



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

HUDSON FERNANDO NUNES MOURA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DA INTERAÇÃO
INCOMPATÍVEL ENTRE O FEIJÃO-DE-CORDA E O
FITOPATÓGENO *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. &
Sacc.**

FORTALEZA – CEARÁ

2013

HUDSON FERNANDO NUNES MOURA

Análise Proteômica Diferencial da Interação Incompatível entre o Feijão-de-corda e o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

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

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

FORTALEZA – CEARÁ

2013

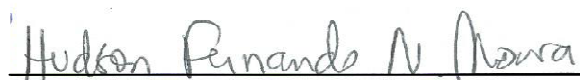
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- M886a Moura, Hudson Fernando Nunes.
Análise proteômica diferencial da interação incompatível entre o feijão-de-corda e o fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. / Hudson Fernando Nunes Moura. – 2013.
107. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Bioquímica vegetal.
Orientação: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.
1. Feijão. 2. Fitopatologia. 3. Bioquímica vegetal. I. Título.

CDD 574.192

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

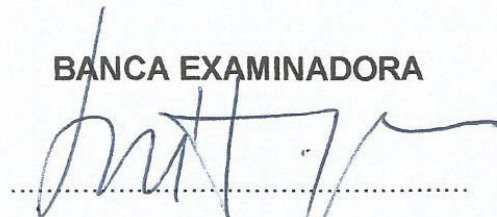
A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida, desde que seja feito de acordo com as normas de ética científica.



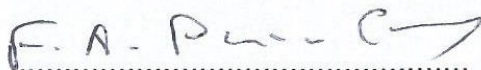
Hudson Fernando Nunes Moura

Dissertação aprovada em: 16 de Agosto de 2013.

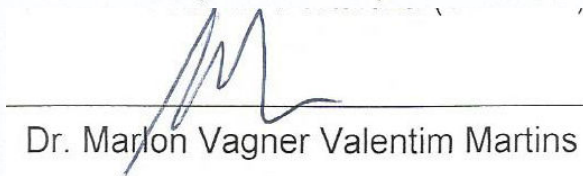
BANCA EXAMINADORA



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



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



EMBRAPA
(Examinador)

AGRADECIMENTOS

Ao amado **Deus**, em quem creio piamente, e ponho toda a minha confiança. Pela proteção em todas as horas e pela força nos momentos de fraqueza e limitações.

Ao meu querido Orientador, **Prof. PhD José Tadeu Abreu de Oliveira**, pela criteriosa orientação e por estar sempre comprometido com a realização desse trabalho e com a formação profissional e humana dos seus estudantes. Por ser um exemplo de cientista ético e um ser humano incrível! Sempre serei seu fã e jamais esquecerei os seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Francisco Paiva Campos, por ser um exemplo de pesquisador, e por estar sempre solícito em colaborar com o aprendizado dos seus alunos. Agradeço também pela grande colaboração na avaliação deste trabalho.

Ao Dr. Marlon Valentim pela pronta aceitação em participar da avaliação deste trabalho.

Ao Laboratório de Análises Proteômicas, da Universidade de Fortaleza, coordenado pela professora Dra. Ana Cristina Moreira, pelas análises de espectrometria de massas. Em especial à Marina Duarte pelo apoio durante os experimentos.

Ao Laboratório de Fisiologia Animal – UFC, coordenado pelo Prof. Dr. Arlindo Moura, pelo apoio durante a análise proteômica, em especial ao Eduardo, Alethéia, Maurício, Érika e Verônica.

Ao Laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA Agroindústria Tropical pelo apoio durante a recuperação da virulência do patógeno. Em especial ao Dr. Emilson e seus estudantes Joilson, Francisco, Glauber e Gustavo.

Ao Laboratório de Toxinas Vegetais, coordenado pela Prof. Dra. Ilka Vasconcelos, pelo apoio. Em especial à Marina, Raquel, Henrique, Vanessa e Helen. Agradeço também ao Lucas por ter me incentivado a vir passar férias em Fortaleza durante esses dois anos.

Sem formalidades, agradeço à minha família de todos os dias, os amigos que sempre farão parte da minha vida, aqueles que sempre sentirei muitas saudades e que foram imprescindíveis para que esse momento pudesse se concretizar: Clídia Moreira, Rodolpho Guedes, Aline Cipriano, Ana Luíza Paiva, Anna Lídia Varela, Iara Flávia, Tatiane Chaves e Felipe Fernandes.

À **Clídia Moreira**, minha maninha, a quem agradeço a convivência e confiança de todos os dias, pela sua amizade preciosa e eterna e, principalmente, pela confiança recíproca. Sou admirador da sua competência, garra e esforço.

À **Aline Cipriano**, minha companheira de bancada, por ser um exemplo de dedicação e compromisso, além de ser uma pessoa incrível e indescritível. Juntos dividimos os bons e os maus resultados, alegrias e tristezas.

À **Ana Luíza Paiva**: “*Amigos, pra sempre, bons amigos que nasceram pela fé!*”. Pela palavra amiga de todos os dias, pelo abraço apertado e o carinho de sempre.

À **Anna Lídia Varela**, amor à primeira vista! Pela excelente convivência, conversas duradouras e pelas risadas que só nós entendemos.

À **Iara Flávia**, pelo carinho sempre demonstrado, pelas maravilhosas tardes de sábado no Laboratório e pelos excelentes momentos de diálogo.

Aos amigos **Tatiane Chaves e Felipe Fernandes**, pela amizade e pelo apoio em todos os momentos. Verdadeiros amigos que conquistei fora do Laboratório.

Ao meu melhor amigo, **Rodolpho Guedes**, por estar sempre presente, por me ajudar a aliviar o fardo das preocupações e me ensinar a enxergar diversas situações de maneira menos estressante. Além de ter contribuído bastante com a conclusão deste trabalho, com o auxílio de Clídia Moreira e Aline Cipriano.

Agradeço à **Ana Karla Moreira**, pela amizade, carinho e momentos de descontração.

Às amigas **Raissa Bret e Juliana Rodrigues** pela excelente convivência, pelo carinho sempre demonstrado, e pelos momentos de entretenimento que tornaram minha rotina mais agradável.

Ao amigo **Fredy Davi**, pelas duradouras discussões científicas, pela amizade e solicitude sempre demonstradas e por comungarmos dos mesmos ideais científicos.

Aos demais colegas do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, pelo apoio e auxílio na realização deste trabalho: Handerson, Pedro, Acrísio, Roberta e Thiago, em especial à Dra. Alexandra, pelo carinho de sempre, e à Dra. Darcy Mayra pela amizade e excelentes dicas científicas.

Aos meus amigos de Teresina-PI que sempre estiveram presentes e me deram muita força pra chegar até aqui: Williame, Patrícia, Franciana, Clarisse, Sammya, Railson, Elenice e Laylla.

Ao **Wêsley William**, pelo companheirismo e por estar sempre presente nos momentos que mais precisei. Essa dissertação também tem os seus esforços.

Por fim, à melhor família do mundo, aquela que Deus me deu a honra de nascer; meu porto seguro! Agradeço aos meus pais **Raimundo Moura e Socorro Nunes** por todo o amor, zelo, cabelos brancos e por sempre acreditarem que eu devia ir além!

Aos meus irmãos **Rayfran, Handerson e Karinne**, os grandes amores da minha vida, agradeço o carinho e a força em todos os momentos, pela palavra amiga e pelo incentivo.

Aos meus avós, tios e primos, em especial aos tios **Karina, Marina e Nunez** e à minha madrinha **Irma Moura**, pela confiança, pelo incentivo e por sempre acreditarem no meu esforço.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (**DBBM-UFC**).

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.

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

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**FUNCAP**), 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

O feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] pertence à família *Fabaceae* e é bastante utilizado na alimentação humana como fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais. Dentre as principais características do feijão-de-corda, seu elevado conteúdo proteico e a 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. Entretanto, apesar da considerável 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 se destacam os fungos como maiores causadores de patologias desta cultura, a exemplo da Antracnose, resultado da infecção por *C. gloeosporioides*, caracterizada por manchas marrom-avermelhadas nas nervuras foliares que podem se prolongar por todos os órgãos da planta hospedeira. Felizmente, o feijão-de-corda possui cultivares que apresentam características diferenciadas de resistência, frente ao *C. gloeosporioides*, no que concerne à ativação das defesas da planta em interações ditas incompatíveis, haja vista que o patógeno não consegue deliberar a infecção. Partindo dessa premissa, é válido mencionar que grande parte dos mecanismos de resistência de plantas aos patógenos está relacionada com a expressão gênica diferencial de proteínas que funcionariam como marcadores de defesa em resposta à infecção. Nesse sentido, esse estudo propõe a análise proteômica diferencial da interação incompatível (resistência) entre plantas de feijão-de-corda, genótipo BR3, e o isolado LPVD-1, do fungo *C. gloeosporioides* a fim de identificar possíveis marcadores proteicos determinantes da resistência para esse patossistema. Por meio da utilização da abordagem Eletroforese Bidimensional em combinação com Espectrometria de Massas ESI-Q-TOF MS/MS, foram identificadas 118 proteínas diferencialmente expressas, considerando proteínas superexpressas (102) e subexpressas (16), envolvidas em diversos processos celulares, tais como: Metabolismo energético, fotossíntese, metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, resposta ao estresse, transporte celular, homeostase redox, sinalização e defesa, com destaque para expressão das proteínas PR-10 (relacionada à patogênese), Remorina e Ascorbato peroxidase que apresentaram alterações significativas em todos os tempos experimentais testados. Esses achados demonstram a complexidade dos mecanismos envolvidos durante a resistência vegetal e auxiliam no direcionamento dos programas de melhoramento genético dessa cultura frente ao ataque de fungos. Além de favorecerem o entendimento das interconexões bioquímicas e fisiológicas que decorrem da interação incompatível planta-fungo.

Palavras-chave: Feijão-de-corda; Antracnose; Proteômica; Resistência;

ABSTRACT

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] belongs to the family Fabaceae and is widely used in food as a source of protein, carbohydrates, vitamins and minerals. Among the main features of cowpea, its high protein content and good tolerance to conditions of low water availability in soils, high temperatures and relative tolerance to salinity conditions typical of semi-arid regions of northeastern Brazil, are some of which can be cited. However, despite the considerable capacity of tolerance to different stress conditions, the productivity of cowpea is threatened by the action of various pathogens, among which stand out as major causes of fungal diseases of this crop, the example of Anthracnose as a result of infection by *C. gloeosporioides*, characterized by reddish-brown spots on the leaf veins that can be extended by all organs of the host plant. Fortunately, the cowpea has cultivars that have different characteristics of resistance against *C. gloeosporioides*, regarding the activation of plant defenses in incompatible interactions said, given that the pathogen is unable to resolve the infection. From this premise, it is worth mentioning that most of the mechanisms of plant resistance to pathogens is related to the differential gene expression of proteins that act as markers of defense in response to infection. Thus, this study proposes a differential proteomic analysis of the incompatible interaction (resistance) between plants of cowpea genotype BR3, and isolated LPVD-1, the fungus *C. gloeosporioides* in order to identify potential protein markers for the determinants of this resistance pathosystem. By using the approach 2D-PAGE in addition with mass spectrometry ESI-Q-TOF MS / MS, we have identified 118 differentially expressed proteins, whereas proteins overexpressed (102) and down-expressed (16), involved in various cellular processes, such as : energy metabolism, photosynthesis, protein and nucleic acids metabolism, stress response, cellular transport, redox homeostasis, signaling and defense, with emphasis on expression of PR-10 proteins (pathogenesis-related), remorina and ascorbate peroxidase that had significant alterations at all time points tested. These findings demonstrate the complexity of the mechanisms involved in plant resistance and assist in directing the programs of genetic improvement of this crop against fungal attack. Furthermore, it's promoting the understanding of the biochemical and physiological interconnections arising from incompatible plant-fungus interaction.

Key-words: Cowpea; Anthracnose; Proteomics; Resistance.

LISTA DE FIGURAS

| | PÁGINA | |
|-----------------|--|----|
| Figura 1 | Interação planta-patógeno e desenvolvimento da resistência à doença | 22 |
| Figura 2 | Plantio e aclimação do Feijão-de-corda resistente (genótipo BR3), para inoculação posterior do fungo <i>C. gloeosporioides</i> (isolado LPVD-1) e análise proteômica. | 39 |
| Figura 3 | Recuperação da virulência do fungo <i>C. gloeosporioides</i> em vagens e folhas de feijão-de-corda. | 40 |
| Figura 4 | Inoculação de esporos de <i>C. gloeosporioides</i> (isolado LPVD-1) em folhas de feijão-de-corda resistente (genótipo BR3). | 41 |
| Figura 5 | Teor de proteínas solúveis totais referentes aos métodos de extração de proteínas para a análise proteômica. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) entre os métodos testados. | 48 |
| Figura 6 | Comparação dos perfis de proteínas foliares do genótipo BR3 de <i>Vigna unguiculata</i> L. Walp. obtidos a partir dos métodos descritos no texto. 400 μ g de proteínas foram focalizados em <i>strips</i> de 13 cm com gradiente linear de pH imobilizado na faixa 3-10 e, então, separados por SDS-PAGE (12,5%). A imagem também mostra o número de <i>spots</i> totais para cada mapa bidimensional. | 49 |
| Figura 7 | Aspecto macro- e microscópico de folhas de plantas de feijão-de-corda 8 dias após a inoculação com <i>C. gloeosporioides</i> (isolado LPVD-1). (A) Desenvolvimento da doença durante a interação compatível entre o fungo e as plantas TE-97. (B) Interação incompatível entre plantas BR3 e o patógeno. Em ambas as figuras são evidenciadas as | 51 |

estruturas do patógeno. CN – conídio germinado; TG – tubo de germinação; AP – apressório; HF – hifa. Coloração feita com lactofenol azul de anilina. Barra: 20 μ m.

