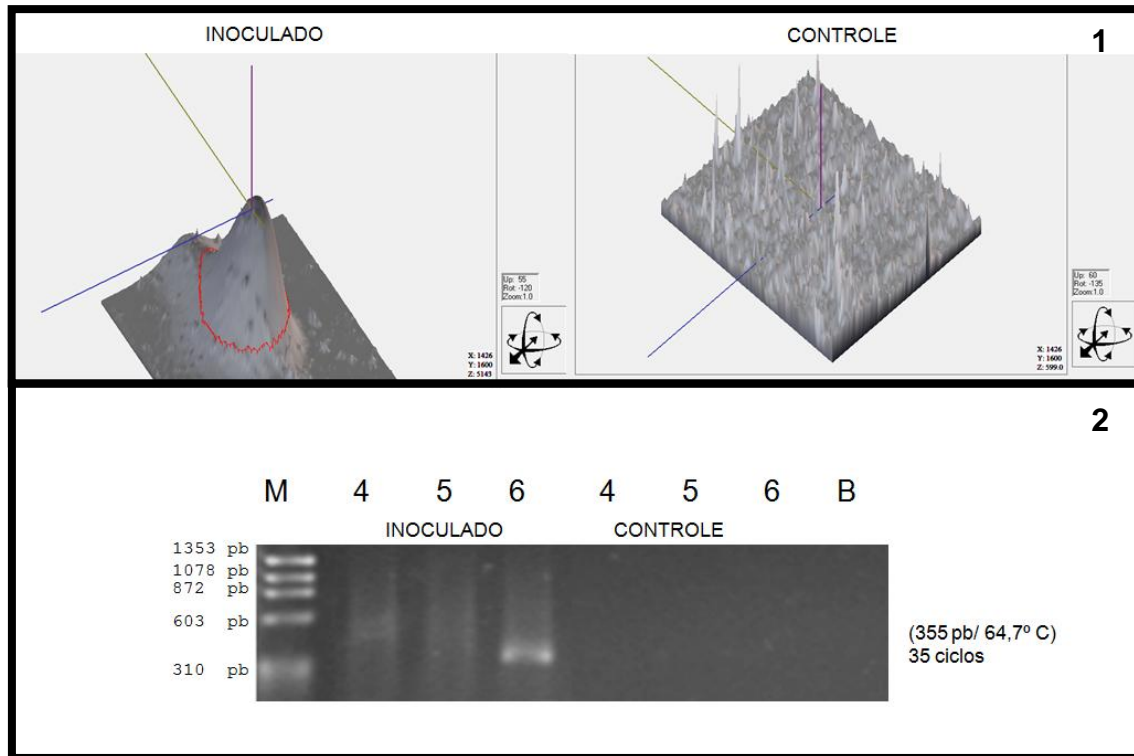
Para o gene da Leghemoglobina (*spot 21*), também superexpressa nos géis 2D de raízes inoculadas (**FIGURA 5**), um fragmento de cerca de 355 pb foi amplificado. A banda correspondente a esse gene exibiu boa definição, sendo sua maior expressão observada no 6º dia para os cDNA extraído das amostras das plantas inoculadas com o nematóide. Houve aumento gradual de intensidade da banda do 4º para o 6º dia. Não houve amplificação em nenhuma das amostras de raízes controles, não inoculadas. A temperatura de anelamento foi de 64, 7 °C. Foram utilizados 35 ciclos no termociclador (**FIGURA 15**). Todas as análises de expressão semiquantitativa dos genes citados acima corresponderam, perfeitamente, aos perfis dos seus respectivos *spots* nos géis de eletroforese bidimensional das amostras inoculadas e controles, tanto com relação à intensidade quanto ao tempo de expressão.

Os *primers* para as isoformas de quitinases que foram testados (classes I, IIIa, IIIb e IV), que poderiam estar relacionados com o *spot 18* (PR-3, que é um tipo de quitinase), o qual foi superexpresso nos géis de raízes inoculadas (**FIGURA 5**), apresentaram resultados bem interessantes. Apenas os iniciadores para as quitinases de classe I demonstraram, indiscutivelmente, ser distintos, comparadas as amostras inoculadas e controles. A análise desse gene, em particular, mostrou, claramente, que houve aumento de expressão, do 4º para o 6º dia, nas amostras inoculadas e uma fraca amplificação apenas para o dia 4 após tratamento, com água, do controle. O tamanho do fragmento amplificado foi de cerca de 972 pb (**FIGURA 16**). A temperatura de anelamento foi de 58 °C e foram necessários 28 ciclos no termociclador. Para as quitinases de classe IIIa e IIIb, os resultados foram muito semelhantes: ambas exibiram

um sutil e homogêneo aumento de expressão nas amostras de raízes inoculadas, no 4º, 5º, e 6º dia, quando comparadas com seus respectivos controles. As amplificações geraram fragmentos de cerca de 576 e 563 pb (IIIa e IIIb, respectivamente). Foram necessários 28 ciclos no termociclador e a temperatura de anelamento foi de 55 °C para ambos os genes (**FIGURA 16**). Não houve amplificação para os *primers* da quitinase classe IV nas amostras inoculadas nem controle.

Quanto aos genes “*nod*” (*Rhizobium spp*), não houve, também, amplificação, quando nucleotídeos iniciadores específicos foram utilizados, indicando a ausência de simbiose com esse organismo. Os iniciadores para o gene da actina, utilizado como controle, exibiram homogeneidade na visualização em todas as raias das amostras de raízes inoculadas e não inoculadas com o nematóide das galhas.

FIGURA 15. Análise de alteração da leghemoglobina (*spot* 21). Foi visto a superexpressão desta proteína nas amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. (1) Gráfico tridimensional do *spot* comparando a expressão desta proteína nos géis inoculado x controle (6 dias após inoculação). (2) Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) da mesma proteína nos dias 4, 5, e 6 dias após inoculação. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco.



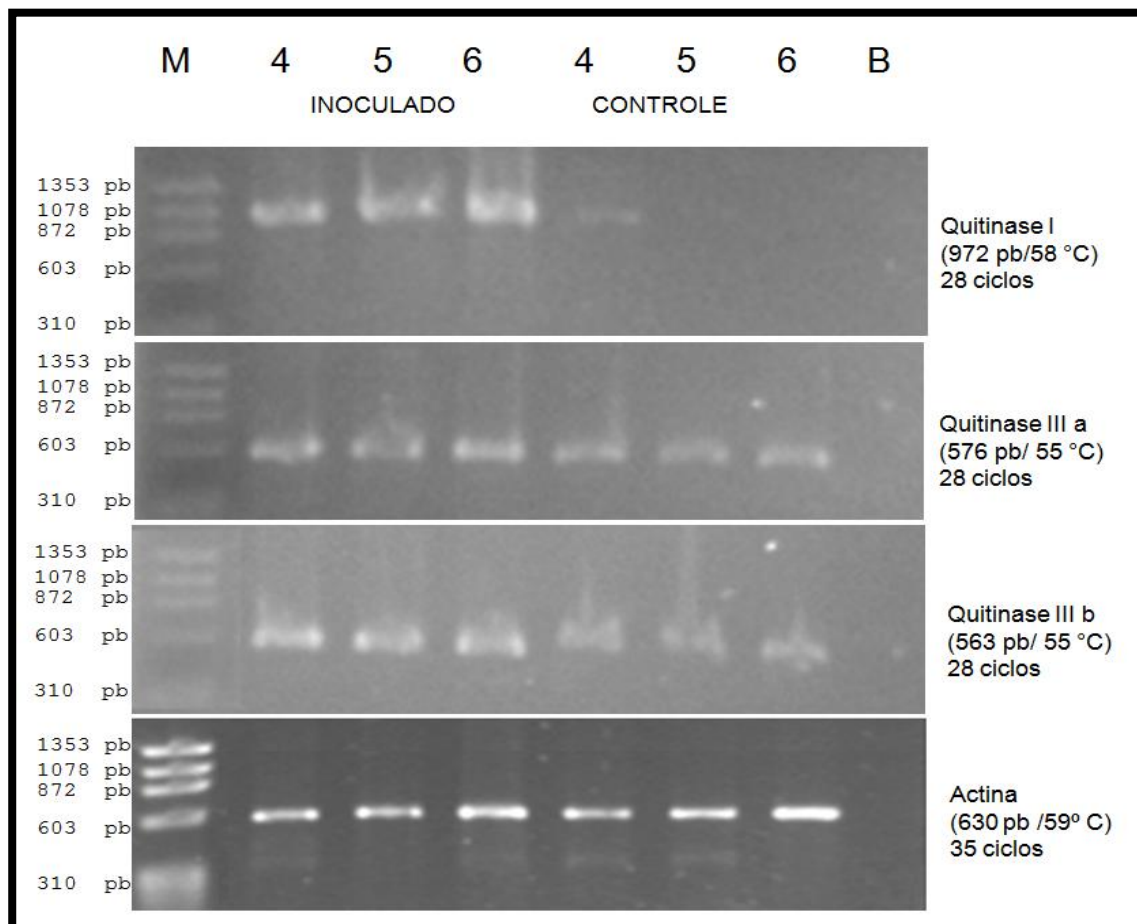


FIGURA 16. Análise semi-quantitativa de expressão gênica (PCR) de isoformas de quitinase (PR-3) 4, 5 e 6 dias após inoculação . Foi visto a superexpressão desta proteína (*spot 18*) nos géis das amostras de raízes inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com seus respectivos controles. O gene da actina foi usado como controle para todas as análises de expressão gênica. (M) = marcador de massa molecular e (B)=branco.

7. DISCUSSÃO

7.1. Extração de proteínas das raízes de feijão-de-corda

Para a extração de proteínas de raízes de feijão-de-corda, o melhor procedimento, dentre os testados, foi aquele empregando tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, contendo glicerol 20%, PEG 3%, PVPP 1:1 (m/v), EDTA 10 mM, DTT 1 mM e PMSF 1 mM. Esses estudos preliminares da escolha do melhor tampão de solubilização das proteínas são necessários porque plantas, órgãos e tecidos vegetais diferentes exigem protocolos distintos em função das suas peculiaridades, como mostrado, por exemplo, nos protocolos de extração de proteínas de caule de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) (GONDIM, 2010) e de proteínas de folhas de feijão-de-corda (BARRETO, 2005), cujos componentes dos tampões utilizados foram diferentes do empregado nesse trabalho. Para raízes de feijão-de-corda, foi observado, quando comparado com outros protocolos, que a faixa de pH 8,0, a presença de PVPP e glicerol (ao invés da sacarose) foram essenciais para o sucesso da extração, e experimentos de eletroforese bidimensional (2D).

Com relação à massa de proteína utilizada para a eletroforese 2D, 200 µg gerou o melhor mapa bidimensional após revelação dos *spots* por comassie coloidal (CANDIANO *et al.*, 2004). Essa quantidade de proteínas de raízes de feijão-de-corda aplicadas na corrida 2D se localiza na faixa mediana de capacidade de carregamento das fitas de isofocalização utilizadas (fitas de 13 cm com variação de pH 4-7), que, segundo instruções do fabricante, pode

variar entre 75-400 μg de proteína, dependendo da fonte da amostra. Quando os valores ultrapassavam 200 μg de proteína, os géis exibiam perfis muito “borrados”, sobretudo nas regiões correspondentes às proteínas de alta massa molecular e com pI ácido (canto superior esquerdo do gel), o que dificultava, bastante, a resolução da imagem digitalizada e, conseqüentemente, as análises posteriores. Já é muito bem descrito na literatura que essas regiões específicas dos géis que exibem visualização embaçada correspondem à fosfo- e/ou glicoproteínas, na grande maioria das vezes, e que uma das formas de minimizar esse efeito é diminuindo a quantidade de proteínas aplicada na fita de isofocalização (BYKOVA *et al.* 2003; KULATHINGAL *et al.* 2009).

7.2. Purificação de mitocôndrias de raízes de feijão-de-corda

O procedimento usado para purificação de mitocôndrias de raízes foi bem sucedido, o que comprova a robustez do protocolo utilizado (Millar *et al.*, 2001). As mitocôndrias não exibem tantas diferenças morfológicas entre os indivíduos para serem necessárias adaptações substanciais nos protocolos já existentes (TAYLOR *et al.*, 2009; CAMPBELL, 2010). Uma das dificuldades para a obtenção de quantidades significativas de mitocôndrias purificadas para extração de proteínas para a corrida 2D, foi a necessidade de se usar grandes quantidades iniciais de raízes de feijão-de-corda. Isso levou ao uso de imenso volume de tampão de extração, o que tornava o manuseio e o processamento das amostras difíceis. Além disso, o protocolo utilizado era muito extenso e em

todas as etapas de extração o material tinha que ser mantido em ambiente de baixa temperatura (banho de gelo).

7.3. Análise diferencial *in silico* dos géis, processamento dos *spots*, identificação de proteínas por espectrometria de massa e análise semiquantitativa de expressão gênica das amostras de proteínas de raízes

Dos 22 *spots* protéicos oriundos de raízes de feijão-de-corda inoculado com o *M. incognita*, cujas expressões foram reprogramadas geneticamente, 5 (aproximadamente 22%) não foram identificados, apesar de repetidas tentativas. Esse fato sugere que, aparentemente, não existe, ainda, nos bancos de dados, espectros virtuais de fragmentos digeridos por tripsina para espectrometria de massas que se assemelhem ao espectro desses *spots* para a espécie estudada e nem de quaisquer outras espécies. Isso não é tão surpreendente já que muitos trabalhos com plantas exibem as mais variadas porcentagens de *spots* não identificados (AGHAEI *et al*, 2008; KATAM *et al*, 2010). Em muitos casos, porcentagens até maiores dos *spots* analisados não foram possíveis de serem identificados, como por exemplo, numa análise proteômica diferencial do patossistema fungo (*Mycosphaerella pinodes*) x ervilha (*Pisum sativum*), no qual foram detectadas 84 proteínas (*spots*) diferencialmente expressos, mas sendo, apenas, 31 delas satisfatoriamente

identificadas, protagonizando, assim, 63%, aproximadamente, de insucesso (CASTILLEJO *et al.*, 2010).

Nesse presente trabalho, a reprogramação genética da expressão dos 22 spots protéicos de raízes de feijão-de-corda (cv. CE_31) inoculadas com o nematóide *M. incognita* (Raça 3) foi, significativamente, mais notada a partir do 4º dia após inoculação. Andrade (2003), trabalhando com o mesmo patossistema, verificou que as atividades das enzimas anti-oxidativas peroxidase de guaiacol (POX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), e das PR-proteínas β -1,3-glucanase (GLU), quitinase (CHI) e do inibidor de protease cisteínica tiveram suas expressões alteradas, sobretudo nas raízes, a partir do 4º e 6º dia após inoculação. No trabalho de Andrade (2003), 4 das enzimas estudadas (SOD, POX, GLU e CHI) tiveram suas respectivas atividades aumentadas a partir do 4º ou 6º dia após inoculação. Esses achados foram reforçados nesse presente trabalho, através do estudo proteômico realizado (**TABELA 3**). Em relação à catalase, foi observado por Andrade (2003) haver diminuição de atividade. Em nossa abordagem proteômica, essa enzima não foi sequer detectada, independentemente das raízes serem de plantas inoculadas ou controles. Uma das hipóteses para explicar esse resultado seria que o tampão de extração de proteínas totais de raízes para eletroforese bidimensional utilizado no nosso trabalho não seria adequado para solubilizar/extrair quantidades significativas de catalase, tornado impossível sua detecção após a corrida 2D.

Dentre as proteínas cuja expressão foi diminuída em raízes de feijão-de-corda (cv. CE-31) do 4º para o 6º dia após inoculação com *M. incognita*, raça 3,

comparado com plantas controles, está a asparaginil endopeptidase (**TABELA 3, FIGURA 9**). Essa enzima é uma protease que tem como sítio de clivagem específico o grupamento carboxi-terminal interno de resíduos de asparagina (Asn). Normalmente, é descrita estar presente em sementes de leguminosas em desenvolvimento e, também, como sendo responsável por processamentos pós-traducionais em precursores de proteínas de armazenamento (OKAMOTO *et al.*, 1996).

Está descrito na literatura que os nematóides das galhas são capazes de manipular a célula da planta hospedeira, durante uma interação compatível (CAILLAUD *et al.*, 2007). Um exemplo clássico é o da corismato mutase que, através da inoculação, via estilete, o nematóide insere uma “versão” própria desta enzima que mimetiza a enzima constitutiva da planta, interferindo nas suas rotas metabólicas naturais para favorecer a invasão (DAVIS *et al.*, 2008). Portanto, é possível que a supressão da expressão da asparaginil endopeptidase nas raízes do CE-31, resistente ao nematóide, quando inoculada, seja uma estratégia utilizada pelo animal invasor, mas cujas razões ainda são desconhecidas. Alternativamente, pode ser uma estratégia da própria planta atacada, na tentativa de economizar energia que seria investida no processamento de proteínas de reserva em prol da síntese de outras moléculas necessárias para a defesa da planta.

Em relação à ACC sintetase e ACC oxidase (**TABELA 3**), essas enzimas exibiram intensa superexpressão nos géis 2D das raízes de feijão-de-corda inoculadas com o nematóide das galhas quando comparadas com os géis controles. A enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) sintetase,

em especial, teve sua análise de expressão gênica semiquantitativa concordante com o perfil do seu *spot* correspondente, como mostra a (TABELA 3, FIGURA 11). Tais enzimas participam da biossíntese de etileno nas plantas (SONG *et al.*, 2005). A primeira etapa dessa rota biossintética é a adenosilação do aminoácido metionina pela metionina adenosiltransferase gerando a S-adenosil-L-metionina, que é utilizada, subseqüentemente, como substrato pela ACC sintase. Essa enzima, por sua vez, promove a síntese de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) que, finalmente, é convertido em etileno pela ACC oxidase (SONG *et al.*, 2004; FRANKOWSKY *et al.*, 2009). O aumento de expressão dessas enzimas, que participam dos últimos passos desta referida rota, sugere, fortemente, que está havendo superprodução de etileno no feijão-de-corda resistente (CE-31) inoculado com *M. incognita*.