- Figura 8** Aspecto macro- e microscópico de folhas de feijão-de-corda, genótipo BR-3, resistente, inoculadas com o *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1). Esquerda – folhas inoculadas, mas sem os sintomas característicos da antracnose. Direita – Presença das estruturas fúngicas detectadas ao microscópio óptico, onde são vistos conídios germinados (CN); tubo de germinação (TG); e apressórios (AP), conforme mostrado na figura 7. Para a microscopia, as folhas foram despigmentadas e coradas com 0,05% de azul de anilina em lactofenol. Barra: 20 μ m. 52
- Figura 9** Teor de proteínas totais solúveis para os grupos Controle e Cg (inoculado) ao longo de cada tempo experimental. O valor de cada barra representa a média aritmética das três amostras experimentais. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). 53
- Figura 10** Perfil bidimensional das proteínas foliares do feijão-de-corda, genótipo BR-3, referentes aos grupos Controle e Cg (Inoculado com o isolado LPVD-1 do fungo *C. gloeosporioides*). Cada imagem é representativa de um conjunto 3 géis. Amostras de 400 μ g de proteínas foram resolvidas em strips IPG pH 3-10 (13 cm), gradiente linear e, em seguida, separados SDS-PAGE (12,5%). Os géis foram corados com CBB coloidal. As setas indicam os spots diferencialmente expressos em cada tempo experimental. Setas marcadas nos géis referentes ao grupo controle representam. 54
- Figura 11** Número total de spots para os grupos Controle e Cg referentes a cada tempo (h). Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) tanto entre os 55

tempos experimentais quanto entre os grupos (Controle e Cg).

- Figura 12** Total de *spots* diferenciais entre os tempos experimentais. A – Diagrama mostrando sobreposições entre o número de proteínas diferencialmente expressas identificadas por MS em cada tempo experimental (24, 48 e 72 horas após inoculação). B – Mudanças no padrão de expressão das proteínas com expressão diferencial em todos os tempos. 67
- Figura 13** Classificação das proteínas identificadas, após MS/MS e buscas no NCBI, quanto aos processos biológicos e localização celular, destacando a expressão diferencial ao longo do tempo. Barras em cinza claro representam as proteínas subexpressas; barras escuras representam proteínas superexpressas em decorrência da inoculação do fungo. 69
- Figura 14** Modulação do estresse oxidativo em plantas de feijão-decorda, em decorrência da inoculação do genótipo BR-3 com o isolado LPVD-1 de *C. gloeosporioides*, por comparação entre o padrão de expressão diferencial de proteínas envolvidas com a formação e remoção de H₂O₂ e a determinação quantitativa de H₂O₂. A – Expressão diferencial de proteínas formadoras e removedoras de H₂O₂ em plantas inoculadas. B – Determinação quantitativa de H₂O₂ para cada tempo experimental. Legenda: Superóxido dismutase dependente do íon Ferro (Fe-SOD); Superóxido dismutase dependente dos íons cobre e zinco (Cu/Zn-SOD); Ascorbato peroxidase (APX citosólica); Peroxirredoxina 2E (PRXIIIE); Peroxidase aniônica (POX aniônica). Barras indicam desvio padrão; Letras diferentes representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as médias. 72

Figura 15 Abundância relativa e Expressão diferencial de proteínas relacionadas com a defesa contra fungos. A – Proteínas envolvidas diretamente em mecanismos de resistência à infecção fúngica: Quitinase II; Proteína relacionada à patogênese (PR-10); Peroxidase – isoforma aniônica (POX); Protease cisteínica (PC). B – Proteínas que conferem resistência contra fungos de forma indireta: Proteína ligante a RNA rica em glicina (GRP); Aleno óxido sintase (AOS); Remorina; Glicolato oxidase (GOX);

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabela 1 Principais culturas agronômicas atacadas por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . | 28 |
| Tabela 2 Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-de-corda, genótipo BR3, após inoculação com o isolado LPVD-1 de <i>C. gloeosporioides</i> , após análise por MS/MS e buscas no NCBI. | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| 2D-PAGE | Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida |
| PEG | Poliétileno glicol |
| PVPP | Polivinilpirrolidona |
| EDTA | Ácido Etileno diaminotetracético |
| DTT | Ditiotreitol |
| TFA | Ácido Trifluoracético |
| CHAPS | 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane sulfonate |
| IEF | Focalização isoeletrica |
| IPG | Gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida |
| PMSF | Fluoreto de Fenilmetilsulfonil |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| HAI | Horas Após a Inoculação |
| ACN | Acetonitrila |
| MS | Espectrometria de Massas |
| UPLC | Sistema de Cromatografia Líquida de Ultraperformance |
| ESI | Ionização por Eletrospray |

SUMÁRIO

| | Página |
|--|-----------|
| RESUMO | VII |
| ABSTRACT | VIII |
| LISTA DE FIGURAS | IX |
| LISTA DE TABELAS | XIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | XIV |
| INTRODUÇÃO | |
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 Mecanismos de Defesa de Plantas..... | 18 |
| 1.2 Feijão-de-corda | 25 |
| 1.3 Antracnose em plantas de feijão-de-corda | 27 |
| 1.4 Marcadores proteicos envolvidos na interação Planta-fungo..... | 30 |
| 1.5 Justificativa | 33 |
| HIPÓTESE E OBJETIVOS | |
| 2. HIPÓTESE E OBJETIVOS | 35 |
| 2.1 HIPÓTESE | 35 |
| 2.2 OBJETIVOS | 35 |
| 2.2.1 Objetivo Geral | 35 |
| 2.2.2 Objetivos específicos | 35 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 36 |
| 3.1 Reagentes | 36 |
| 3.2 Materiais Biológicos | 36 |
| 3.2.1 Coletotrichum gloeosporioides | 36 |
| 3.2.2 Feijão-de-corda | 36 |
| 3.3 Metodologia experimental | 37 |
| 3.3.1 Preparo do Inóculo | 37 |
| 3.3.2 Inoculação do Patógeno e Coleta das Folhas | 38 |
| 3.3.3 Microscopia óptica | 41 |
| 3.3.4 Determinação Quantitativa do Teor de Peróxido de Hidrogênio | 42 |

| | |
|---|----|
| 3.3.5 Definição do Protocolo de Extração de Proteínas Foliaves para a Análise Proteômica | 42 |
| 3.3.5.1 Método 1: Precipitação das Proteínas com TCA/Acetona/2 β -ME | 42 |
| 3.3.5.2 Método 2: Extração com solução Fenol saturada com Tris pH 8,0 | 43 |
| 3.3.5.3 Método 3: Extração de Proteínas com tampão Tris-HCl | 44 |
| 3.3.5.4 Método 4: Fracionamento das Proteínas Totais com Polietileno Glicol (PEG) | 44 |
| 3.3.6 Dosagem de Proteínas | 44 |
| 3.3.7 Análise proteômica das folhas de feijão-de-corda, cv. BR-3, nas condições controle e inoculado com o fungo | 45 |
| 3.3.8 Processamento dos spots, Espectrometria de massas e Identificação das proteínas de interesse | 46 |
| 3.3.9 Análise Estatística | 47 |

RESULTADOS

| | |
|--|----|
| 4. RESULTADOS | 48 |
| 4.1 Protocolo de Extração de Proteínas Foliaves de Feijão-de-corda para Análise Proteômica | 48 |
| 4.2 Progressão da interação incompatível entre o genótipo BR-3 e <i>C. gloeosporioides</i>, avaliada por Microscopia óptica | 50 |
| 4.3 Proteoma foliar de feijão-de-corda, genótipo BR-3, nas condições controle e inoculado com o fungo <i>C. gloeosporioides</i> | 53 |

DISCUSSÃO

| | |
|---|----|
| 5. DISCUSSÃO | 74 |
| 5.1 Interação Incompatível entre feijão-de-corda e <i>C. gloeosporioides</i> | 74 |
| 5.2 Extração de Proteínas de Folha de feijão-de-corda Utilizando Solução Tampão Tris-fenol pH 8,0 | 76 |
| 5.3 Mudanças no Proteoma Foliar de feijão-de-corda durante a interação incompatível | 77 |
| 5.3.1 Proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-de-corda após o contato com o fungo | 78 |
| 5.3.1.1 <i>Mudanças no Metabolismo energético e Fotossíntese durante a interação incompatível</i> | 80 |
| 5.3.1.2 <i>Efeitos no Metabolismo de Proteínas e Resposta ao Stress</i> | 83 |

| | |
|--|----|
| 5.3.1.3 Modulação da Homeostase Redox durante a interação incompatível . | 88 |
| 5.3.1.4 Proteínas envolvidas na defesa e resistência à doença | 91 |

CONSIDERAÇÕES FINAIS

| | |
|-------------------------------|----|
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 94 |
|-------------------------------|----|

REFERÊNCIAS

| | |
|-------------------|----|
| REFERÊNCIAS | 95 |
|-------------------|----|

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mecanismos de Defesa de Plantas

Durante a evolução biológica, as plantas desenvolveram mecanismos diferenciados de defesa contra diversos tipos de patógenos, como vírus, bactérias, fungos e nematóides. Quando tais mecanismos são acionados, resultam em respostas de defesa rápidas e efetivas (Gururani *et al.*, 2012), evitando a infecção e disseminação da doença.

A efetividade dos mecanismos de defesa das plantas se deve à interação contínua com microrganismos patogênicos. Porém, na maioria dos casos as defesas constitutivas são suficientes para prevenir a doença. A presença de barreiras físicas, como a cutícula e a parede celular, e a geração de metabólitos secundários tóxicos são, geralmente, suficientes para bloquear as tentativas de infecção por um agressor potencial. Qualquer patógeno capaz de suplantar tais barreiras é então confrontado com a capacidade de reconhecimento de moléculas não próprias, sinalizando a ativação das vias de defesa (Hok *et al.*, 2010).

Apesar da multiplicidade de respostas da planta frente à infecção, os fitopatógenos são capazes de destruir a célula hospedeira antes que uma reação de defesa possa ser acionada, além de serem especializados em evitar a elicitação de mecanismos de resistência da planta.

A resistência de plantas às doenças é cultivar-específica, ou seja, determinado espécime de microrganismo é incapaz de deliberar a infecção frente aos mecanismos de resistência de um hospedeiro específico. Apesar desse tipo de interação, pode haver suscetibilidade de outra cultivar da mesma espécie vegetal frente à infecção por esse espécime patogênico. Além disso, quando a planta entra em contato com um agente patogênico potencial, os mecanismos de resistência podem ser elicitados, mesmo que o microrganismo não cause qualquer lesão aparente à planta (Heath, 2000; Gururani *et al.*, 2012).

Durante a interação planta-patógeno, a resistência à doença está associada à dinâmica de resposta do sistema imune inato das plantas, que é conceitualmente

dividido em duas linhas de defesa: A imunidade acionada por PAMPs ou MAMPs (do Inglês: *Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns*) ou padrões moleculares associados aos patógenos/microrganismos, denominada PTI (do Inglês: *Pattern Triggered Immunity*) ou imunidade induzida por PAMPs), e a imunidade acionada pelo reconhecimento de moléculas efetoras do patógeno, ETI (do Inglês: *Effector Triggered Immunity*) ou imunidade induzida por efetores (Jones & Dangl, 2006).

A característica central da imunidade inata é a capacidade de reconhecer e responder aos patógenos potenciais de maneira sensível e específica. Nos vegetais, a imunidade acionada por PAMPs/MAMPs se dá após o reconhecimento desses padrões pelos PRRs, receptores de reconhecimento de padrões (Dempsey & Klessig, 2012) que acionam eventos intracelulares que justificam a especificidade da resposta frente à tentativa de infecção.

Esses eventos incluem sinalização mediada pelo íon cálcio e explosão oxidativa, mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como a ativação de diferentes proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPKs), que induzem a reprogramação transcricional de genes de defesa (Boller & Felix, 2009; Nicaise *et al.*, 2009).

A maioria dos receptores de reconhecimento de PAMPs/MAMPs (PRRs) pertence à família RLK (do Inglês: *receptor-like kinase*, ou proteínas receptoras do tipo quinase), que contêm repetições ricas em leucina (do Inglês Leucine-Rich Repeat - LRR). Esses receptores extracelulares reconhecem esses padrões moleculares característicos e comuns de patógenos/microrganismos (PAMPs ou MAMPs), que são estruturas conservadas evolutivamente ao longo das gerações (Newman *et al.*, 2013), sendo essenciais para os microrganismos.

As respostas de defesa induzidas por PAMPs/MAMPs incluem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), alterações na parede celular das plantas, indução de compostos antimicrobianos e a síntese de proteínas relacionadas com a patogênese (PR) (Newman *et al.*, 2013). Esses eventos refletem a interação dinâmica entre hospedeiro e patógeno e sugerem que a PTI é uma importante força motriz inicial na

“corrida armamentista” evolucionária entre plantas e seus patógenos (Coll *et al.*, 2011).

Os patógenos podem ser divididos em relação à forma de obtenção de nutrientes a partir dos tecidos vegetais. Os patógenos necrotróficos desencadeiam a morte dos tecidos do hospedeiro e se alimentam desses tecidos mortos, enquanto os biotróficos infectam tecidos vivos e não deliberam a morte do hospedeiro. A resistência mediada por genes R consiste de uma resposta primária principalmente frente à biotrofia (McClung, 2011). Patógenos hemibiotróficos alternam as duas formas de nutrição durante o processo de infecção e colonização da planta.

Por outro lado, a fim de superar a PTI e estabelecer uma relação compatível com a planta, os fitopatógenos produzem moléculas efetoras, codificadas por genes específicos, que suprimem a imunidade da planta. Esses efetores provocam mudanças fisiológicas no hospedeiro, favorecendo a colonização e o estabelecimento da doença (Hammond-Kosack, 2007).

Assim, durante a evolução, as plantas desenvolveram uma resposta imune que é baseada na percepção desses efetores de avirulência do patógeno, denominados proteínas Avr, que quando são reconhecidas pelas proteínas R, codificadas por genes R do hospedeiro, acionam respostas de defesa que limitam a proliferação do patógeno. Esse reconhecimento efetivado pelas proteínas R da planta ativa a via ETI, ou imunidade acionada por efetores (Rafiqi, 2012).