O etileno é um fitormônio gasoso que pode ser produzido em diversas partes das plantas (inclusive nas raízes) e é conhecido, principalmente, por regular eventos metabólicos tais como: indução da germinação de sementes, expansão de folhas, promoção ou inibição de florescência, amadurecimento de frutos, abscisão de vários órgãos, gravitropismo, senescência e outros mais (CHANG e SHOCKEY, 1999; BINDER, 2008). Já é bem estabelecido, também, que o aumento da produção desse fitormônio é induzido por injúrias, diversos estresses abióticos e bióticos. Além disso, sua biossíntese pode ser estimulada por outros sinais hormonais endógenos, assim como também pode interagir sinergisticamente com eles (SONG *et al.*, 2004; BINDER, 2008; SHINSHI, 2008). Dentre os mais variados tipos de estresses, o ataque de patógenos (estresse biótico) é um dos fatores que desencadeiam a síntese de etileno na

raiz (HASE *et al.*, 2003). As vias de defesa de planta relacionadas com a presença do etileno já foram discutidas em alguns trabalhos iniciais (CHANG e SHOCKEY, 1999; KUNKEL e BROOKS, 2002; HASE *et al.*, 2003; (VAN LOON *et al.* 2006)), dentre as quais sugeriu-se, inclusive, uma possível correlação direta desse fitormônio com aumento da expressão de β -1,3-glucanase, a qual, na maioria das vezes, está, também, relacionada com as vias de defesa de plantas [uma das isoformas de glucanase (PR-2) foi detectada nesse trabalho – (TABELA 3)]. No entanto, essas rotas que interrelacionam o etileno com o aumento da expressão de glucanase não foram, ainda, completamente elucidadas (YOSHIKAWA *et al.*, 1990; CHANG e SHOCKEY, 1999). Recentemente, foi reforçado que o etileno deve estar estritamente relacionado com esses mecanismos contra fitopatógenos, principalmente quando interage, também, com as vias de sinalização do jasmonato (JA), metil-jasmonato (derivado mais ativo do jasmonato) e do ácido salicílico (SA), além de outras rotas alternativas ainda não bem compreendidas. Esses intercruzamentos de vias podem ativar o aumento da expressão de moléculas genuinamente defensivas, tais como alguns tipos de proteínas relacionadas à patogênese (*PR proteins*), defensinas, proteínas semelhantes à heveína, tionina, quitinase e fitoalexinas, além de promoverem o fortalecimento da parede celular, estimulando a via dos fenilpropanóides, bem como a biossíntese de antocianinas anti-oxidantes (KUNKEL e BROOKS, 2002; SHINSHI, 2008; KLINK *et al.*, 2010; GAIGE *et al.*, 2010).

Na literatura, já são bem conhecidas algumas respostas de plantas transgênicas alteradas para serem pouco sensíveis ao etileno (nocauteando

receptores) ou para diminuir sua produção quando elicitadas por patógenos. Na grande maioria dos casos, a severidade da doença aumentou nas plantas onde as rotas relacionadas com o etileno eram deficitárias, quando comparadas com seus respectivos controles. Entretanto, em alguns poucos casos, por motivos ainda não bem compreendidos, os efeitos da doença diminuiu (VAN LOON *et al.* 2006).

As análises por eletroforese 2D, realizadas no presente trabalho, demonstraram aumento da expressão das proteínas β -1,3-glucanase (PR-2) , quitinase (PR-3), PR-1, e Chalcona-flavona isomerase (**TABELA 3** e **FIGURA 13** respectivamente) de raízes de feijão-de-corda inoculado com *M. incognita*. Há relato de que essas proteínas são induzidas pelo etileno (KUNKEL e BROOKS, 2002), Chalcona-flavona isomerase está diretamente relacionada com a via de fenilpropanóides, levando à síntese de flavonas, fitoalexinas e antocianinas antioxidantes. Flavonóides e antocianinas são as duas principais classes de metabólitos secundários ativos que são extremamente importantes para o desenvolvimento e crescimento das plantas (NDAKIDEMI e DAKORA, 2003). Em contrapartida, tem-se demonstrado, também, em trabalhos iniciais, que vários genótipos distintos de feijão-de-corda liberam concentrações significativamente diferentes dessas moléculas que, aparentemente, servem como deterrentes químicos contra insetos, bem como para os mais variados tipos de patógenos (DAKORA e PHILLIPS, 2002). Mais recentemente, relatos têm enfatizado que leguminosas, de uma maneira geral, defendem-se contra vários tipos de doenças utilizando-se flavonóides e antocianinas, tanto como

“fitoantecipinas” protetoras ou como agentes diretos contra patógenos invasores (MAKOI *et al.* 2010).

Já no caso das PR-1, PR-2 e PR3, cujas superexpressões podem estar relacionadas à presença do etileno (KUNKEL e BROOKS, 2002), pertencem à classe mais conhecida de proteínas de defesa de plantas conhecidas genericamente como proteínas relacionadas à patogênese, o que torna a superexpressão dessas proteínas, nesse trabalho, um evento não tão surpreendente, mesmo que alguns trabalhos não certifiquem essa correlação direta do etileno com as PRs (ZINOV'EVA *et al.* 2001). O papel do etileno na defesa das plantas ainda é um pouco controverso, podendo contribuir para a geração de resistência à patógenos em algumas interações e facilitando o aparecimento de doença em outras circunstâncias (KUNKEL e BROOKS, 2002; VAN LOON *et al.* 2006), mas, ao que parece, no patossistema alvo desse trabalho, os resultados levam a hipotetizar que o etileno pode estar agindo de modo a aumentar a resistência da planta via ativação, também, destas referidas PRs. As PR-2 (β -1,3 glucanase) e PR-3 (quitinase) são bem descritas, principalmente em respostas a ataques de fungos. No entanto, muitos casos de injúrias mecânicas em diversas partes das plantas têm sido relatados como elicitores dessas proteínas. A bibliografia sugere que, mesmo sendo uma resposta dirigida mais especificamente aos fungos, as PR-2 e PR-3 podem ter sua expressão aumentada, frente a outros elicitores como uma forma de precaução contra possíveis patógenos oportunistas (VAN LOON *et al.* 1999; 2006). Interessantemente, a PR-1, cuja atividade biológica tem sido relacionada principalmente à defesa contra vírus (COLE *et al.* 2004), tem sido

utilizada, também, como marcadora de uma condição de defesa aumentada na planta, conferida por indução de patógenos de uma forma generalizada. A PR-1, normalmente, é expressa juntamente com outras PRs (EDREVA, 2005) como foi constatado nesse trabalho. Mais recentemente, foi demonstrado que o aumento de expressão das PR-1, PR-2 e PR-3 é diretamente dependente de um prévio aumento de expressão de uma Nucleotídeo difosfato quinase (NDPK). Nesse trabalho, foi observado aumento de expressão de NDPK nas raízes do CE-31 inoculadas com *M. incognita*, quando comparadas com o controle, não inoculado (**TABELA 3**). Já foi relatado no patossistema tomate x *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, que quando a planta foi nocauteada para a expressão do gene dessa referida proteína, as defesas do vegetal foram fortemente suprimidas. Por outro lado, quando foi alterada para se tornar constitutiva, havia aumento, também, na expressão das PRs 1, 2, e 3, especificamente, sendo sua resistência a patógenos igualmente aumentava (XING *et al.* 2008). Além disso, já foi descrito que a síntese de NDPK também pode ser dependente da presença de etileno (KUMAR e KLESSING, 2000). Esses achados estreitam, ainda mais, a relação do etileno com mecanismos de defesa de planta.

A cisteinil endopeptidase, que exibiu forte aumento de expressão nas raízes do feijão-de-corda CE-31 inoculadas com o nematóide (**TABELA 3**, **FIGURA 12**), pertence ao grupo das proteinases (também conhecidas como proteinases tióis) e exerce papéis bem estabelecidos em rotas de crescimento, desenvolvimento, senescência e morte celular programada (GRUDKOWSKA e ZAGDAŃSKA, 2004). Além dessas funções fisiológicas

acima, essas enzimas participam em reações de defesa de plantas desencadeada por injúrias causadas pelos mais diversos fitopatógenos, sobretudo em látex de plantas como *Carica papaya* e *Ficus carica* (AZARKAN *et al.* 2006). Já é bem conhecida a correlação de injúrias mecânicas com o eminente surgimento das endopeptidases cisteínicas e que, normalmente, nestes casos essas enzimas estão contextualizadas, na planta, como “frentes de defesa”. Isso já foi descrito para milho e fumo, principalmente relacionado com injúrias causadas por insetos, fungos e nematóides, sugerindo, com base em observações de ensaios *in vitro*, que a presença aumentada dessa enzima se dê para que a mesma promova degradação direta de estruturas do patógenos, embora os mecanismos pormenorizados por trás desses eventos, *in vivo*, não sejam bem compreendidos (AZARKAN *et al.* 2006; HELM *et al.* 2008). Não existe nada na literatura que relacione as endopeptidases cisteínicas com ataque de nematóide a raízes de feijão-de-corda. Portanto, mais investigações necessitam ser conduzidas para esclarecer a razão de sua reprogramação genética na planta inoculada com o nematóide das galhas.