O sistema de reconhecimento desses efetores foi proposto por Flor (1955), sendo denominada hipótese gene-a-gene. Essa hipótese preconiza que, para que a planta seja resistente a um patógeno específico, existe a necessidade de reconhecimento do produto do gene do patógeno, designado Avr, pelo produto de um gene de resistência (gene R) do hospedeiro. O estabelecimento da doença é o resultado da inativação ou perda de um ou ambos os genes.

As proteínas R mais estudadas são receptores intracelulares contendo sítios de ligação a nucleotídeos (NBS) e domínios ricos em leucina (LRR). Ambos podem reconhecer proteínas efetoras direta ou indiretamente e ativar mecanismos consistentes de defesa que culminam na morte celular localizada (Coll, *et al.*, 2011).

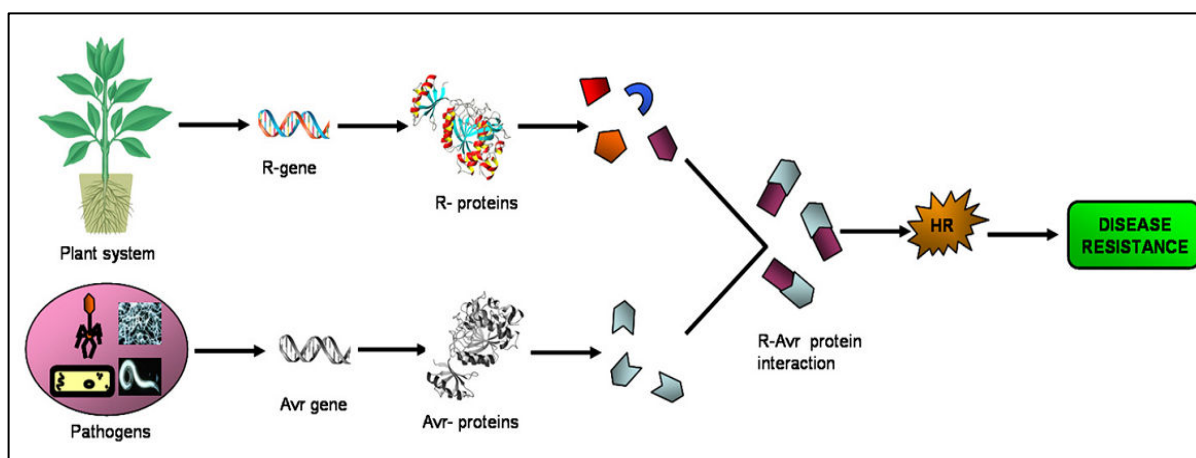
A resistência ativada pelas proteínas R, que reconhecem os efetores do patógeno, normalmente denota certa especificidade, sendo, por exemplo, específica para uma determinada *formae speciales* fúngica ou *patovar* bacteriano. Nesse sentido, a resistência só será efetiva se a molécula efetora do patógeno for reconhecida por uma proteína R da planta, também específica (Heath, 2000; Dempsey & Klessig, 2012).

Os domínios proteicos LRR são as regiões mais importantes para o reconhecimento dos efetores e estão presentes na maioria das proteínas R (Jones, 2001). As maiores classes de proteínas R incluem proteínas citoplasmáticas contendo o sítio de ligação a nucleotídeos (NBS), o domínio rico em leucinas (LRR) na porção C-terminal e um domínio CC (*coiled coil*) na extremidade N-terminal, além de proteínas que possuem os domínios NBS e LRR, mas diferem quanto à porção N-terminal contendo um domínio que apresenta similaridade ao receptor de interleucina 1, tipo *toll*, encontrado em mamíferos, domínio TIR (Gururani, *et al.*, 2012).

A resposta mediada pelas proteínas R resulta na reação hipersensitiva (HR), que é uma forma de morte celular programada. A cascata de sinalização para ativação da HR ocorre quando um gene de resistência à doença reconhece um efector apropriado ou por um indutor das respostas de defesa da planta reconhecido por um receptor específico, conforme ilustrado na Figura 1 (Gururani, *et al.*, 2012).

Qualquer um destes sinais, acompanhados por outros fatores como o influxo de íons cálcio do espaço extracelular e/ou fluxo de ânions, resulta no processo de explosão oxidativa, que culmina na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de genes de defesa, finalmente resultando no desenvolvimento de resistência a certa doença, não só nos locais da tentativa de infecção da planta pelo patógeno, mas, também, resistência sistêmica (Yang *et al.*, 1997).

Figura 1. Interação planta-patógeno e desenvolvimento da resistência à doença (Fonte: Gururani, *et al.*, 2012).



A resposta hipersensitiva está tipicamente associada com a morte celular programada das células infectadas e produção de moléculas antimicrobianas, como fitoalexinas (Mazid *et al.*, 2011), assim como a ação das enzimas hidrolíticas quitinase e β -1,3-glucanase ao redor do tecido infectado, desencadeando uma resistência local frente à infecção. Essa estratégia de defesa é efetiva contra vírus, bactérias e fungos, bem como contra nematóides que se alimentam de células vivas (Iakimova *et al.*, 2012; Spoel & Dong, 2012; Mandadi & Scholthof, 2013).

No que concerne aos tipos patogênicos, a HR pode ser observada nas plantas durante as interações com patógenos (hemi) biotróficos e necrotróficos, no entanto, está ligado, principalmente, com a imunidade frente à (hemi) biotrofia, visto que tais patógenos se alimentam do tecido hospedeiro vivo. Nesse sentido, a morte celular no local do ataque do patógeno funciona como um componente de defesa eficaz visando restringir o crescimento patogênico e o desenvolvimento da doença (Kuzniac, *et al.*, 2013).

Durante a resposta hipersensitiva, a contribuição individual de cada elemento efetor (ROS, fitoalexinas etc.) depende, largamente, da especificidade do patossistema e do ambiente onde ocorre a interação. A morte celular programada (PCD) é um processo que envolve um componente genético, que responde aos estímulos ambientais, sendo uma característica que tem sido conservada durante a evolução devido à sua essencialidade ao desenvolvimento e sobrevivência das plantas (Iakimova, *et al.*, 2012).

Morfologicamente, a HR é um tipo específico e único de morte celular restrita a microregiões da planta, ou sítios de tentativa de infecção pelo patógeno. As suas características, incluem retração citoplasmática, condensação da cromatina, e hiperplasia mitocondrial, combinada com outros eventos específicos, tais como vacuolização e rompimento do cloroplasto durante as fases finais (Mur *et al.*, 2008).

O cloroplasto tem um papel central nas respostas de defesa e HR em plantas por constituir uma fonte importante de moléculas de sinalização para a defesa, tais como as espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) e hormônios de defesa como ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (JA) (Coll, *et al.*, 2011).

A indução de eventos de defesa desencadeada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenha papéis cruciais em vias importantes nas células vegetais, incluindo a morte celular programada (PCD). Acionando os sistemas de produção e detoxificação de ROS, as plantas podem transmitir informações acerca das mudanças nas condições ambientais, incluindo o ataque de patógenos. O estresse oxidativo e a via de sinalização redox são comumente associados à resposta a estresses, bem como reguladores-chaves da adaptação de plantas aos mesmos (Pinto *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2012; Kuzniak, *et al.*, 2013).

A imunidade acionada por efetores do patógeno (ETI), reconhecidos pela planta, é eficaz em combater a doença, haja vista desencadear a HR e o processo de morte celular programada (PCD) no sítio de tentativa de infecção, mediando uma resposta imune local, e acionar respostas de defesa em todos os órgãos da planta, não somente contra o patógeno que lhe deu origem, mas imunidade a uma ampla gama de patógenos, caracterizando um mecanismo de proteção denominado de Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) (Spoel & Dong, 2012).

Na SAR, há ativação da expressão gênica de proteínas específicas, bem como de proteínas enzimáticas catalisadoras de reações de rotas metabólicas envolvidas com a resistência, ocorrendo tanto no sítio de infecção quanto em locais distantes na planta atacada. É caracterizada pela expressão de proteínas relacionadas à patogênese (PR – proteínas), a síntese de fitoalexinas e outros compostos fenólicos de resistência e lignificação da parede celular, dentre outros eventos (Durrant & Dong, 2004).

Dentre os mecanismos moleculares que delineiam a SAR, a expressão de PR-proteínas tem um papel importante na defesa natural ou resistência das plantas contra patógenos. PR-proteínas são agrupadas em 17 famílias e podem ser definidas como proteínas ausentes ou presentes em pequenas quantidades em plantas saudáveis, mas capazes de acumular-se em maiores quantidades após o ataque de um patógeno ou contato da planta com estruturas oriundas desses organismos (Van Loon, 2006).

De modo geral, as PR-proteínas exercem dois mecanismos de ação na defesa vegetal. O primeiro é o bloqueio direto do desenvolvimento patogênico, por ações variadas, e o segundo é liberar elicitores não específicos a partir dos patógenos, ativando, rapidamente, as defesas da planta. A indução destas proteínas é descrita como um dos principais eventos de defesa contra fungos fitopatogênicos, embora as funções de muitas PR-proteínas ainda não estejam completamente elucidadas (Hammerschmidt, 1999; Ferreira *et al.*, 2007).

Ao longo de décadas, vários estudos têm-se concentrado nas vias de sinalização para a indução de SAR, que exigem o acúmulo endógeno do hormônio vegetal ácido salicílico (SA). O ácido salicílico é um importante componente da via de sinalização, tanto da defesa local, sendo envolvido com a morte celular por meio do estresse oxidativo, quanto na resistência sistêmica adquirida (An & Mou, 2011).

O Ácido Salicílico participa das respostas de defesa por controlar a ativação da proteína NPR1 (do Inglês: *non-expressor of pathogenesis-related genes 1*) por meio das proteínas NPR3 e NPR4, que são sensíveis a hormônios. Ao ser translocada do citoplasma para o núcleo, NPR1 ativa a expressão de genes de defesa (Gust & Nurnberger, 2012).

Além do Ácido Salicílico, hormônios como o Ácido Jasmônico (JA) e Etileno (ET) desempenham importantes papéis na defesa de plantas. A via do Ácido Salicílico é efetiva em mediar a resistência contra patógenos biotróficos, enquanto a sinalização via Ácido Jasmônico-Etileno é primariamente induzida em resposta à herbivoria e ao ataque de patógenos necrotróficos (Glazebrook, 2005).

Essas duas vias são antagônicas: elevada resistência à biotrofia está frequentemente correlacionada à suscetibilidade frente aos patógenos necrotróficos.

Em contrapartida, a resistência a patógenos necrotróficos favorece a suscetibilidade à biotrofia em decorrência das respostas acionadas por reguladores positivos e negativos que modulam o antagonismo SA-JA (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Além dos hormônios citados, têm-se discutido o papel de outros fitormônios como sinais para a resistência a doença. Giberelinas, Ácido Abscísico, Auxinas, Brassinosteróides e Citocininas também podem atuar, tanto isoladamente, quanto de forma sinérgica ou antagônica, como moduladores importantes para as resposta de defesa por intermédio da regulação de elementos (proteínas e fatores de transcrição) que funcionam como componentes reguladores positivos e negativos da expressão de genes responsivos a esses hormônios (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

Por fim, é válido pontuar que a diversidade de mecanismos de defesa de plantas, frente ao ataque de uma infinidade de agressores, constitui um amplo espectro de pesquisas no contexto da Bioquímica e Fisiologia de plantas. Nesse sentido, uma compreensão detalhada dos eventos bioquímicos e moleculares envolvidos nas interações planta-patógeno favorece o entendimento e a manipulação de tais mecanismos em estudos com plantas cultivadas, considerando a obtenção de resultados que embasem a transformação de plantas para a resistência à doença.

1.2 Feijão-de-corda

O Feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], também conhecido como feijão-caupi, apresenta grande importância socioeconômica e desempenha papel fundamental na produção agrícola, além de ser uma das principais fontes de minerais e proteínas da alimentação humana (Andrade, 2010). É uma Dicotiledônea pertencente à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolinae*, gênero *Vigna* e espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Sellschop, 1962).

Constitui um produto da horticultura tradicional comum, sendo uma das culturas de leguminosas mais importantes em regiões tropicais. Apresenta tolerância à seca, ao clima quente, alta luminosidade e é bem adaptado às regiões onde há escassez de chuvas, onde outros legumes não se desenvolvem. As folhas de feijão-de-corda são uma excelente fonte de micronutrientes (como folatos e minerais) para a dieta humana, pois fornecem uma fonte abundante de minerais, tais como cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na), potássio (K), fósforo (P), ferro (Fe), o zinco (Zn), manganês (Mn), cobre (Cu) e selênio (Se), minerais que desempenham papéis importantes na fisiologia do organismo (FAO/WHO, 2004; Wawire *et al.*, 2012).

O Feijão-de-corda é nativo da África e é amplamente cultivado nas regiões tropicais dos continentes africano, asiático e americano (Soares *et al.*, 2006). Foi introduzido no Brasil no século XVI pelos colonizadores portugueses, no estado da Bahia e, posteriormente, expandiu-se para outros estados (Freire-Filho *et al.*, 2005).

O Brasil ocupa a terceira posição no ranking dos maiores produtores mundiais de feijão-de-corda, com área e produção de 1.409.417 hectares e 495.313 toneladas, respectivamente (IBGE, 2008). A produção se concentra, principalmente, nas regiões Norte e Nordeste, onde o consumo de feijão representa uma tradição, tratando-se de um componente essencial de vários pratos típicos (Andrade, 2010).

A região Nordeste compreende, aproximadamente, 60% da área total cultivada de feijão, sendo o estado do Ceará o maior produtor (IBGE, 2008). A produção aproximada de feijão-de-corda para a safra 2011/2012 no Estado do Ceará, com base nos acompanhamento de safra, pelas as entidades que acompanham o setor agrícola no Estado, aponta para uma produção de 307,8 mil toneladas de grãos, dentro de uma área plantada de 616,1 mil hectares e uma produtividade média de 499 (kg/ha) (Lima, 2012).

Atualmente, a produção encontra-se em franca expansão na região Centro-Oeste onde grandes produtores da região estão adotando o cultivo do feijão-de-corda, devido ao seu baixo custo de produção e notável importância nutricional dos grãos (Freire-Filho *et al.*, 2008).

Nesse sentido, cabe ressaltar os impactos positivos atribuídos à qualidade nutricional dos grãos de feijão-de-corda para a saúde do consumidor. Frota e

colaboradores (2008) discutem que tal leguminosa constitui importante fonte de proteínas (23 a 25%, em média) e carboidratos, destacando-se pelo alto teor de fibras alimentares, vitaminas e minerais, além de possuir maior quantidade de ácidos graxos insaturados frente aos saturados. Na dieta, o feijão, além de aumentar a quantidade de proteínas, também contribui para melhorar sua qualidade, quando a fonte proteica da dieta constitui-se de leguminosas e cereais.

De fato, o feijão-de-corda é uma cultura de destaque primoroso na economia nacional e do Nordeste brasileiro, haja vista o amplo significado socioeconômico que representa, constituindo-se num dos principais componentes da dieta alimentar, nas zonas rural e urbana, gerando emprego e renda para milhares de pessoas (Silva, 2012).

Tal importância decorre, também, da grande plasticidade da cultura durante a cadeia produtiva, adaptando-se bem a diferentes condições ambientais, como baixa disponibilidade de água nos solos, altas temperaturas, alta luminosidade e relativa tolerância à salinidade, condições típicas das regiões semi-áridas do nordeste do Brasil, além da alta capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, por meio de simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* (Silva, 2007).

Apesar da facilidade de adaptação a diversos tipos de estresses abióticos e bióticos, a cultura de feijão-de-corda é, frequentemente, desafiada pelo ataque de patógenos que causam danos à integridade das plantas e perdas irreparáveis que afetam diretamente a produção e a comercialização das sementes.

Dentre os fitopatógenos que atacam tal cultura, estão os vírus, as bactérias e os nematóides, mas os fungos destacam-se como propiciadores de grandes perdas da produtividade, considerando a grande diversidade de organismos catalogados nesses grupos, bem como a versátil capacidade que esses seres têm de suplantar as defesas das plantas e estabelecer a infecção de forma sistêmica.

1.3 Antracnose em plantas de feijão-de-corda

Os fungos estão entre os maiores causadores de perdas econômicas, em relação aos outros patógenos que infectam o feijão-de-corda (Barreto, 2007). Isso

ocorre devido ao curto ciclo de vida que se completa na planta, a habilidade de infectar todos os órgãos do vegetal e a grande capacidade de mutação, em decorrência de pressões seletivas do ambiente.

Nesse contexto, se discute a importância dos fungos do gênero *Colletotrichum* considerando o interesse agrônomo associado a esse grupo, o que impulsiona o incentivo às pesquisas referentes ao estudo das interações planta-patógeno e do manejo e controle de tais invasores nas lavouras. O gênero *Colletotrichum* engloba várias espécies, incluindo *C. dematium*, *C. destructivum*, *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum*, que são conhecidas por causarem a antracnose em diversas espécies vegetais. A tabela 1 ilustra exemplos de culturas importantes atacadas pelo fungo *C. gloeosporioides*, espécie utilizada nesse estudo.

Tabela 1. Algumas culturas agrônomicas atacadas por *Colletotrichum gloeosporioides*.

| Isolados | Culturas afetadas | Órgãos vegetais infectados | Patologia | Referências |
|----------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|---|
| CCJ 21 | <i>Anacardium occidentale</i> | Folhas, caules, flores, pseudofrutos | Antracnose | Cardoso, 2002; Freire, 2003; Silva, 2011. |
| TE97 | <i>Vigna unguiculata</i> [L. Walp] | Caules, folhas | Antracnose | Barreto, 2007 |
| 63 | <i>Caryca papaya</i> | Frutos, pecíolo | Antracnose | Andrade <i>et. al.</i> , 2007 |
| MF01 | <i>Capsicum anuum</i> L. | Caules, folhas e frutos | Antracnose | Harp <i>et. al.</i> , 2008 |
| C-917 | <i>Mangifera indica</i> L. | Frutos | Antracnose | Martínez <i>et. al.</i> , 2009 |
| 699 | <i>Citrus latifolia</i> | Flores | Antracnose | Sanabria <i>et. al.</i> , 2010 |
| WY01 | <i>Fragaria ananassa</i> Duch. | Folhas e Frutos | Antracnose | Xie <i>et. al.</i> , 2010 |
| IS2 | <i>Coffea arabica</i> | Folhas | Mancha manteigosa | Armesto <i>et. al.</i> , 2012 |

A Antracnose é o nome comum dado à doença causada por várias espécies do fungo filamentoso do gênero *Colletotrichum*, que é a forma imperfeita do gênero *Glomerella*. É um fungo de extrema importância por causar muitas perdas em culturas das regiões tropicais do mundo, afetando muitas espécies de plantas, como: cereais, herbáceas, leguminosas, ornamentais e fruteiras (Silva, 2011); provocando sintomas em toda a parte aérea da planta, bem como nos frutos, constituindo-se em um dos maiores problemas fitossanitários, de espectro mundial (Freeman *et al.*, 1998). É uma das principais doenças fúngicas do feijoeiro, tendo como principal agente etiológico o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Emechebe & Florini, 1997).

A espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., pertence ao grupo de fungos imperfeitos da classe *Celomycetes*, à ordem *Melanconiales* e à família *Melanconiaceae* (Freire *et al.*, 2002; Menezes, 2002). Taxonomicamente, o gênero *Colletotrichum* apresenta como característica típica uma estrutura denominada acérvulo, onde se encontra os conidióforos, além da presença de apressórios como estruturas de infecção. Os conídios de *Colletotrichum* são liberados pela ação de gotas de chuva ou irrigação, que promovem a diluição de uma matriz mucilaginosa, sendo facilmente dispersos pela ação do vento (Silva, 2011).

A antracnose tem maior incidência nos períodos que coincidem com a emissão de novas folhas, agravando-se em anos de maior pluviosidade. Temperatura e umidade elevadas são favoráveis à propagação e desenvolvimento do patógeno, pois, para germinação dos conídios, é necessária a presença de água livre e de elevada umidade relativa (acima de 90%) (Freire-Filho, 2005).

O controle da antracnose pode ser conseguido, por exemplo, pela resistência varietal (uso de variedades resistentes e/ou tolerantes, adquiridas de empresas idôneas e certificadas) e produtos químicos (Kimati, 2005). Um dos meios mais eficientes de controle é a resistência varietal, não apenas por não onerar o custo de produção, mas, também, por evitar o controle químico que, além de oneroso, produz danos ambientais. Esse método apresenta bons resultados no controle da antracnose, pois já se conhecem várias fontes com os respectivos alelos de resistência (Pereira, 2004).

O feijão-de-corda apresenta genótipos resistentes à antracnose (que estabelecem com o patógeno uma interação incompatível) que, além de serem utilizados em cruzamentos para a obtenção de novas linhagens, podem ser alvo de estudos que preconizam o entendimento da resistência vegetal frente à infecção por fungos fitopatogênicos.

1.4 Marcadores proteicos envolvidos na interação Planta-patógeno

Considerando que a homeostase vegetal é afetada por interações complexas entre planta, patógeno e ambiente, a compreensão dos mecanismos que sustentam tais interações favorece o desenvolvimento de métodos mais eficazes de controle de fungos fitopatogênicos.

Atualmente, a produção de alimentos enfrenta novos desafios, como a diminuição de áreas cultiváveis, produtividade estagnada, aumento da demanda de biocombustíveis, inundações, além de novos patógenos e pragas emergentes devido às alterações climáticas. Nesse contexto, tornou-se prioridade desenvolver novos genótipos melhorados que possam alimentar a população humana e que sejam adaptados às novas condições ambientais (Diouf, 2011).

Tais desafios podem ser superados com o advento da era das “*Omicas*” (Genômica, Transcriptômica, Proteômica e Metabolômica), uma vez que o genoma de muitas culturas agrícolas importantes já foi sequenciado, ou o sequenciamento está em andamento (Mochida & Shinozaki, 2010). As abordagens “*Omicas*” fornecem resultados que subsidiam a compreensão da função dos genes, crescimento e desenvolvimento, redes de regulação acionadas em condições de estresse, assim como o entendimento das associações entre as mudanças fenotípicas que ocorrem no vegetal em decorrência de determinado estresse (Diouf, 2011).

Nesse sentido, é válido ressaltar a perspectiva de estudo da resistência de plantas à infecção, por meio da identificação de marcadores proteicos, visto que as proteínas estão envolvidas diretamente nos principais eventos celulares e os

achados genômicos e de transcritos possuem limitações no que concerne à expressão e funcionalidade das proteínas codificadas por determinado gene de interesse. Além disso, um gene pode codificar mais de uma proteína, ou ainda proteínas diferentes funcionarem de forma semelhante (Gondim, 2010). Todos esses eventos demonstram a complexidade dos estudos proteômicos, porém, os resultados obtidos são consistentes e caracterizam o conjunto de proteínas expressas pelo genoma da planta ao ser submetida à elicitação pelo patógeno: o Proteoma.

Dentre as diversas abordagens aplicáveis para análise proteômica, a separação de proteínas por meio da Eletroforese Bidimensional (2D) e subsequente identificação por Espectrometria de Massas (MS), combinada com ferramentas de bioinformática, vem sendo as estratégias mais empregadas no estudo do proteoma vegetal.

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) permite, simultaneamente, a separação, detecção e quantificação de grandes quantidades de proteínas presentes em amostras biológicas. Por esta técnica, as proteínas são separadas pelo ponto isoelétrico (pI) na primeira dimensão – focalização isoelétrica (IEF) – e pela massa molecular na segunda dimensão (SDS-PAGE). Quando combinadas, estas duas etapas permitem a separação de milhares de proteínas, levando à construção de mapas proteicos bidimensionais (Andrade, 2006).

Eletroforese Bidimensional é uma tecnologia simples e que gera resultados robustos, podendo ser aplicada ao estudo do crescimento e desenvolvimento vegetal, bem como na elucidação de respostas bioquímicas que decorrem de situações de estresse. Alterações no nível de expressão de proteínas podem ser detectadas entre duas ou mais condições biológicas relevantes. Além disso, isoformas proteicas podem ser separadas com acurácia e a massa molecular e o ponto isoelétrico podem ser estimados. Em contrapartida, cabe citar as limitações da técnica em resolver proteínas hidrofóbicas, haja vista a necessidade de protocolos específicos para a solubilização de tais proteínas (Rogowska-Wrzesinska *et al.*, 2013).

A principal razão para a popularidade da abordagem 2D reside na facilidade de análise quantitativa das proteínas. A quantificação da expressão de proteínas em imagens de géis 2D permite realizar experiências comparativas, por exemplo entre as condições sadio e infectado, no contexto da resistência de plantas ao ataque de fungos. Devido ao desenvolvimento de softwares para a análise de tais imagens, a abordagem diferencial quantitativa pode ser realizada em uma grande série de amostras com alta reprodutibilidade. A partir disso, apenas as proteínas que apresentem alterações significativas reprodutíveis serão selecionadas para a identificação por MS (Rogowska-Wrzesinska *et al.*, 2013).

A espectrometria de massas (MS), técnica analítica bastante abrangente, apresenta acurado grau de sensibilidade, em combinação com a rapidez da análise, em identificar a massa molecular, a partir da razão entre a massa e a carga das moléculas ionizadas (m/z) (Dass, 2001; Cunha *et al.*, 2006). Geralmente, um espectrômetro é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. Recentemente, a conjugação de analisadores em sequência (MS/MS) tem permitido a fragmentação dos peptídeos tripticos, possibilitando determinar sua sequência de aminoácidos. Em relação às desvantagens estão as dificuldades de interpretação dos espectros e de distinção entre os aminoácidos isobáricos (Cunha *et al.*, 2006; Cantú, 2007).

O estudo do Proteoma vegetal por intermédio da eletroforese bidimensional, em combinação com a espectrometria de massas fornece informações importantes no que concernem as respostas de defesa de plantas frente a estresses. Considerando o contexto das doenças vegetais causadas por fungos, diversas proteínas envolvidas em inúmeros processos biológicos já foram detectadas: relacionadas a estresses e defesa, envolvidas com transdução de sinais e fotossíntese, além de proteínas do metabolismo basal (Quirino *et al.*, 2010; Koga *et al.*, 2012).

Trabalhos recentes tem demonstrado a utilização da abordagem proteômica com o intuito de compreender os mecanismos de defesa das plantas frente à infecção com fungos fitopatogênicos. Asano *et al.*, (2012) identificaram 24 proteínas diferencialmente expressas (*upregulated* ou *down-regulated*) em plantas de *Arabidopsis thaliana* após a inoculação com o fungo *Fusarium sporotrichioides*. De modo geral, houve a indução de proteínas envolvidas com o metabolismo, síntese e

enovelamento de proteínas, fotossíntese e homeostase redox, destacando-se a superexpressão de diversas Glutathione-S Transferases (GST).

O desenvolvimento da resistência à doença tem sido amplamente correlacionado com o acúmulo de proteínas induzidas durante a interação planta-fungo. Fang *et al.*, (2012) discutem que a resistência de plantas de morango à infecção com o fungo *C. fragariae* pode ser atribuída à indução de marcadores proteicos relacionados ao estresse oxidativo, lignificação da parede celular, proteínas de defesa, além da reprogramação do metabolismo decorrente da inoculação do patógeno. Trata-se do primeiro estudo proteômico que abrange o mecanismo de defesa de plantas no contexto da infecção com uma espécie do gênero *Colletotrichum*.

1.5 Justificativa

O feijão-de-corda desempenha importante papel socioeconômico no Brasil, sobretudo nas regiões Norte e Nordeste. Contudo, sua produção pode ser comprometida em decorrência de estresses bióticos, enfatizando-se as infecções deliberadas por fungos. Dentre essas patologias, ascende a ocorrência de Antracnose, causada pelo fungo *C. gloeosporioides*, como propiciadora de perdas importantes na produtividade das plantas de feijão-de-corda, especialmente em períodos de alta umidade.