A ascorbato peroxidase (APX) e a superóxido dismutase cobre-zinco dependente (CuZnSOD), aumentaram de expressão nas raízes de CE-31 inoculadas com *M. incognita*, quando comparadas com controles não inoculados (**TABELA 3**). Essas enzimas são conhecidas por serem componentes normalmente presentes nos processos de desintoxicação celular. As peroxidases, de uma forma geral, são descritas, também, estando envolvidas, direta ou indiretamente, em outras funções biológicas nas plantas, tais como biossíntese de lignina, degradação de ácido 3-indolacético e,

também, biossíntese de etileno (SAROWAR *et al.* 2005; BERNSTEIN *et al.* 2010). Já é bem documentado que as peroxidases aumentam de expressão durante as interações plantas-patógenos (DO, *et al.* 2003; ANDRADE, 2003) A ascorbato peroxidase, em especial, é uma das mais importantes enzimas que atuam na degradação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) oriundo do citosol e/ou de cloroplastos das plantas utilizando, ascorbato como doador de elétrons (SAROWAR *et al.* 2005; SHI *et al.* 2008). Foi descrito, previamente, o aumento da expressão, especificamente, da ascorbato peroxidase em resposta a fungos em folhas de fumo e *Arabidopsis* (HUCKELHOVEN *et al.* 2001).

A superóxido dismutase (**TABELA 3, FIGURA 14**) cobre-zinco dependente (CuZnSOD), que pertence à família de metalo-enzimas (como a MnSOD e a FeSOD, por exemplo), exibe papel crucial, juntamente com a ascorbato peroxidase (APX), no controle da explosão oxidativa. Primeiramente, a SOD converte ânions superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, finalmente, é convertido em água pela APX. Embora a grande maioria dos trabalhos cite-a como sendo comum aos tecidos vegetais fotossintetizantes, recentemente, foi observado aumento da expressão da CuZnSOD em folhas de algodão (*Gossypium hirsutum*), em resposta ao ataque da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum*. Esse cultivar (Réba B50) do algodoeiro é resistente à essa bactéria, e desencadeia resposta hipersensitiva nas folhas quando infectado (VOLOUDAKIS *et al.* 2006). Não havia, até então, relatos de aumento especificamente da CuZnSOD em tecidos radiculares. Trabalhos preliminares, descrevem o aumento da atividade da SOD, sem especificar o tipo, em raízes de soja (*Glycine max*) em interação com *M.*

incognita, mostrando que essa atividade começou a diferir da amostra controle a partir de 48 horas após inoculação (VANDER POLL *et al*, 1994). Posteriormente, Andrade (2003), confirmou esse aumento de atividade da SOD (também não especificando o tipo), a partir de 48 horas após inoculação, também nas raízes do cultivar de feijão-de-corda resistente ao *M. incognita*.

Foram feitos ensaios de superexpressão combinada da CuZnSOD e da APX, em plantas transgênicas de *Festuca arundinacea* Schreb. cv. Kentucky-31, sendo observado aumento da tolerância desta planta a vários tipos de estresses, inclusive bióticos (LEE *et al*, 2007). Em concordância com esses achados, nosso trabalho demonstra a necessidade da presença dessas enzimas para compor, juntamente com outras, o arsenal de defesa da planta contra o nematóide das galhas e, também, a constatação da presença da CuZnSOD, também em raiz, o que não havia ainda sido evidenciado.

Uma HSP (17.5 kDa class I Heat Shock Protein), proteína de choque térmico Classe I, teve aumento de expressão nas amostras de raízes de feijão-de-corda inoculadas (**TABELA 3**). Esta proteína pertence a uma bem conservada classe de moléculas que funcionam como chaperonas moleculares, exercendo papel essencial no enovelamento e transporte de proteínas em células procariontes e eucariontes (LANDRY e GIERASCH, 1995; COX e NELSON, 2008). Nos nossos géis, foi detectado HSP de baixa massa molecular, a qual é denominada de sHSP (*small heat shock proteins*). Esta proteína está inserida em uma classe de chaperonas que possuem massa molecular entre 20 e 30 kDa e compartilham um domínio conservado de 100 aminoácidos. A diversidade de sHSPs é observada somente em plantas e

reflete a intensa adaptação destas proteínas a diferentes condições de estresse (MEIRELES, 2006). Ataque de patógenos e os mais variados estresses abióticos são capazes de elevar a expressão dessas proteínas, que exercem papel protetor nas células afetadas (VENTELON-DEBOUT *et al.*, 2004; TIMPERIO *et al.*, 2008).

Surpreendentemente, uma das proteínas que mais teve sua expressão diferenciada nas raízes do CE-31 inoculadas com *M. incognita*, comparadas com o controle, foi a Leghemoglobina (Lb) (**TABELA 3, FIGURA 14**). Essa proteína é indispensável no processo de fixação do nitrogênio nos nódulos de bacteróides simbiotes (MUREAU *et al.*, 1995; DAKORA, 1995; PUPO e DAVIS, 1995). A principal função dessa heme proteína, *in vivo*, é de atuar como transportadora de oxigênio para os bacteróides (MUREAU *et al.* 1995). Nos nódulos radiculares, a Lb existe, principalmente, na forma reduzida, mas em virtude da baixa pressão do oxigênio, *in vivo*, apenas 20% é oxigenada para gerar Oxileghemoglobina (Oxy-Lb). A Oxy-Lb pode sofrer auto-oxidação e, concomitantemente, produzir radicais superóxidos (O_2^-) e, conseqüentemente, H_2O_2 (PUPO e DAVIS, 1995). Em última instância, a Lb também pode reagir com H_2O_2 para formar Lb(IV) (DAKORA, 1995). Recentemente, foi descoberto que a super-expressão de algumas classes de hemoglobinas vegetais não simbióticas (nsHBs), no fumo, levava à redução de sintomas necróticos (GARROCHO-VILLEGAS *et al.* 2007), assim como foi relatado que essas nsHBs exercem atividades semelhantes àquelas de peroxidases (HOY e HARGROVE, 2008) e também que sua superexpressão em *Arabidopsis* levava ao aumento da resistência à diversas doenças (THIEL *et al.*, 2011). O aumento

da expressão da Lb nas raízes do CE-31, inoculado com o *M. incognita*, não está associado à infecção das raízes por *rhizobium spp*, pois não houve amplificação dos genes “*nod*”, quando foram utilizados nucleotídeos iniciadores específicos, indicando a ausência de simbiose com esse organismo. Considerando esses achados recentes da literatura sobre essa relatada atividade de controle de ROS das leghemoglobinas e a não presença de organismos simbióticos que justificassem a presença desta proteína exercendo funções simbióticas e, também, o aumento bem pronunciado de SOD e APX nos géis 2D de raízes de feijão-de-corda inoculadas com o nematóide, quando comparadas com os controles, já citados no presente trabalho, bem como outras enzimas anti-estresse oxidativo ensaiadas por Andrade (2003) para o mesmo patossistema, que também tiveram sua atividade aumentada, geram indícios de que a presença dessas Lbs, no nossos ensaios podem estar associadas com o controle da explosão oxidativa, desencadeada pela presença do patógeno. Até hoje, o aumento na expressão de Lb em resposta ao ataque do *M. incognita* nunca foi relatado ocorrer em plantas, muito menos no feijão-de-corda e, sendo, portanto, um relato pioneiro, que precisa ser melhor investigado.

Sobre as proteínas ARG 10 (**TABELA 3, FIGURA 10**) e a Proteína induzida por auxina (**TABELA 3**), que exibiram seus *spots* subexpresso e superexpresso respectivamente. Não foi achada nenhuma menção na literatura sobre suas funções e/ou mecanismos de ação em processos de defesa de planta contra ataque de patógenos, embora, no caso da Proteína induzida por auxina, como o nome sugere, indica que deva estar havendo produção de

auxina. As referências das identidades destas proteínas estão presentes apenas nos bancos de dados do NCBI, tornando inapropriadas eventuais especulações mais aprofundadas. A ARG 10, por estar sendo subexpressa, pode estar servindo apenas como fornecedora de esqueletos carbônicos e /ou fonte de aminoácidos (assim como a asparaginil endopeptidase) para a síntese de outras biomoléculas relacionadas à defesa da planta. Estas proteínas devem ser estudadas com mais afinco para poder correlacioná-las com as possíveis rotas de defesa de plantas contra patógenos, bem como gerar suas primeiras referências literárias.

O fato de que todos os iniciadores (*primers*) testados (Asparaginil endopeptidase, ACC sintase, Cisteinil endopeptidase, Chalcona-flavona isomerase, ARG 10, Ascorbato peroxidase, Superóxido dismutase e leghemoglobina), em análise de PCR semiquantitativa, terem concordado com o perfil de expressão dos seus respectivos *spots* dos géis 2D de raízes de feijão-de-corda (**FIGURAS 9 a 15**), indica que está, realmente, havendo reprogramação genética durante o processo de interação planta-nematóide. Já os iniciadores de quitinases classes I, IIIa, IIIb, que exibiram aumento da expressão nas amostras de raízes inoculadas (**FIGURA 16**) reforçam a idéia da importância das quitinases no processo de defesa da planta que, inclusive, é enaltecido pelo fato de que mais de uma isoforma foi expressa. Não se sabe, ao certo, o motivo pelo qual a banda correspondente à quitinase classe IV (dado não mostrado) não foi visualizada nas amostras controle e inoculadas.