Estudos do nosso grupo de pesquisa, acerca das interações planta-fungo, têm sugerido que a resistência do feijão-de-corda ao *C. gloeosporioides* está correlacionada, ao menos parcialmente, com a resposta hipersensitiva (HR), que corresponde ao acúmulo de H₂O₂ na fase inicial da infecção, o que parece inviabilizar a colonização do patógeno ao longo dos tecidos foliares. Além disso, tem sido reportada a atividade da enzima PAL (*Phenilalanine Amonia Lyase*), reforçada com o consequente aumento da deposição de compostos fenólicos e lignificação da parede celular (Barreto *et. al.*, 2007).

Entretanto, esses achados são preliminares e não denotam a existência de mecanismos de defesa consistentes que justifiquem a interação incompatível, haja vista a inexistência de dados no que concerne à identificação de marcadores

bioquímicos de defesa, bem como a alteração de parâmetros metabólicos/fisiológicos relacionados com a defesa da planta após o contato com o fungo.

A compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência de linhagens de feijão-de-corda frente à infecção por *C. gloeosporioides* através da identificação das respostas proteômicas contribui para o direcionamento dos programas de melhoramento genético, culminando no desenvolvimento de novas cultivares resistentes, além de permitir que os dados obtidos possam ser utilizados como modelos para o estudo de outros patossistemas.

Nessa perspectiva, o presente estudo se propôs a investigar os possíveis mecanismos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na resistência do genótipo BR3, em decorrência da inoculação com o fitopatógeno *C. gloeosporioides*, causador da Antracnose em plantas de feijão-de-corda, utilizando a abordagem proteômica para a identificação de marcadores proteicos que justifiquem a interação incompatível.

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 Hipótese

A resistência de plantas de feijão-de-corda (cultivar BR3) frente à infecção do fitopatógeno *C. gloeosporioides* envolve alterações dos padrões metabólicos e fisiológicos, desencadeadas por mudanças proteômicas no vegetal.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo Geral

- Identificar proteínas foliares diferencialmente expressas em cultivar resistente de feijão-de-corda, em decorrência da infecção de *C. gloeosporioides* por meio da Análise Proteômica;

2.2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer um protocolo de extração de proteínas foliares de feijão-de-corda que contemple bom rendimento, solubilidade e compatibilidade com o método de eletroforese bidimensional;
- Obter mapas bidimensionais das proteínas foliares de folhas de feijão-de-corda (cultivar resistente) inoculadas e não inoculadas com *C. gloeosporioides*;
- Identificar, por Espectrometria de Massas, as proteínas expressas diferencialmente nas folhas de feijão-de-corda, após a infecção;
- Verificar o curso da infecção foliar pelo *C. gloeosporioides*, por microscopia óptica;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Reagente Fenol saturado com Tris, pH 8,0, Coomassie Brilhante Blue G-250, polietileno glicol (PEG), polivinilpolipirrolidona (PVPP), β -mercaptoetanol (2-ME), acrilamida, bis-acrilamida serão obtidos da Sigma-Aldrich, Brasil. 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), Ditiotreitól (DTT), ácido etileno diaminotetracético (EDTA), Fluoreto de Fenil metil sulfonil (PMSF), iodoacetamida, óleo mineral, tiouréia, tiras para focalização isoeétrica, uréia, IPG buffer 3-10, dodecil sulfato de sódio (SDS) serão obtidos da GE Healthcare do Brasil. Ácido tricloroacético (TCA) e ácido trifluoracético (TFA), ambos possuindo grau analítico, serão obtidos de diferentes fornecedores. A enzima Tripsina será adquirida da Promega, Madison, WI, USA.

Os demais reagentes utilizados, de grau analítico, foram obtidos, comercialmente, de diferentes fornecedores.

3.2. Materiais Biológicos

3.2.1. *Coletotrichum gloeosporioides*

O fungo *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1) utilizado nos experimentos pertence à Micoteca do Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) UFC. O fungo foi mantido em meio de cultura BCA (Batata/Cenoura/Ágar), por apresentar alto índice de esporulação, a 25 ± 3 °C, 12 h claro/escuro, tendo sido previamente isolado de folhas de plantas suscetíveis de feijão-de-corda.

3.2.2 *Feijão-de-corda*

As sementes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], genótipo BR-3 TRACUATEUA, resistente ao *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1), foram obtidas da Embrapa Meio Norte, situada em Teresina-PI. Essas sementes foram higienizadas

em solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v) (0,05% de cloro ativo), lavadas exaustivamente com água destilada e colocadas para germinar em papel de filtro umedecido (*Germitest*®). Após 3 dias, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos (capacidade estimada em 700 mL) contendo areia de leito de rio lavada por 6 vezes em água corrente e, posteriormente, autoclavada (120 °C, 1,5 KGF, 30 min). As plantas foram mantidas sob condições de umidade e luminosidade controladas em câmara de crescimento (25-32 °C, RH: 60 ± 5% e fotoperíodo de 12 h sob intensidade ca. 300 mmol s⁻¹ m⁻² de radiação fotossinteticamente ativa), sendo regadas com água destilada até o 2º dia após o plantio. A partir do 3º dia, foram regadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), modificada por Silveira *et al.* (2001). A Figura 2 mostra o plantio e manutenção das plantas em câmara de crescimento.

3.3 Metodologia Experimental

3.3.1 Preparo do Inóculo

Para recuperar a virulência do patógeno, foram realizados os seguintes procedimentos (Fig. 3): a) Discos miceliais do *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1), (mantido em meio de cultura BCA) foram inoculados em vagens de feijão-de-corda de uma variedade desconhecida, obtidas comercialmente, previamente seccionadas em pedaços de cerca de 8 cm e autoclavadas (120 °C, 1,5 KGF, 30 min) por duas vezes consecutivas. Em seguida, essas vagens foram acomodadas em placas de Petri forradas com papel de filtro (*Germtest*®) saturado com água, também tendo sido previamente autoclavados. O fungo foi deixado crescer a 28 ± 32 °C, 12 h claro/escuro. Cinco dias após o desenvolvimento do fungo nas vagens, foi feito o repique para placas de Petri contendo o meio de cultura BCA; b) Cinco dias após o crescimento micelial em meio de cultura, foi feito o preparo da suspensão de esporos e inoculação do fungo em folhas secundárias de plantas de feijão-de-corda, genótipo TE97-411 (suscetível ao isolado utilizado neste estudo). Antes da inoculação, as folhas foram excisadas de plantas com doze dias de idade, colocadas em placas de Petri (contendo papel de filtro umedecido) previamente autoclavadas.

Para minimizar os efeitos da senescência, o pecíolo foliar foi embebido em algodão contendo uma solução de sacarose 2% (m/v), conforme ilustrado na Figura 3. Todo o procedimento descrito acima foi realizado em câmara de fluxo laminar (28 ± 32 °C, 12 h claro/escuro) e as placas foram vedadas com fita adesiva e mantidas no Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa. Seis dias após a inoculação, considerando a presença de sintomas evidentes, o fungo foi isolado a partir de micélios desenvolvidos sobre a superfície foliar e mantido em meio de cultura BCA.

Doze dias após o repique do fungo *C. gloeosporioides*, quando o mesmo havia proliferado por todo o diâmetro da placa, estas foram abertas em câmara de fluxo laminar, sendo adicionados 4 mL de água ultrapura (grau Milli-Q) estéril. Com auxílio de alça de Drigalski, manuseada suavemente sobre a superfície da cultura, os esporos foram liberados e suspensos em água estéril. A suspensão foi filtrada em malha de *nylon* para a retenção das hifas. A concentração de esporos foi avaliada com o auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico (*Olympus System BX60*), sendo a concentração do inóculo ajustada para $2,5 \times 10^6$ esporos mL⁻¹, por diluição em água ultrapura estéril (Barreto, 2005).

Além dos experimentos citados, foi realizado um experimento teste de inoculação do patógeno em plantas de feijão-de-corda utilizando, além do genótipo BR-3 (resistente ao fungo), o genótipo TE-97 (suscetível ao isolado LPVD-1) a fim de observar o desenvolvimento da antracnose durante a interação compatível. Além disso, um grupo de plantas BR-3 com 12 dias de idade, não infectadas com o fungo, foi utilizado para o experimento de definição do protocolo de extração de proteínas totais, descrito posteriormente. O experimento foi realizado nas mesmas condições de plantio, porém a aclimação das plantas e inoculação do patógeno foram realizadas em casa de vegetação.

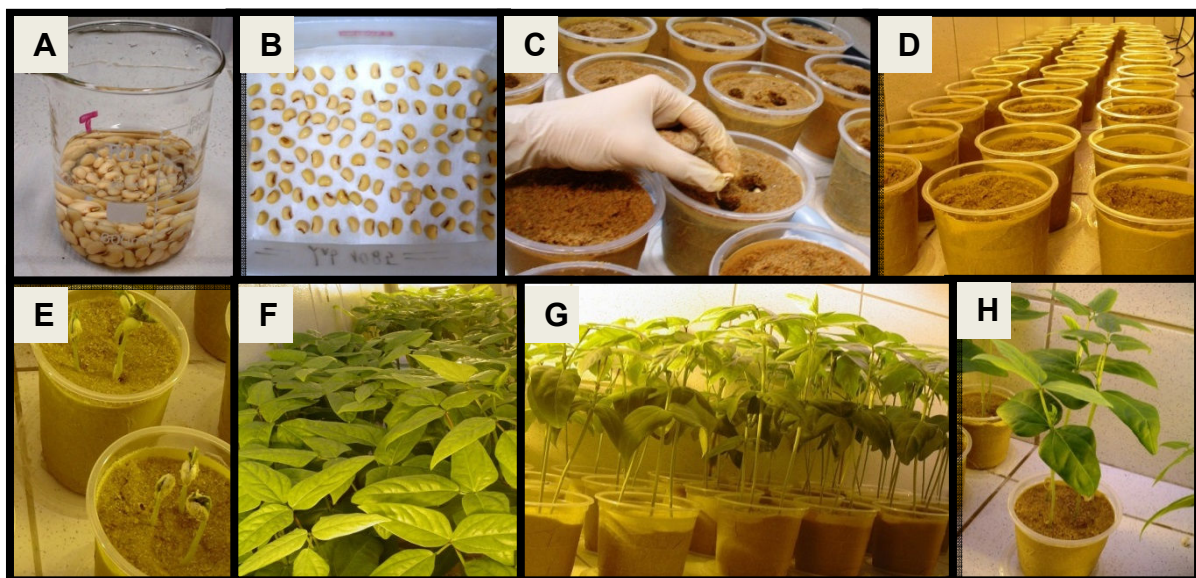
3.3.2 Inoculação do patógeno e Coleta das Folhas

O método de inoculação da suspensão de esporos foi proposto por Barreto (2005), sendo utilizado com algumas modificações. Plantas sadias, com doze dias após o plantio (idade em que as folhas primárias estão totalmente expandidas) em câmara de crescimento, foram selecionadas ao acaso e inoculadas com suspensão

de esporos, encerrando $2,5 \times 10^6$ células mL^{-1} . Foram aplicados 50 μL da suspensão de esporos em cada lado da nervura central da superfície adaxial das folhas primárias, sendo estas gotas imediatamente espalhadas por toda a folha, de forma suave, com auxílio de pincel fino (Figura 4). Em plantas do experimento controle, água ultrapura estéril foi utilizada nas mesmas condições. Após inoculação, a umidade relativa da câmara de crescimento foi alterada para $90 \pm 5\%$, aumentando o fluxo de vapor de água proveniente de dois umidificadores (*Umidifier*®) instalados na câmara de crescimento. As folhas primárias das plantas controle e inoculadas foram, então, coletadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI) e, em seguida, armazenadas em *freezer* a -80 °C para posterior extração de proteínas totais e análise do proteoma.

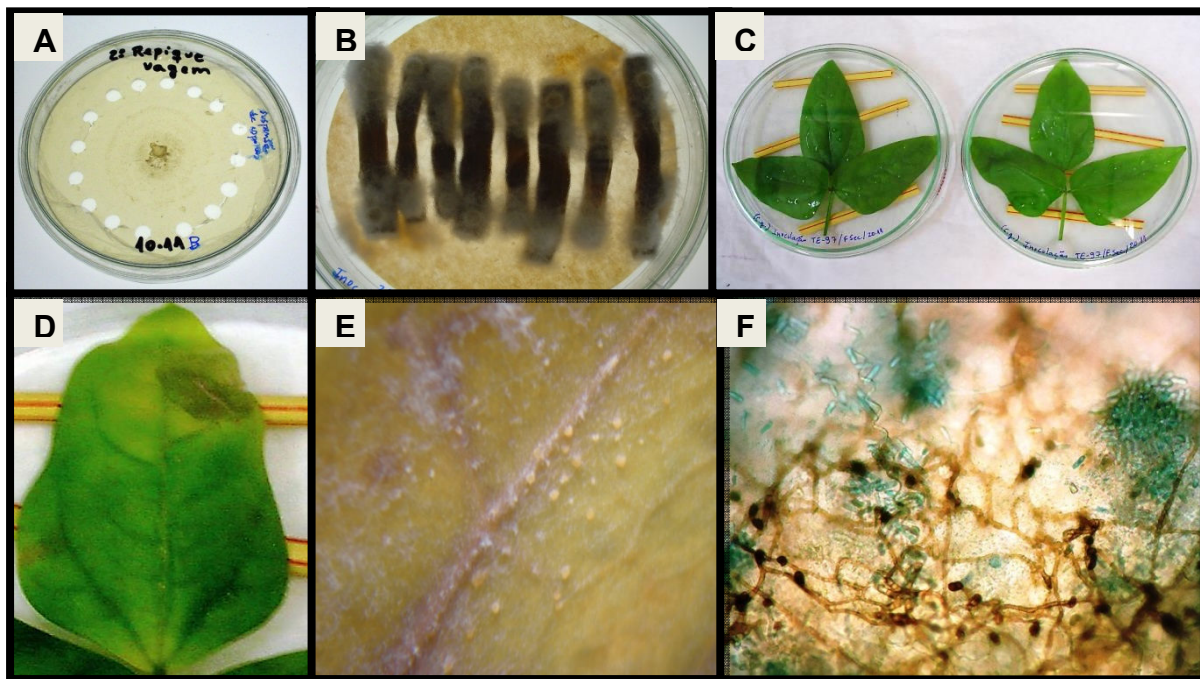
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e realizado em triplicata. Foram coletadas 6 folhas primárias (a partir de 3 plantas) para cada uma das três amostras referentes a cada tempo experimental (24, 48 e 72 h) tanto para o grupo controle quanto para o grupo inoculado.

Figura 2. Plantio e aclimação do feijão-de-corda resistente (genótipo BR3), para inoculação posterior do fungo *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1) e análise proteômica.



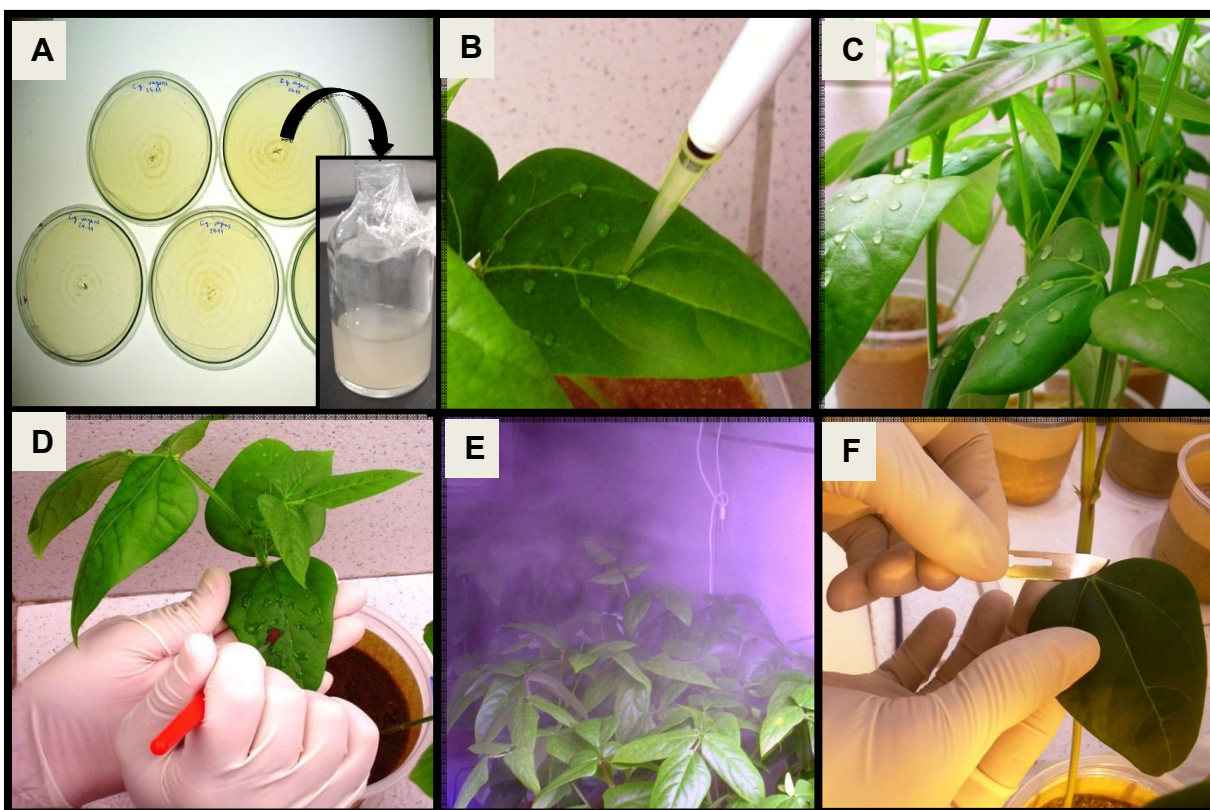
Legenda: A – Lavagem e assepsia das sementes em hipoclorito de sódio 1% (v/v) 1% (0,05% de cloro ativo); B – Germinação das sementes em papel *Germtest*® por três dias; C e D – plantio das sementes germinadas na câmara de crescimento; E – Plântulas de feijão-de-corda dois dias após o plantio; F, G e H – Plantas com 12 dias após o plantio em câmara de crescimento.

Figura 3. Recuperação da virulência do fungo *C. gloeosporioides* em vagens e folhas de feijão-de-corda.



Legenda: A – Discos de micélios do fungo *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1) para inoculação em vagens; B – Desenvolvimento do fungo 5 dias após inoculação nas vagens de feijão-de-corda autoclavadas; C – Folhas secundárias do genótipo suscetível (TE97), inoculadas com a suspensão de esporos provenientes do inóculo previamente isolado das vagens; D – Crescimento micelial, em folhas suscetíveis (genótipo TE97), seis dias após a inoculação; E – Visualização, em microscópio estereoscópio, do crescimento fúngico sobre a superfície foliar (aumento: 4X); F – Desenvolvimento do patógeno visto por microscopia óptica (aumento: 400X).

Figura 4. Inoculação de esporos de *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1) em folhas de feijão-de-corda resistente (genótipo BR3).



Legenda: A – Preparo da suspensão de esporos, doze dias após o crescimento do fungo (isolado de folhas suscetíveis) em meio de cultura BCA; B e C – Inoculação de 50 μ L da suspensão de esporos em cada lado da nervura central; D – Espalhamento da suspensão por toda a superfície foliar; E – Elevação da umidade (RH: $90 \pm 5\%$) após a inoculação do patógeno; F – Excisão e coleta das folhas primárias.

3.3.3 Microscopia óptica

Após a excisão e coleta das folhas primárias, algumas folhas foram destinadas para a análise por microscopia óptica. Cortes em forma de discos foliares foram feitos e os tecidos foram, então, descorados utilizando solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,15% em etanol/clorofórmio (3:1 v/v), por 48 h, sob agitação moderada e constante. Após o descoramento, os discos foliares foram colocados em lâminas de vidro e foi utilizado o corante lactofenol azul de anilina 0,5 M, por se ligar às estruturas fúngicas, facilitando a observação do crescimento do patógeno (Balows *et al.*, 1991). As análises de microscopia óptica foram realizadas utilizando-se o Microscópio *Olympus System BX60*.

3.3.4 Determinação Quantitativa do Teor de Peróxido de Hidrogênio

O acúmulo de peróxido de hidrogênio foi determinado de acordo com metodologia descrita por Gay *et al.* (1999). As folhas primárias destacadas e coletadas nos tempos experimentais 24, 48 e 72 horas após a inoculação com o fitopatógeno, foram pulverizadas em N₂ líquido até obtenção de um pó de consistência homogênea. Em seguida, o material foi homogeneizado em tampão bórax-borato, 50 mM, pH 8,4, em geral, na proporção de 1:4 (m/v), por 3 min. Logo após a homogeneização, a suspensão foi centrifugada (12.000 x *g*, a 4 °C por 20 min.) e o sobrenadante utilizado no ensaio. A mistura reacional consistiu de 200 µL do sobrenadante + 1 mL da solução de alaranjado de xilenol (100 µL solução A + 10 mL solução B); (solução A: FeSO₄, 25 mM + (NH₄)₂SO₄, 25 mM + H₂SO₄, 2,5 M + água grau Milli-Q, q.s.p. 10 mL. Solução B: alaranjado de xilenol, 125 µM + sorbitol, 100 mM + água grau Milli-Q, q.s.p. 100 mL). A mistura reacional foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, e a absorbância lida a 560 nm. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (0 – 10,0 µmol H₂O₂/1,2 mL) foi construída para determinar a quantidade de peróxido de hidrogênio nos tecidos vegetais.

3.3.5 Definição do Protocolo de Extração de Proteínas Foliaves para a Análise Proteômica

Folhas de feijão-de-corda (genótipo BR3), obtidas a partir de um experimento-teste, foram pulverizadas na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de amostras de pó de textura fina, que foi utilizado em quatro diferentes métodos de extração/precipitação de proteínas, com o intuito de se definir a melhor metodologia no que concerne à obtenção de um bom rendimento, solubilidade e compatibilidade com o método de eletroforese bidimensional.

3.3.5.1 Método 1: Precipitação das Proteínas com TCA/Acetona/2β-ME

Essa metodologia foi previamente descrita por Görg *et al.*, (2000) e modificada/adaptada por Barreto (2005). 2 g de pó foliar, obtidos por pulverização

com N₂, foram diretamente precipitados com solução de TCA 15% (v/v)/Acetona contendo 0,07% (v/v) de β-Mercaptoetanol, por 12 h. Em seguida, o material foi centrifugado a 18,000 x g, 20 min, 4 °C, e o precipitado lavado duas vezes com solução de acetona 80% (v/v). Após a secagem do precipitado em dessecador contendo sílica gel a 4 °C, as proteínas foram ressuspensas em solução de Uréia (7 M): Tiouréia (2 M)/CHAPS 2% (v/v)/0,025 M DTT/glicerol 20% (v/v), como descrito para os métodos anteriores já citados.

3.3.5.2 Método 2: *Extração com solução Fenol saturada com Tris pH 8,0*

Método baseado no protocolo de extração de proteínas adaptado por Gondim (2010). 2 g de pó, obtidos a partir da maceração das folhas primárias em N₂, foram homogeneizados em 30 mL da solução TCA 10%(v/v)/β-Mercaptoetanol (2-ME) 2% (v/v)/Acetona (1:15 v/v) a 4 °C. Após 1 h sob agitação, o material foi armazenado a -80 °C por 3 h e, então, centrifugado a 18,000 x g, 20 min, 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com acetona contendo 2% (v/v) de 2-ME e, então, centrifugado a 18,000 x g, por 20 min, 4 °C. O precipitado foi seco e as proteínas extraídas em 15 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,65, contendo 30% (m/v) de sacarose, 2% (m/v) de SDS, 10⁻³ M de PMSF, 2% (v/v) de 2-ME e 1% (m/v) de PVPP. A amostra foi homogeneizada por 1 h, a 4° C, e um volume igual do reagente Fenol-Tris, pH 8,0 (Acros Organics) foi adicionado. Após centrifugação (10.000 x g, 4° C, 20 min), a fase fenólica superior foi coletada. Em seguida, as proteínas presentes na fase fenólica foram precipitadas em solução 0,1 M de acetato de amônio em metanol (relação 1:5), a -80 °C/2 h. Após centrifugação (18.000 x g, 4 °C, 20 min), o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado duas vezes com 0,1 M de acetato de amônio em metanol gelado e, após, duas vezes com acetona gelada a 80% (v/v). Entre cada lavagem, o precipitado foi incubado a -20 °C, por 10 min, e a suspensão centrifugada a 18.000 x g, a 4 °C, por 20 min. O precipitado foi seco em dessecador contendo sílica gel a 4 °C e ressuspendido em solução de ureia : tiourea : CHAPS [7 M : 2 M : 2% (m/v)], sob sonicação, por 20 min.

3.3.5.3 Método 3: Extração de Proteínas com tampão Tris-HCl

Metodologia descrita por Araújo-Filho (2011), com modificações. 2 g de pó foliar, obtido após pulverização em N₂, foi homogeneizado em 8 mL da solução tampão de extração Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, contendo glicerol 20% (v/v) + PEG 3% (v/v) e PVPP 1:2 (m/v) por 2 h/4 °C, sob agitação suave, em agitador automático. As amostras foram, então, centrifugadas (2000 x g, 10 min/ 4 °C) 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 (15000 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), secado em dessecador a vácuo e ressuscitado em 300 µL de solução de ureia (7 M) tioureia (2 M).

3.3.5.4 Método 4: Fracionamento das Proteínas Totais com Polietileno Glicol (PEG)

Fracionamento de proteínas baseado no método descrito por Acquadro *et. al.*, (2009), com algumas modificações. Consistiu na solubilização de proteínas totais com polietileno glicol 20% (PEG 20%, v/v), visando obtenção de uma fração proteica livre de interferentes e de proteínas de alta abundância, como a Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase. As proteínas retidas na fração PEG 20% foram precipitadas com TCA 10% (v/v)/Acetona a -80 °C, lavadas com acetona, a fim de retirar o excesso de TCA, e ressuscitadas em solução de ureia (7 M): tioureia (2 M)/CHAPS 2% (m/v).

3.3.6 Dosagem de Proteínas

A determinação dos teores de proteínas foi feita seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976). 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados a alíquotas de 0,1 mL dos extratos totais. Após 10 minutos, as leituras das absorbâncias foram feitas a 595 nm em espectrofotômetro (Novaspec III da Pharmacia). Albumina sérica bovina foi utilizada para obtenção de uma curva padrão e definição do fator de correção, necessário para determinar o teor de proteínas

solúveis nos extratos. Quando necessário as leituras de absorvância foram descontadas da produzida pela solução de ureia (7 M)/tioureia (2 M).

3.3.7 Análise proteômica das folhas de feijão-de-corda, cv. BR-3, nas condições controle e inoculado com o fungo

A análise do proteoma foliar de feijão-de-corda (genótipo BR3) não-inoculado e inoculado com *C. gloeosporioides* foi realizada usando eletroforese bidimensional seguida de identificação das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massas. Consistiu, primeiramente, da separação das proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) pelo método de focalização isoelétrica (IEF, primeira dimensão). Fitas de gradientes de pH imobilizados em géis de poliacrilamida (IPG) de 13 cm, pH 3-10 (GE Healthcare) foram utilizadas. As amostras foram solubilizadas em solução de rehidratação [ureia 7 M, tioureia 2 M, DTT 0,065 M, CHAPS 2% (v/v), tampão IPG 0,5% (v/v) e azul de Bromofenol 0,01%] e aplicadas nas fitas, que foram re-hidratadas, passivamente, durante 16 h em cubas de rehidratação (Reswelling Tray II, Pharmacia Biotech). Em seguida, as proteínas foram separadas por focalização isoelétrica utilizando o sistema Ettan IPGphor III (Amersham Bioscience), de acordo com a seguinte programação: 200 V por 0:45 h; 500 V por 1 h; 1000 V por 1 h; 5000 V por 2 h; e 8.000 V até atingir 38.000 Volts/hora totais, a 20 °C.