7.4. Géis bidimensionais das mitocôndrias das raízes de feijão-de-corda

Com relação às mitocôndrias, estas são a casa de força das células, onde ocorre a maior produção de ATP, molécula energética utilizada para impulsionar todos os processos metabólicos vitais. Como os mecanismos de defesa dos seres vivos requerem vultuosas cotas de energia, foi tentado, nesse trabalho, analisar se havia reprogramação genética das mitocôndrias para fazer face às novas exigências energéticas da planta. Infelizmente, a presença de BSA no protocolo de purificação das mitocôndrias gerou dificuldades para identificação dos 22 *spots*, cujas expressões foram, significativamente, alteradas (**FIGURA 6**) tanto por espectrometria de massa (MS), como por sequenciamento automático de Edman. A intensidade dos sinais de MS gerados pelos peptídeos foi sempre ofuscada pelos espectros sobrepostos da BSA. Não foi possível eliminar, satisfatoriamente, essas interferências indesejadas por manipulação da programação do próprio espectrômetro de massa. Ainda assim, dos 8 espectros obtidos por MS, apenas 3 espectros se tratavam de proteínas não descritas (*unpredicted proteins*), ficando, então, 5 *spots* com provável identidade conhecida. Um dado interessante foi que 3 *spots*, dentre os 5 com provável identidade, se assemelhavam aos espectros genuinamente bacterianos (**TABELA 4**) o que é perfeitamente aceitável, uma vez que as mitocôndrias são referidas como organelas originárias de bactérias simbiotes (COX e NELSON 2008).

Tratando-se de proteínas de origem mitocondrial, como um todo, é bastante interessante que tenham sido visualizados, inicialmente, apenas *spots*

fortemente superexpressos. As mitocôndrias funcionam como uma organela fundamental para produção de energia e, também, como provedora de esqueletos carbônicos para outras rotas metabólicas celulares (vias anapleróticas) que necessitem, prontamente, de precursores. Esses mecanismos alternativos são alimentados através de vias mitocondriais exclusivas, tais como, por exemplo, o ciclo do ácido cítrico (COX e NELSON 2008). Além disso, quando as células são submetidas a diversos tipos de estresses, sobretudo, diante do ataque de patógenos, as mitocôndrias reagem imediatamente à sinalização desses elicitores de várias maneiras. Uma delas, por exemplo, é aumentando a expressão e a atividade da oxidase alternativa (AOX), mesmo mantendo, parcialmente, a atividade da citocromo c oxidase (COX e NELSON 2008). Essa rota permite que alguns dos subprodutos do ciclo do ácido cítrico sejam também re-direcionados para o fornecimento de precursores orgânicos que serão imediatamente empregados na biossíntese de outras moléculas prioritárias. Isso, indubitavelmente, faz com que haja uma superexpressão e aumento de atividade, também, das enzimas participantes desse ciclo, bem como outras proteínas acessórias, genuinamente mitocondriais, ainda que, concomitantemente, as mitocôndrias permaneçam gerando energia na forma de ATP, utilizando-se da rota clássica da cadeia transportadora de elétrons (CTE). (MCINTOSH *et al.* 1998).

Nos géis 2D de proteínas de mitocôndrias não foram encontrados *spots* correspondentes à oxidase alternativa (AOX), como esperado. É provável que a AOX, sendo transmembranar e tendo grande parte da sua área de superfície acessível (ASA) caráter fortemente hidrofóbico (TAYLOR *et al.* 2009), não

tenha sido convenientemente extraída das mitocôndrias, devido à incompatibilidade com o tampão usado para solubilizar as proteínas dessa organela celular. Neste caso, seria necessário fazer um estudo proteômico apenas de proteínas de membrana com protocolo específico para solubilização de suas proteínas.

A identificação do *spot* 5 e 7 dos géis de mitocôndria sugeriram os mesmos corresponderem às enzimas malato-desidrogenase (*spot* 5; NCBI, gi/63028586) e citocromo c oxidase (*spot* 7; NCBI, gi/4103111) (**TABELA 4**) as quais pertencem ao ciclo do ácido cítrico e CTE, respectivamente, ainda que suas identificação tenha demonstrando baixíssima significância estatística, causada pelos motivos já citados. Os seres vivos, tanto animais como vegetais, demonstram estreita similaridade nas reações mitocondriais frente a estresses adversos, objetivando prover energia e esqueletos carbônicos para biossíntese de moléculas responsivas a variadas agressões (MCINTOSH *et al.* 1998).

Outra proteína mitocondrial, que, como as outras, teve sua expressão aumentada e identificação com baixo escore, foi uma proteína pertencente à família OstA (Organic Solvent Tolerance A, *spot* 3, NCBI gi/283953230) (**TABELA 4**). Esta proteína foi, primeiramente, descrita em bactérias (INOUE e HORIKOSHI, 1989; AONO *et al.*, 1994) e tem como principal função aumentar a tolerância desses microorganismos a solventes orgânicos hidrofílicos que, dependendo da concentração, pode danificar, irreversivelmente, a membrana celular, afetando assim, a integridade funcional e estrutural da célula como um todo (CHIU *et al.* 2007). Recentemente, foram descobertas proteínas com propriedades semelhantes em mitocôndrias e cloroplastos, o que reforça ainda

mais a idéia da origem simbiótica dessas organelas eucarióticas (TOMMASSEN, 2010). Mesmo que já esteja bem estabelecida a relação dessa proteína para amenizar possíveis danos causados, eventualmente, por estresses abióticos (presença de solventes orgânicos) em bactérias, não há nada que relacione a presença e/ou aparecimento dessas proteínas em mitocôndrias de plantas com seus mecanismos de defesa contra patógenos (estresses bióticos).

O *spot* 6 de amostras mitocondriais oriundas de raízes do cv. CE-31, inoculadas com o *M. incognita*, cuja expressão foi aumentada e identidade, com baixa confiabilidade, resolvida, corresponde, provavelmente, a um Fator de alongamento mitocondrial (NCBI, gi/15220073), (**TABELA 4**). Estes fatores se associam ao complexo aminoacil-tRNA, auxiliando no seu correto transporte ao sítio de síntese no ribossomo, o sítio aminoacil (sítio A). Esta proteína pertence a uma classe de moléculas que são bem conhecidas como fatores indispensáveis para a síntese protéica (COX e NELSON, 2008). Uma vez que houve aumento de, pelo menos, 22 *spots* protéicos de origem mitocondrial de raízes do CE-31 inoculado com o nematóide, em comparação com plantas controles, não-inoculadas, isso denota que houve aumento pronunciado na síntese protéica como um todo, o que justificaria o aumento da expressão do gene desse fator de alongamento mitocondrial, devido sua relação com a síntese protéica.

Resumidamente, esses dados de análise proteômica das mitocôndrias de raízes do CE-31, inoculadas com o nematóide das galhas *M. incognita*, raça 3, que mostram o aumento de expressão de, pelo menos, 22 proteínas,

sugerem que esse estresse biótico leva a célula a acionar essas organelas a prover mais energia (ATP) e arcabouços moleculares para biossíntese de moléculas relacionadas, direta ou indiretamente, com as vias de resposta ao estresse imposto a planta, suprimindo as necessidades celulares nesse momento adverso.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a resposta de defesa do feijão-de-corda à infecção pelo nematóide das galhas, *M. incognita*, é complexa e envolve muitas proteínas e rotas metabólicas diversas. Mostra, ainda, que essa abordagem proteômica para a relação incompatível entre feijão-de-corda x *M. incognita*, única, até agora, na literatura, para esse patossistema, se constitui numa ferramenta poderosa, como ponto de partida, para guiar estudos que auxiliem na elucidação das moléculas e vias metabólicas envolvidas com a resistência do cultivar CE-31 à meloidoginose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, P., FAVERY, B., ROSSO, M. N., CASTAGNONE-SERENO, P. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Mol. Plant Pathol.** v. 4, p. 217-24, 2003.

AD, P., GOUZY, P., AURY, J., SERENO, P. C., DANCHIN, E. G. J., DELEURY, E., BARBEOCH, L. P., ANTHOUARD, E., ARTIGUENAVE, F. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature biotechninology.** v. 26, p. 909-915, 2008.

AFZAL, A. J., NATARAJAN, A., SAINI, M. S., IQBAL, M. J., GEISLER, M., SHEMY, H. A., MUNGUR, R., WILLMITZER, L., LIGHTFOOT, D. A. The nematode resistance allele at the *rhg1* locus alters the proteome and primary metabolism of soybean roots. **Plant Physiology**, v. 151, p. 1264-1280, 2009.

ANDRADE, N. C. Resistência do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood: Aspectos Anatômicos, Bioquímicos e Moleculares. **Tese de doutorado**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, 151 pp., 2003.

AGHAEI, K., AKBAR, A., KOMATSU, S. Proteome analysis of potato under salt stress. **Journal of Proteome Resarch**, v.17, p. 111 – 123, 2008.