Após a focalização isoelétrica, as fitas foram equilibradas, sob agitação, em solução de equilíbrio e redução [Tris-HCl 0,05 M, pH 8.8, glicerol 30% (v/v), ureia 6 M, SDS 2% (m/v), DTT 2% (m/v) e azul de Bromofenol], por 20 minutos, sob agitação lenta e, em seguida, foram lavadas com uma solução de alquilação [Tris-HCl 0,05 M, pH 8.8, glicerol 30% (v/v), ureia 6 M, SDS 2% (v/v), iodoacetamida 2,5% (m/v) e azul de Bromofenol] por 20 minutos sob leve agitação.

A 2ª dimensão (SDS-PAGE) foi realizada em gel vertical homogêneo (14 x 14 cm). As fitas foram inseridas sobre os géis de poliacrilamida e fixadas com solução de 0,5% (m/v) de agarose. A separação das proteínas, de acordo com suas massas moleculares, foi realizada a 12 °C (Power-Pac 3000, Bio-Rad). A corrida consistiu de duas etapas: na primeira, foi aplicada corrente de 20 mA/gel, durante 20 min, e, na

segunda, 30 mA/gel, até que o indicador (azul de bromofenol) saísse do gel (aproximadamente, 5:00 h). As proteínas foram visualizadas com Coomassie Brilliant Blue (CBB) coloidal (CANDIANO, 2004). As imagens dos géis com as proteínas reveladas foram captadas usando o ImageScanner (Amersham Biosciences) e analisadas pelo programa LabScan v. 5.0 (GE Healthcare). A análise das imagens foi feita pelo programa *PDQuest* 5.0 (Bio-Rad, USA) detectando os *spots* proteicos de forma tanto manual como automática (programa). Além disso, foram estimados os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada *spot*. A partir disso, todos os *spots* marcados no gel foram submetidos à análise estatística a fim de verificar as diferenças na intensidade relativa de cada *spot* nos géis experimentais e identificar quais seriam os *spots* que sofreram alterações em decorrência da inoculação fúngica. Para análise estatística, variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste T de *Student* ($p < 0,05$). Variáveis não paramétricas foram comparadas utilizando o teste de Wilcoxon. Todas as análises foram conduzidas utilizando o *Software JMP Statistical Discovery v. 5.2* (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3.3.8 Processamento dos spots, Espectrometria de massas e Identificação das proteínas de interesse

Por ocasião da análise comparativa dos géis em relação aos *spots* de proteínas expressas diferencialmente em plantas inoculadas, quando comparadas com as plantas controle, os *spots* de interesse foram recortados dos géis revelados com CBB coloidal, descorados e digeridos com tripsina (Promega, Madison, WI, USA). Os peptídeos tripsinizados foram extraídos de cada *spot*-gel com solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido trifluoracético 5% (v/v), com auxílio de sonicador, por 30 min (3 vezes). Soluções contendo os peptídeos foram secas em Speed Vac (Savant).

Antes da análise dos peptídeos por Espectrometria de Massas, peptídeos secos foram dissolvidos em solução de ácido fórmico a 1% (v/v). Análises de MS/MS foram realizadas em um Espectrômetro de massas caracterizado 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 voo dos íons (TOF) e um detector

de íons. Um sistema de cromatografia líquida de ultra *performance* - UPLC (Waters, Milford, US) foi acoplado on-line ao ESI-Q-TOF. Os peptídeos foram separados em uma coluna capilar nano-C18 (75 µm ID) por eluição com gradiente de água-acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico.

Os espectros de massas adquiridos foram processados usando o software Mascot Distiller (*Matrix Science*, London, UK) e os arquivos PKL gerados foram consultados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) usando a pesquisa do software MASCOT v.2.2 (*Matrix Science* – www.matrixscience.com) contra o banco de dados do NCBI.

3.3.9 Análise Estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições para cada tempo experimental (24, 48 e 72 HAI), sendo cada repetição correspondente a três plantas (6 folhas primárias coletadas). As médias obtidas de plantas infectadas com o isolado LPVD-1 foram comparadas com plantas não inoculadas (grupo controle) ao longo do tempo (em horas) após inoculação. A análise dos dados foi feita através do teste de variância simples (one-way ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5% (*software Estat*).

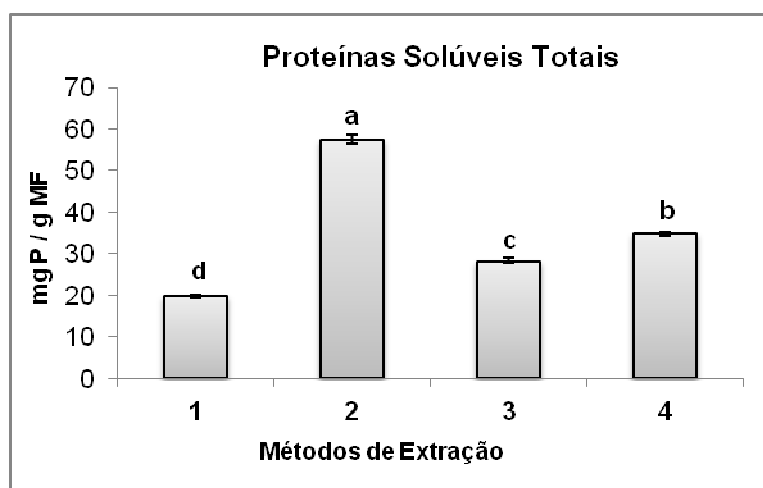
4. RESULTADOS

4.1 Protocolo de Extração de Proteínas Foliares de Feijão-de-corda para Análise Proteômica

A fim de estudar os marcadores proteicos que conferem resistência ao feijão-de-corda frente à inoculação do fungo *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1), foi definido o protocolo de extração de proteínas foliares compatível com Eletroforese Bidimensional.

Inicialmente, foi avaliado o teor de proteínas solúveis totais para cada método testado. Para os métodos testados 1, 2, 3 e 4 foram encontrados, aproximadamente, 20, 57, 28 e 35 mg de proteína/g de tecido foliar, respectivamente, com destaque para o método 2 (Extração de proteínas com solução tampão Tris-Fenol pH 8,0), que apresentou o melhor rendimento (Figura 5).

Figura 5 – Teor de proteínas totais referentes aos métodos de extração de proteínas para a análise proteômica. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) entre os métodos testados.

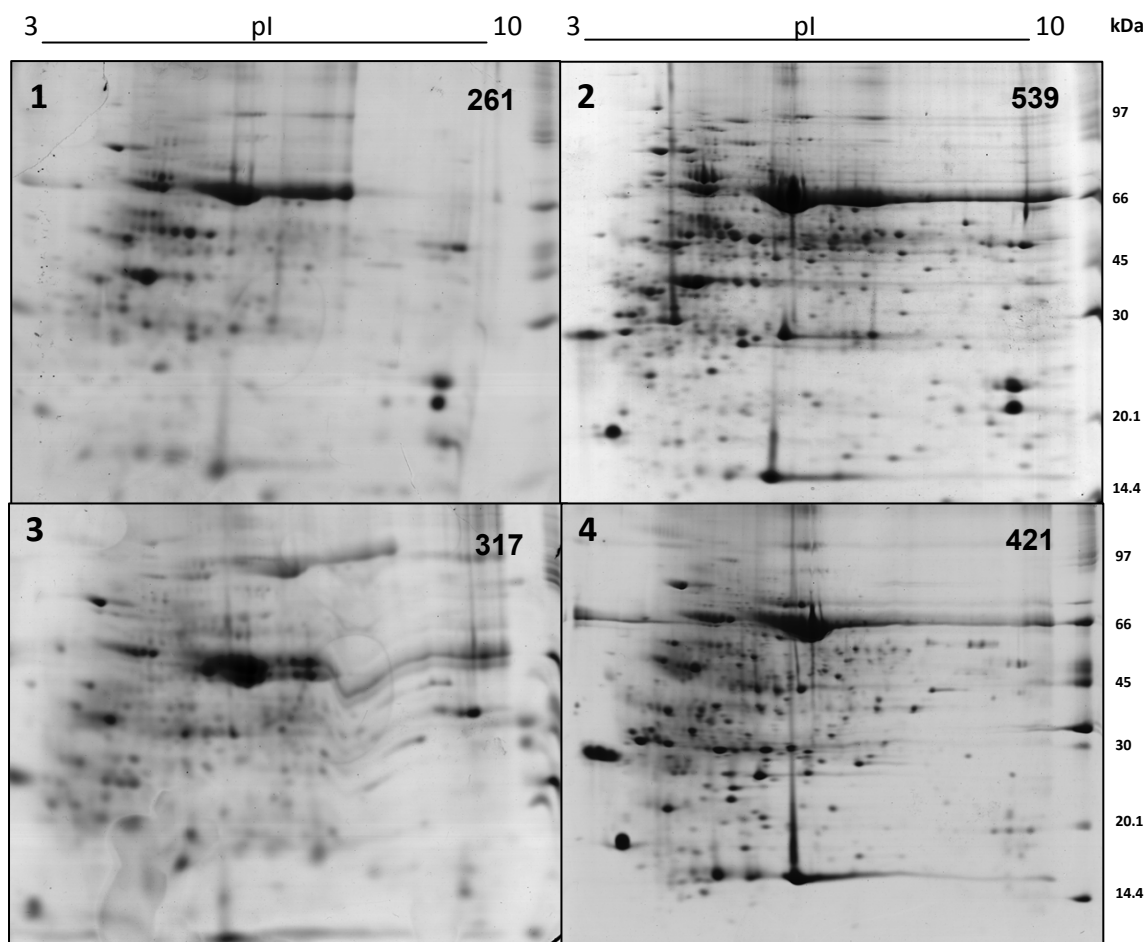


Em seguida, os quatro métodos foram analisados quanto ao perfil bidimensional, a fim de verificar a abundância de *spots* proteicos obtidos a partir de diferentes formas de extração. A figura 6 mostra os perfis bidimensionais referentes às proteínas extraídas usando os métodos de extração citados. As proteínas foram focalizadas em *strips* com gradiente de pH imobilizado na faixa 3-10, separadas em

géis com malha (T%) 12,5% e foram utilizados marcadores de massa molecular abrangendo 14 a 97 KDa.

Os mapas bidimensionais mostraram diferentes perfis de proteínas para os métodos testados, apesar do perfil referente ao método 2 apresentar algumas semelhanças com o perfil obtido para o método 4 (Fração proteica extraída com PEG 20%). A partir da análise das imagens dos géis pelo *software* PDQuest versão 7.3.0 (Bio-Rad, USA), foi possível detectar o número de *spots* para cada método testado ressaltando o método 2 com 539 *spots* totais. Para os métodos 1, 3 e 4 foram contabilizados 261, 317 e 421 *spots* totais, respectivamente (Figura 6).

Figura 6 - Comparação dos perfis de proteínas foliares do genótipo BR3 de *Vigna unguiculata* L. Walp. obtidos a partir dos métodos descritos no texto. 400 µg de proteínas foram focalizados em *strips* de 13 cm com gradiente linear de pH imobilizado na faixa 3-10 e, então, separados por SDS-PAGE (12,5%). A imagem também mostra o número de *spots* totais para cada mapa bidimensional.



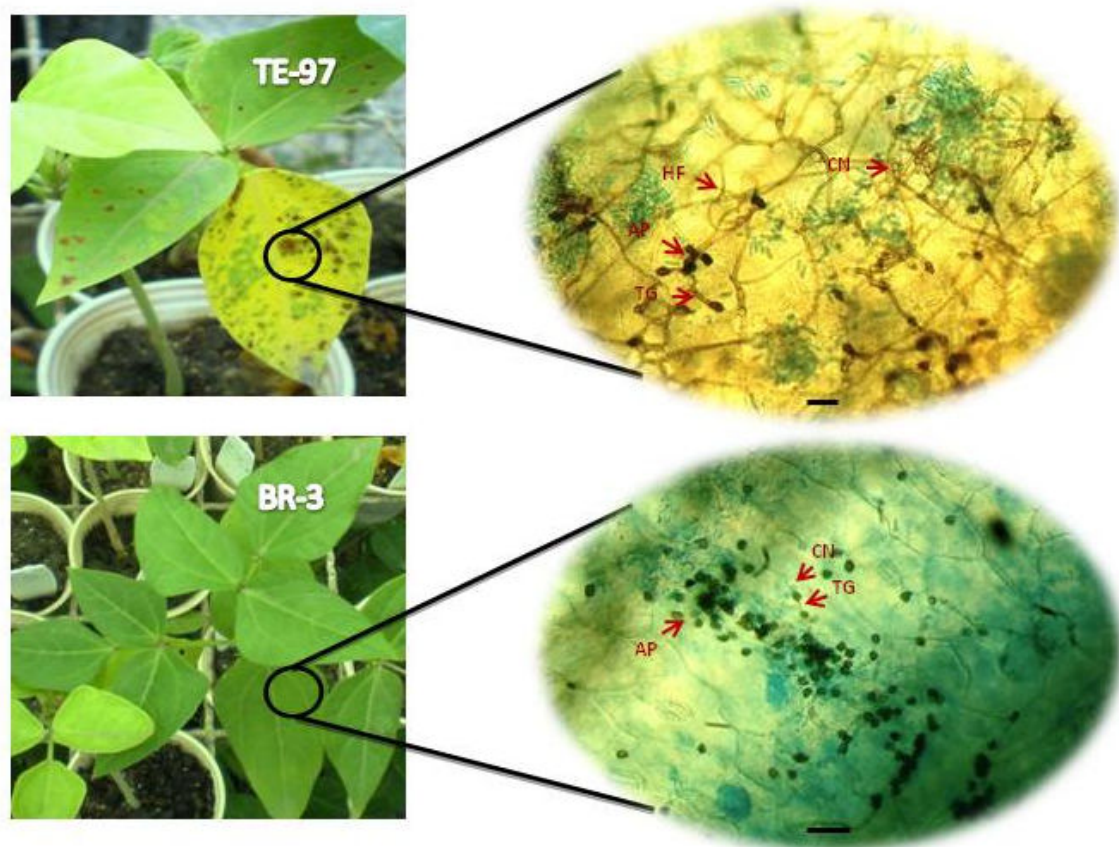
Os resultados acima mostraram que o método 2 (Extração de proteínas com solução tampão Tris-Fenol pH 8,0) se sobressai, em relação aos demais métodos, no que concerne ao rendimento de proteínas totais solúveis, fato que reflete, diretamente, na quantidade total de proteínas resolvidas por eletroforese bidimensional. Além disso, o método 2 apresenta boa reprodutibilidade, fato confirmado a partir da análise dos géis referentes aos experimentos com plantas controles e inoculadas com o *C. gloeosporioides* (discutidos posteriormente), tendo sido escolhido como o protocolo de extração de proteínas foliares de feijão-de-corda aplicável à eletroforese bidimensional.