AGRAWAL, A. A. Macroevolution of plant defense strategies. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, p. 103-109, 2007.

AONO, R., NEGISHI, T., NAKAJIMA, H. Cloning of organic solvent tolerance gene *ostA* that determines n-hexane tolerance level in *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, p.4624–4626, 1994.

ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress response. **Plant Science**. v. 172, p.876-887, 2007.

ARIMURA, G. H, KOST, C., BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1734, p. 91– 111, 2005.

ASSAD, M. L. L., ALMEIDA, J. Agricultura e sustentabilidade: contexto, desafios e cenários. **Ciência & Ambiente**. v. 29 p.15-30. 2004.

ATKINSON, H. J., URWIN, P. E., McPHERSON, M. J. Engineering plants for nematode resistance. **Annual Review Phytopatology**, v. 41, p. 615-639, 2003.

AZARKAN, M., DIBIANI, R., BAULARD, C., BAEYENS-VOLANT, D. Effects of mechanical wounding on *Carica papaya* cysteine endopeptidases accumulation and

activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38, p. 216–224, 2006.

BAICHEVA, O., SALKOVA, D., PALAZOVA, G. Root-knot nematodes (*Meloidogyne*, Goeldi, 1887) - species composition, pathogenicity, some problems for investigation. **Experimental Pathology and Parasitology**, v. 5, n. 10, p. 21-24, 2002.

BACK, M., CLAASSEN, M., AEBERSOLD, R. Comprehensive proteomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 1-6, 2010.

BARRETO, A. L. H. Expressão de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e ao mecanismo de defesa do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] aos fungos *Colletotricum lindemuthianum* e *Colletotricum gloeosporioides*. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Ceará - UFC, 2005.

BELLAFIORE, S., SHEN, Z., ROSSO, M. N., ABAD, P. SHIH, P. BRIGGS, S. P. Direct identification of the meloidogyne incognita secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. **PLoS Pathogens**, v. 4, p. 1-12, 2008.

BERNSTEIN, N., SHORESH, M., XU, Y., HUANG, B. Involvement of the plant antioxidative response in the differential growth sensitivity to salinity of leaves vs roots during cell development. **Free Radical Biology & Medicine**, v.49, p. 1161 – 1171, 2010.

BHATE, R. H., RAMASARMA, T. Evidence for H₂O₂ as the product of reduction of oxygen by alternative oxidase in mitochondria from potato tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 486, p. 165-169, 2009.

BINDER, M. B. The ethylene receptors: Complex perception for a simple gas. **Plant Science**, v. 175, p. 8-17, 2008.

BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, p. 873-907, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 2, p. 248-254, 1976.

BRANCH, C., HWANG, C. F., NAVARRE, D. A., WILLIAMSON, V. M. Salicylic Acid Is Part of the *Mi-1*-Mediated Defense Response to Root-Knot Nematode in Tomato. **The American Phytopathological Society**. v. 17, p. 351–356, 2004.

BYKOVA, N. V., EGSGAARD, H. MØLLER, I. M. Identification of 14 new phosphoproteins involved in important plant mitochondrial processes. **FEBS Letters**. V. 540, p. 141-146, 2003.

BYRD, A. F., The inducement of giant cells by *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**. v. 8, p. 1-10, 1983.

CAILLAUD, M.C., DUBREUIL, G., QUENTIN, M., PERFUS-BARBEOCH, L., LECOMTE, P., ENGLER, J. A., ABAD, P., ROSSO, M.N., FAVERY, B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**. v. 165, p. 104-113, 2008.

CAMPBELL, P. M. Comparison of the mitochondrial proteomes of phosphine-susceptible and resistant *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**, v 46, p 197-201, 2010.

CANDIANO, G., BRUSCHI, M., MUSANTE, L., SANTUCCI, L., GHIGGERI, G.M., CARNEMOLLA, B., ORECCHIA, P., ZARDI, L., RIGHETTI, P. G., Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CAPISTRANO, G. G. G., Análise comparativa de genótipos de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] quanto ao grau de infestação com *Meloidogyne incógnita* (Kofoid & White) Chitwood (raça 3); Prospecção de marcadores moleculares de resistência através de RAPD. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, 52 p., 2004.

CASTILLEJO, M. A., CURTO, M., FONDEVILLA, S., RUBIALES, D., JORRIN, J. V. Two dimensional electrophoresis based proteomic analysis of the pea (*Pisum sativum*) in response to *Mycosphaarella pinodes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 12822 – 12832, 2010.

CHANG, C., SHOCKEY, J. The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 352-358, 1999.

CHANG, P. A Simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, p. 113-116, 1993.

CHEN, F., LI, Q. H. E. Z. Proteomic analysis of rice plasma membrane-associated proteins in response to chitooligosaccharide elicitors. **Journal of Integrative Plant Biology**. v. 49, p. 863–870, 2007.

CHIU, H. C., LIN, T. L., WANG, J. T. identification and characterization of an organic solvent tolerance gene in *Helicobacter pylori*. **Journal compilation Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter**, v. 12, p. 74–81, 2007.

COLE, A. B., KIRÁLY, L., LESLIE, C. L., WIGGINS, B. E., ROSS, K., SCHOELZ, J. E. Temporal expression of PR-1 and enhanced mature plant resistance to virus infection is controlled by a single dominant gene in a new nicotiana hybrid. **The American Phytopathological Society**. v. 17, p. 976-985, 2004.

COSTA J.H., HASENFRATZ-SAUDER M-P., PHAM-THI A.T., SILVA LIMA M.G., DIZENGREMEL P., JOLIVET Y., FERNANDES DE MELO D. Identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. of two cDNAs encoding mitochondrial alternative oxidase orthologous to soybean alternative oxidase genes *2a* and *2b*. **Plant Science**. v. 167, p. 233-239, 2004.

COX, M. M., NELSON, D. L., Princípios de Bioquímica. 4ª Ed. São Paulo. SARVIER, p. 1202, 2008.

DAKORA, F. D. A functional relationship between leghaemoglobin and nitrogenase based on novel measurements of the two proteins in legume root nodules. **Annals of Botany** , v. 75, p. 49-54, 1995.

DAKORA, F.D., PHILLIPS, D.A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments **Plant Soil**, v. 245, p. 35–47, 2002.

DALTON, J.P., BRINDLEY, P., J., DONNELLY, S., ROBINSON, M. W. The enigmatic asparaginyl endopeptidase of helminth parasites. **TRENDS in Parasitology**. v. 25, 2007.

DATTA, S. K., THUKRISHNAN, S. **Pathogenesis-Related Proteins in Plants**. Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida , 1999.

DAS, S., DEMASON, D. A., EHLERS, J. D., CLOSE, T. J., ROBERTS, P. A. Histological characterization of root-knot nematode resistance in cowpea and its relation to reactive oxygen species modulation. **Journal of Experimental Botany**. v. 59, p. 1305-1313, 2008.

DAS, S., EHLERS, J. D., CLOSE, T. J., ROBERTS, P. A. Transcriptional profile of root-knot nematode induced feeding sites in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using a soybean genome array. **BMC genomics**. v. 11, p. 480-496, 2010.

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

DAVIS, E.L., HUSSEY, R.S., MITCHUM, M. G., BAUM, T.J. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. **Plant Biology**. v.11, p. 1-7, 2008.

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

EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. **Plant Physiology**, v. 31, p. 105-124, 2005.

EHLERS, J. D., HALL, A.E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) **Filed Crops Research**. v. 53, p. 187-204, 1997.

EHLERS, J.D., MATTHEWS, W.C., HALL, A.E., ROBERTS, P.A. Breeding and evaluation of cowpeas with high levels of broad-based resistance to root-knot nematodes, in: C.A. Fatokun, S.A. Tarawali, B.B. Singh, P.M. Kormawa, M. Tamo (Eds.), Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. **Proceedings of the World Cowpea Conference III held at the International Institute of Tropical Agriculture (IITA)**, Nigeria, Ibadan, pp. 41–51, 2002.

EITAS, T. K., DANGL, J. L. NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners and pathways. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 13, p. 1-6, 2010.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. Disponível em <http://www.cpatu.embrapa.br/novidades_caupi.htm. Acesso dia 10 ago. 2010.

FERY, R. L., DUKES, P. D. Inheritance of root-knot nematode resistance in cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **J Am Soc Hortic Sci**. v. 105, p. 671-674, 1980.

FERY, R.L. New Opportunities in *Vigna*. Trends in New Crops and New Users. J. Janick and A. Whipkey, (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA. 2002.

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

FOSTER, G.D., TWELL, D. Plant Gene Isolation. Principles and Practice. **Jonh Wiley & Sons Ltd.** p. 426, 1996.

FRANKOWSKI, K., KESY, J., WOJCIECHOWSKI, W., KOPCEWICZ, J. Light- and IAA-regulated ACCsynthase gene (PnACS) from *Pharbitis nil* and its possible role n IAA-mediated flower inhibition. **Journal of plant physiology**, v. 166, p. 192-202, 2009.

FREIRE-FILHO., F.R., LIMA, J.A.A., RIBEIRO, V.Q. Feijão-caupi: Avanços tecnológicos. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 519 p. 2005.

FREITAS, L. G., OLIVEIRA, R. D. L., FERRAZ, S. **Introdução à nematologia** UFV Viçosa, 1999.

GAIGE, A. R., AYELLA, A., SHUAI, B. Methyl jasmonate and ethylene induce partial resistance in *Medicago truncatula* against the charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 74, p. 412-418, 2010.

GACHOMO, E.W., SHONUKAN, O.O., KOTCHONI, S.O. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. **African Journal of Biothechnology**. v. 2, p. 26-32, 2003.

GARROCHO-VILLEGAS, V., GOPALASUBRAMANIAM, S. K., ARREDONDO-PETER, R. Plant hemoglobins: What we know six decades after their Discovery. **Gene**. v. 398, p.78-85, 2007.

GERMANI, G., PLENCHETE, C. Potential of *Crotalaria* species as green manure crops for the management of pathogenic nematodes and beneficial mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v. 266, p. 333-342, 2004.

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

GIANINAZZI, S.; MARTIN, C.; VALLÉE, J. C. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. **Comptes Rendus des Seances de L'Academie des Sciences. Serie D, Sciences Naturelles**. v. 270, p. 2383-2386, 1970.

GONDIM, D. M. F. Bases bioquímicas da interação do Cajueiro Anão Precoce (*Anacardium occidentale* L.) com o fungo *Lasiodiplodia theobromae* causador da Resinose. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Ceará - UFC, 2010.

GÖRG, A., OBERMAIER, C., BOGUTH, G., HARDER, A., SCHEIBE, B., WILDGRUBER, R., WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21, p. 1037-1053, 2000.

GRUDKOWSKA, M., ZAGDAŃSKA, B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, p. 609-624, 2004.

GUERENA, M.; EARLES, R.,. Alternative nematode control. **ATTRA - National Sustainable Agriculture Information Service**. p. 1-16. 2003. www.attra.ncat.org. Acessado em 10/05 /2011.

GUPTA, A. K., Origin of agriculture and domestication of plants and animals linked to early Holocene climate amelioration. **Current Science**. v. 87, n. 1, p. 54-59, 2004.

GUST, A. A., BRUNNER, F., NÜRNBERGER, T. Biotechnological concepts for improving plant innate immunity. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 21, p. 204-210, 2010.

HARUTYUNYAN, E. H., SAFONOVA, T. N., KURANOVA, I. P., POPOV, A. N., TEPLYAKOV, A. V., OBMOLOVA, G. V., VAINSHTEIN, B. K., DODSON, G. G., WILSON, J. C. The binding of carbon monoxide and nitric oxide to leghaemoglobin in comparison with other haemoglobins. **J. Mol. Biol.** v. 264, p. 152–161, 1996.

HASE, S., PELT, J. A. V., LOON, L.C. V., PIETERSE, C. M. J. Colonization of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas fluorescens* primes the plant to produce higher levels of ethylene upon pathogen infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, p. 219-266, 2003.

HELM, R., SCHIMID, M., HIERL, G., TERNEUS, K., TAN, L., LOTTSPEICH, F., GIETL, C. KDEL-tailed cysteine endopeptidases involved in programmed cell death, intercalation of new cells, and dismantling of extensin scaffolds. **American Journal of Botany**, v. 95, p. 1049–1062, 2008.

HOAGLAND, D. R., ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **Calif. Agric Exp. Stn. Univ. Calif. Berckley Circ.** v. 374, p. 139, 1950.

HOY, J. A., HARGROVE, M. S. The structure and function of plant hemoglobins. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 46, p. 371-379, 2008.

HUCKELHOVEN, R., DECHERT, C., TRUJILLO, V., KOGEL, K.H. Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. **Plant Mol. Biol**, v. 47, p. 739–748, 2001.

HUSSEY, R. S., DAVIS, E. L., BAUM, T. J. Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 14, n. 3, p. 183-194, 2002.

INOUE A, HORIKOSHI K. A *Pseudomonas putida* thrives in high concentration of toluene. **Nature**, v. 338, p 264–266, 1989.

JAVED, N., GOWEN, S. R., INAUM-UL-HAQ, M., ANWAR, S. A. Protective and curative effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations on the development of root-knot nematode *meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. **Crop Protection**. v. 26, p. 530-534, 2008.

JONES D. A., TAKEMOTO D. Plant Innate Immunity – Direct And Indirect Recognition Of General And Specific Pathogen-Associated Molecules. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p .48-62, 2004.

JUNQUEIRA, A., SPIRINB, V., BALBUENAA, T. S., THOMASA, H. and coworkers. Protein identification pipeline for the homology-driven proteomics. **Journal of proteomics**. v. 71, , p. 345-356, 2008.

JWA, N., AGRAWAL, G. K., TAMOGAMI, S., YONEKURA, M., HAN, O., IWAHASHI, H., RAKWAL, R. Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 261-273, 2006.

KATAM, R., BASHA, S. M., SURAVAJHALA, P., PECHAN, T. Analysis of peanut leaf proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2236-2254, 2010.

KLINK, V. P., HOSSEINI, P., MATSYE, P. D., ALKHAROUF, N. W., MATTHEWS, B. F. Syncytium gene expression in *Glycine max*_[PI 88788] roots undergoing a resistant reaction to the parasitic nematode *Heterodera glycines*. **Plant physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 176-193, 2010.

KRUGER, E. Uma abordagem sistêmica da atual crise ambiental. **Desenvolvimento e Meio Ambiente** v. 4, p. 37-43, 2001.

KULATHINGAL, J., KO, L., CUSACK, B., YEN, S. Proteomic profiling of phosphoproteins and glycoproteins responsive to wild-type alpha-synuclein accumulation and aggregation **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins & Proteomics**. v. 1794, p. 211-224, 2009.

KUMAR, D., KLESSIG, D. F. Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. **Molecular Plant Microbe Interact.** v. 13, p. 347–351, 2000.

KUNKEL, B. N., BROOKS, D. M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 325-331, 2002.

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

LAMBERT, K. N., FERRIE, B. J., NOMBELA, G., BRENNER, E. D., WILLIAMSOM, V. M. Identification of genes whose transcripts accumulate rapidly in tomato after root-knot nematode infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 341-348, 1999.

LANDRY, S.J., GIERASCH, L.M. Polypeptide interactions with molecular chaperones and their relationship to in vivo protein folding. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 23,p. 645-669, 1995.

LEE, S. H., AHSAN, N., LEE, K. W., KIM, D. H., LEE, D. G., KWAK, S. S., KWON, S. Y., KIM, T. H., LEE, B. H. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1626—1638, 2007.

LEROY, Q., RAOULT, D. Review of microarray studies for host-intracellular pathogen interactions. **Journal of the Microbiological Methods**. V. 81, p. 81-95, 2010.

LIEBOLD, B. W., GRAACK, H., POHL, T. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics**. v. 6, p. 4688-4703, 2006.

LILLEY, K. S., FRIEDMAN, D.B. Difference gel electrophoresis DIGE **Drug Discovery Today: Technologies**, v 3, p. 347-353, 2006.

LIPKA, V., PANSTRUGA, R. Dynamic cellular response in plant-microbe interaction. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 625-631, 2005.

LOON, L. C. V., GERAATS, B. P. J., LINTHORST, H. J. M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. **TRENDS in Plant Science**, v. 11, p. 1360-1385, 2006.

MAKOI, J.H.J.R., BELANE, A. K., CHIMPHANGO, S. B. M., DAKORA, F. D. Seed flavonoids and anthocyanins as markers of enhanced plant defence in nodulated cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp.) **Field Crops Research**, v. 118, p. 21-27, 2010.

MCINTOSH, L., EICHLER, T., GRAY, G., MAXWELL, D., NICKELS, R., WANG, Y. Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v 1365, p. 278-284, 1998.

MEIRELES, K.G.X **Identificação de proteínas expressas na região cambial de *Eucalyptus grandis*, por espectrometria de massas**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia), Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba – SP, 2006.

MERRIL, C. R., SWITZER, R. C., VAN KEUREN, M. L. **Proc. Natl. Acad. Sci.** V. 76, p. 4335-4340. 1979.

MILLAR, A. H., SWEETLOVE, L. J., GIEGÉ, P., LEAVER, C. J. Analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome. **Plant Physiology**, v. 127, p.1711-1727, 2001.

MILLER, F. P., After 10.000 years of agriculture, whithin agronomy?. **Agronomy Journal**. v. 100, 2008.

MOLINARI, S., LOFFREDO, E. The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, p. 69–78, 2006.

MÖNCH, K. T., COWLAND, J., BORREGAARD, N. Profiling of gene expression in individual hematopoietic cells by global mRNA amplifications and slot blot analysis. **Journal of Immunological Methods**, v. 252, p. 175-189, 2001.

MOREAU, S., PUPPO, A., DAVIES, J. D. the reactivity of ascorbate with different redox states of leghaemoglobin. **Phytochemistry**, V. 39, p. 1281- 1286, 1995.

NDAKIDEMI, P.A., DAKORA, F.D. Legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signals and protectants in early seedling development. **Plant Biology**, v. 30, p. 729–745, 2003.

NEUBERGER, M. Preparation of plant mitochondria, criteria for assesement of mitochondrial integrity and purity, survival *in vitro*. **Plant Cell Respiration**. Springer-Verlag, Berlin, pp 7-24, 1985.

OKA, Y., CHET, I., e SPIEGEL, Y.. Are pathogenesis-related proteins induced by *Meloidogyne javanica* or *Heterodera avenae* invasion? **Journal of Nematology**, v. 29, p. 501-508. 1997.

OKAMOTO, T., MIURA, I. Y., ISHII, S., MINAMIKAWA, T. Asparaginyl endopeptidase in developing and germinating legume seeds: immunological detection and quantitation. **Plant Science**, v. 115, p.49-57, 1996.

ONG, S.E., MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature Chemical Biology**, v.1, p.253-262. 2005.

OWEN, K. J., GREEN, C. D., DEVERALL, B. J. A benzothiadiazole applied to foliage reduces development and egg deposition by *Meloidogyne* spp. in glasshouse-grown grapevine roots. **Australasian Plant Pathology**, v. 31, p. 47-53. 2002.

PEARSALL, D.M., From foraging to planting. **Science** , v. 313, p. 173-174, 2006.

PÉREZ, J.A.L., STRANGE, M. E., KALOSHIAN, I., PLOEG, A. T. Differential response of Mi gene-resistant tomato rootstocks to root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). **Crop Protection**, v. 25, p. 382–388, 2006.

PETRILLO, M.D., ROBERTS, P.A. Fitness of Virulent *Meloidogyne incognita* isolates on susceptible and resistant cowpea. **J. Nematol.** v. 37, p. 457-466, 2005.

PETRILLO, M.D., MATTHEWS, W.C., ROBERTS, P.A. Dynamics of *Meloidogyne incognita* virulence to resistance genes *Rk* and *Rk2* in cowpea. **J. Nematol.** v. 38, p. 90-96, 2006.

POTENZA, C., THOMAS, S. H., Genes induced during early response to *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible alfalfa cultivars. **Plant Science**, v. 161, p. 289-299, 2001.

PUPPO, A., DAVIES, M. J., The reactivity of thiol compounds with different redox states of leghaemoglobin: evidence for competing reduction and addition pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1246, p. 74-81, 2005.

QUIRINO, B. F., CANDIDO, E. S., CAMPOS, P. F., FRANCO, O. L., KRÜGER, R. H. Proteomics approaches to study plant-pathogen interactions. **Phytochemistry**, v. 71, p. 351-362, 2010.

RAJAKUMARI, S., RAJASEKHARAN, R., DAUM, G. Triacylglycerol lipases of yeast and plants: more than just hydrolases. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 160, p.7, 2009.

RIGHETTI, P. G., GIANAZZA, E., GELFI, C., CHIARI, M., SINHA, P. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients. **Analytical Chemistry**. v 61, p. 1602-1612, 1989.

ROBERTS, P.A., MATTHEWS, W.C., EHLERS, J.D. New resistance to virulent root-knot nematodes linked to the *Rk* locus of cowpea. **Crop Sci.** v. 36, p. 889-894, 1996.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.E., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SANTANA, C. G., ANDRADE, R. V., SARAIVA, M. A. P., SILVA, F.R., BRASILEIRO, A. C. GOSSI DE SÁ, M. F., MEHTA, A. Análise da expressão gênica diferencial de *Vigna unguiculata* (Feijão Caupi) infectada com *Meloidogyne incognita*. **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento**, v. 209, ISSN, 1676-340, EMBRAPA, 2007.

SARITA, S., SHARMA, P. K., PRIEFER, U. B., PRELL, J. Direct amplification of rhizobial nodC sequences from soil total DNA and comparison to nodC diversity of root nodule isolates. **FEMS Microbiology Ecology.** v. 54, p. 1-11, 2005.

SAROWAR, R., KIM, E. N., KIM, Y. J., OK, S. H., KIM, K. D., HWANG, B. K., SHIN, J. S. Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens. **Plant science**, v. 169, p. 55-63, 2005.

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

SAWADOGO, A., THIO, S., KIEMDE, I., DRABO, C., DABIRE, J., OUEDRAOGO, T. R., MULLENS, J. D., EHLERS, P. A. Distribution and prevalence of parasitic nematodes of cowpea (*Vigna unguiculata*) in Burkina Faso. **J. Nematol.** V. 41, p. 120-127, 2009.

SCHENK, P. M., KAZAN, K., WILSON, I., ANDERSON, J. P., RICHMOND, T., SOMERVILLE, S. C., MANNERS, J. M. Coordinated plant defence responses in Arabidopsis revealed by cDNA microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 11655–11660, 2000.

SHI, F., YAMAMOTO, R., SHIMAMURA, S., HIRAGA, S., NAKAYAMA, N., NAKAMURA, T., YUKAWA, K., HACHINOHE, M., MATSUMOTO, H., KOMATSU, S. Cytosolic ascorbate peroxidase 2 (cAPX 2) is involved in the soybean response to flooding. **Phytochemistry**, v. 69, p. 129-1303, 2008.

SHINSHI, H. Ethylene-regulated transcription and crosstalk with jasmonic acid. **Plant Science**, v. 175, p. 18-23, 2008.

SCHULZE W. X. e USADEL B. Quantitation in Mass-Spectrometry-Based Proteomics. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 61, p. 491–516, 2010.

SONG, J. D., KIM, J. H., LEE, D. H., RHEW, T. H., CHO, S. H., LEE, C. H. Developmental regulation of the expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase genes in hypocotyls of etiolated mung bean seedlings. **Plant science**, v. 168, p. 1149-1155, 2005.

SONIN, M. D. PR-Proteins in plants infested with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) Chitwood 1949. *Doklady Biological Sciences*. v. 379, p. 393–395, 2001.

SUCKAU, D., RESEMANN, A., SCHUERENBERG, M., HUFNAGEL, P., FRANZEN, J., HOLLE, A. A novel MALDI-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, p. 952-965, 2003.

TAYLOR, N. L., TAN, Y., JACOBY, R. P., MILLAR, A. H. Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. **Journal of Proteomics**, v 72, p 367-378, 2009.

THIEL, J., ROLLETSCHKE, H., FRIEDEL, S., LUNN, J. E., NGUYEN, T. H., FEIL, R., TSCHIRSCH, H., MÜLLER, M., BORISJUK, L. Seed-specific elevation of non-symbiotic hemoglobin AtHb1: beneficial effects and underlying molecular networks in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**. v. 11, p. 1-18, 2011.

TIMPERIO, A.M., EGIDI, M.G., ZOLLA, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). **Journal of Proteomics**, v.714, p. 391-411, 2008.

TOMMASSEN, J. Assembly of outer-membrane proteins in bacteria and mitochondria. **Microbiology**, v. 156, p. 2587–2596, 2010.

VANDERSPOOL, M.C., KAPLAN, D.T., McCOLLUM, T.G. WODZINSKI, R.J. Partial characterization of cytosolic superoxide dismutase activity in the interaction of *Meloidogyne incognita* with two cultivars of *Glycine max*. **Journal of Nematology**, v. 26, p. 422-429, 1994.

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

VAN LOON L.C., REP M., PIETERSE C.M.J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135-62, 2006.

.VENTELON-DEBOUT, M., DELALANDE, F., BRIZARD, J.P., DIEMER, H., DORSSELAER, A.V., BRUGIDOU, C. Proteome analysis of cultivar-specific deregulations of *Oryza sativa indica* and *O. sativa japonica* cellular suspensions undergoing Rice yellow mottle virus infection. **Proteomics**, v. 4, p. 216–25, 2004.

VOLOUDAKIS, A. E., MARMEY, P., DELANNOY, E., JALLOUL, A., MARTINEZ, C., NICOLE, M. Molecular cloning and characterization of *Gossypium hirsutum* superoxide dismutase genes during cotton–*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* interaction. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, p. 119–127, 2006.

VERONESE, P., RUIZ, M.T., COCA, M.A., HERNANDEZ-LOPEZ, A., LEE, H., IBE, J.I., DAMSZ, B., PARDO, J.M., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, M., NARASIMHAN, M. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. **Plant Physiology**, v.131, p. 1.580–1.590, 2003.

WILLIAMSON, V. M., GLEASON, C. Plant-nematode interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 327-333, 2003.

XIE, C., WANG, D., YANG, X. Protein Extraction Methods Compatible with Proteomic Analysis for the Cotton Seedling. **Crop Science**, v.49, p. 395-402, 2009.

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

YOSHIKAWA, M., TAKEUCHI, Y., HORINO, O. A mechanism for ethylene- induced disease resistance in soybean: enhanced synthesis of an elicitor-releasing factor, β -

1,3-endoglucanase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**,v.37,p.367-376,1990.

ZHANG, X. D., CALLAHAN, F. E., MA, J. N. J. D., KARACA, M., SUKUMAR S., CREECH, R. G. A novel root-specific gene, MIC-3, with increased expression in nematode-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.) after root-knot nematode infection. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1576, p. 214–218, 2002.

ZHANG, Q., RIECHERS D.E. Proteomics: an emerging technology for Weed Sci Research. **Weed Sci**. v. 56, p. 306–313, 2008.