4.2 Progressão da interação incompatível entre o genótipo BR-3 e *C. gloeosporioides*, avaliada por Microscopia óptica

Para confirmar a resistência do genótipo BR-3 ao *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1), quando confrontado com o genótipo TE-97, suscetível, foi realizado o experimento de inoculação da suspensão de esporos do patógeno virulento em folhas primárias de ambos os genótipos, e o progresso da doença (antracnose) avaliado.

Após 8 dias da inoculação do patógeno, as folhas do TE-97 apresentaram sintomas evidentes da doença, com ocorrência de necroses no tecido infectado, caracterizadas por manchas marrom avermelhadas, além da senescência foliar (Barreto *et al.*, 2007). Em contrapartida, as folhas do BR-3 não apresentaram sintomas evidentes de antracnose, considerando que não houve proliferação do patógeno, que permaneceu restrito ao sítio de inoculação. A Figura 7 confirma a resistência e suscetibilidade das plantas BR-3 e TE-97, respectivamente, ao isolado LPVD-1, além de reforçar a importância dos métodos de recuperação da patogenicidade do patógeno para experimentos de análise da interação planta-patógeno. Tanto em plantas suscetíveis quanto em plantas resistentes, foi possível observar a presença de apressórios melanizados, estruturas de infecção características de espécies do gênero *Colletotrichum*, envolvidas com a penetração do fungo na planta. Apesar disso, não foi observado o desenvolvimento de hifas em folhas das plantas BR-3, fato observado em folhas das plantas TE-97, que apresentaram sintomas evidentes da doença ocasionados pela infecção, o que confirma a interação compatível.

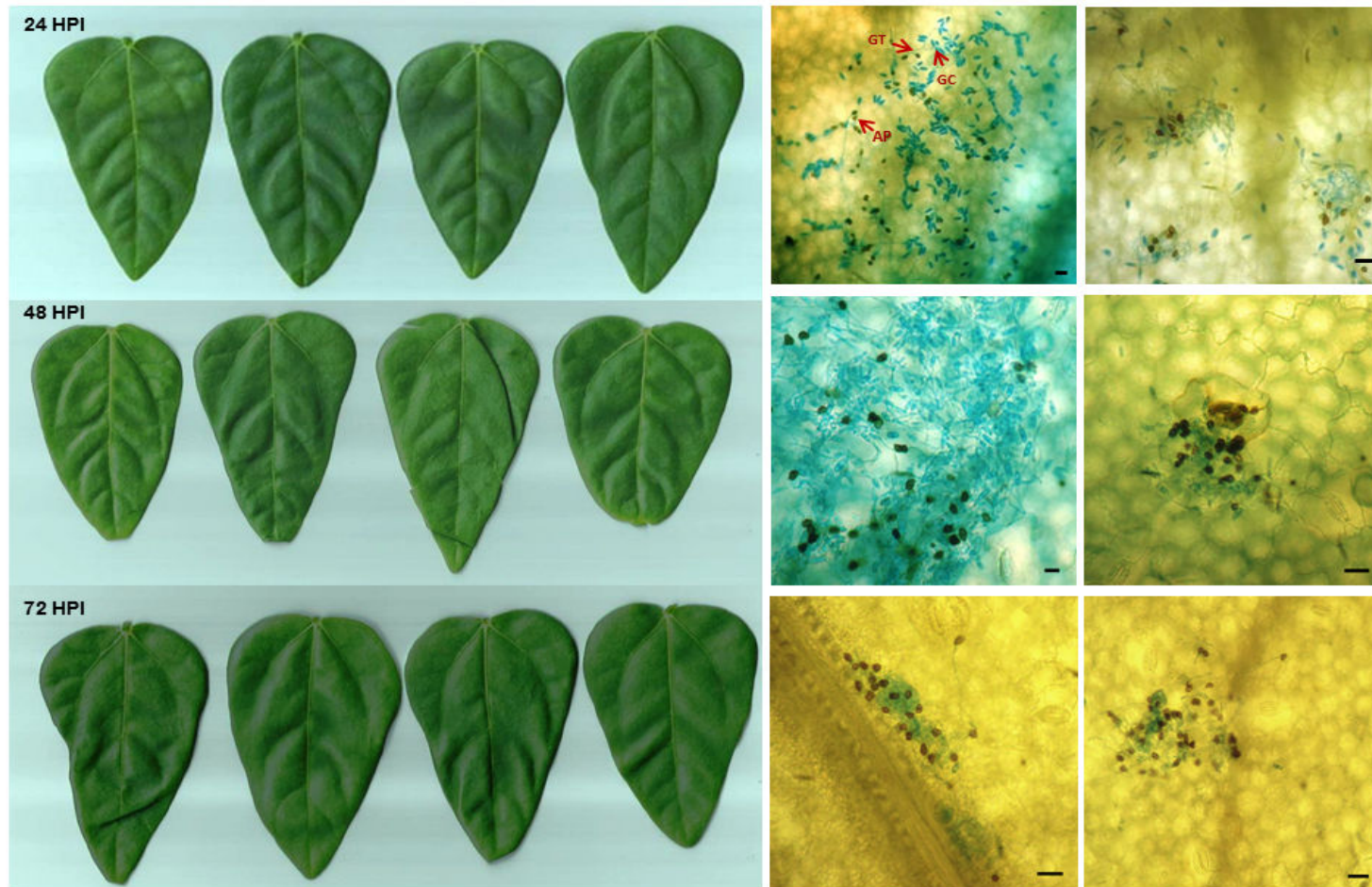
Figura 7 – Aspecto macro- e microscópico de folhas de plantas de feijão-de-corda 8 dias após a inoculação com *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1). (A) Desenvolvimento da doença durante a interação compatível entre o fungo e as plantas TE-97. (B) Interação incompatível entre plantas BR3 e o patógeno. Em ambas as figuras são evidenciadas as estruturas do patógeno. CN – conídio germinado; TG – tubo de germinação; AP – apressório; HF – hifa. Coloração feita com lactofenol azul de anilina. Barra: 20 µm.



Os resultados mostrados na figura 7 corroboram a resistência do genótipo BR-3 ao fungo *C. gloeosporioides*, isolado LPVD-1. A partir disso, foi realizado o experimento de inoculação fúngica das plantas do genótipo BR-3, com o intuito de estudar o proteoma foliar quanto aos mecanismos bioquímicos envolvidos durante a interação incompatível.

A fim de confirmar a presença do patógeno no tecido foliar inoculado, bem como a ausência de sintomas da antracnose nas folhas utilizadas para a análise proteômica, algumas folhas foram coletadas, escaniadas e descoradas para a visualização das estruturas fúngicas nos tempos experimentais analisados: 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI) (Figura 8).

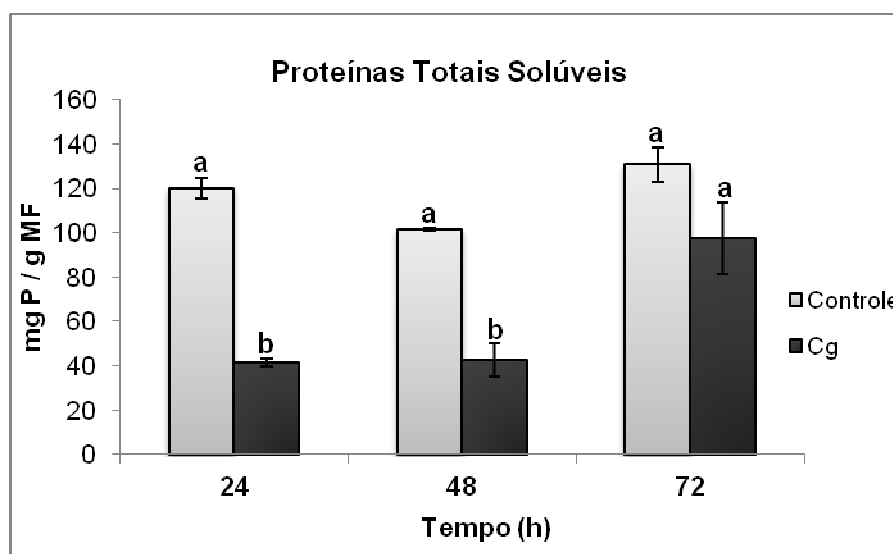
Figura 8 – Aspecto macro- e microscópico de folhas de feijão-de-corda, genótipo BR-3, resistente, inoculadas com o *C. gloeosporioides* (isolado LPVD-1). Esquerda – folhas inoculadas, mas sem os sintomas característicos da antracnose. Direita – Presença das estruturas fúngicas detectadas ao microscópio óptico, onde são vistos conídios germinados (GC); tubo de germinação (GT); e apressórios (AP), conforme mostrado na figura 7. Para a microscopia, as folhas foram despigmentadas e coradas com 0,05% de azul de anilina em lactofenol. Barra: 20 μm .



4.3 Proteoma foliar de feijão-de-corda, genótipo BR-3, nas condições controle e inoculado com o fungo *C. gloeosporioides*

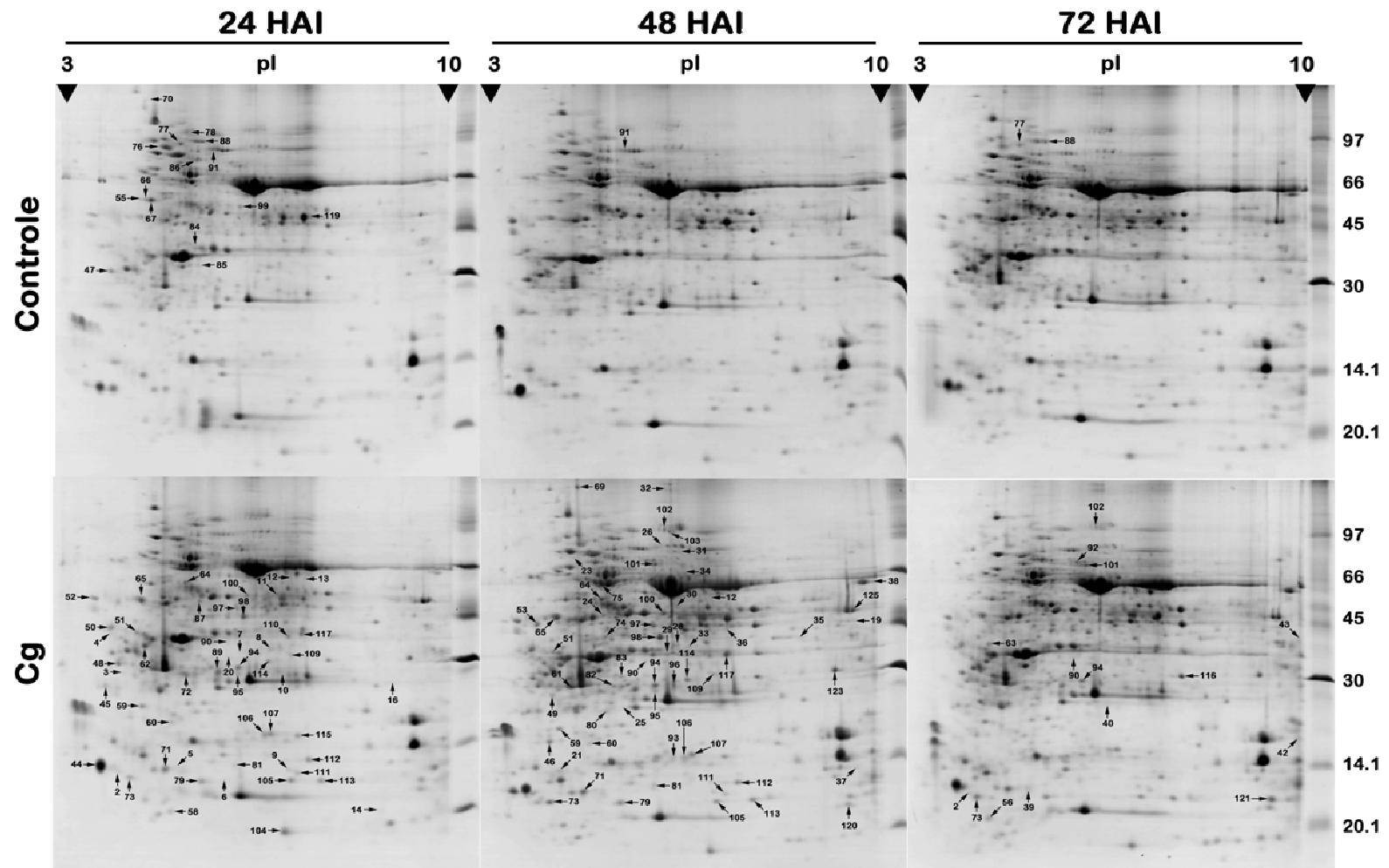
Após a realização do experimento de inoculação do fungo em folhas primárias das plantas do genótipo BR-3 e experimento controle, as folhas foram coletadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a inoculação, conforme descrito anteriormente. As amostras de folhas primárias (3 repetições por tempo experimental) foram pulverizadas em N₂ líquido e submetidas ao processo de extração de proteínas totais utilizando o método 2 (Extração de proteínas com solução tampão Tris-Fenol pH 8,0). Após a obtenção das amostras de proteínas referentes a cada tempo experimental (A1, A2 e A3), foi realizada a dosagem, conforme demonstrado na figura 9.

Figura 9 – Teor de proteínas totais solúveis para os grupos Controle e Cg (inoculado) ao longo de cada tempo experimental. O valor de cada barra representa a média aritmética das três amostras experimentais. Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).



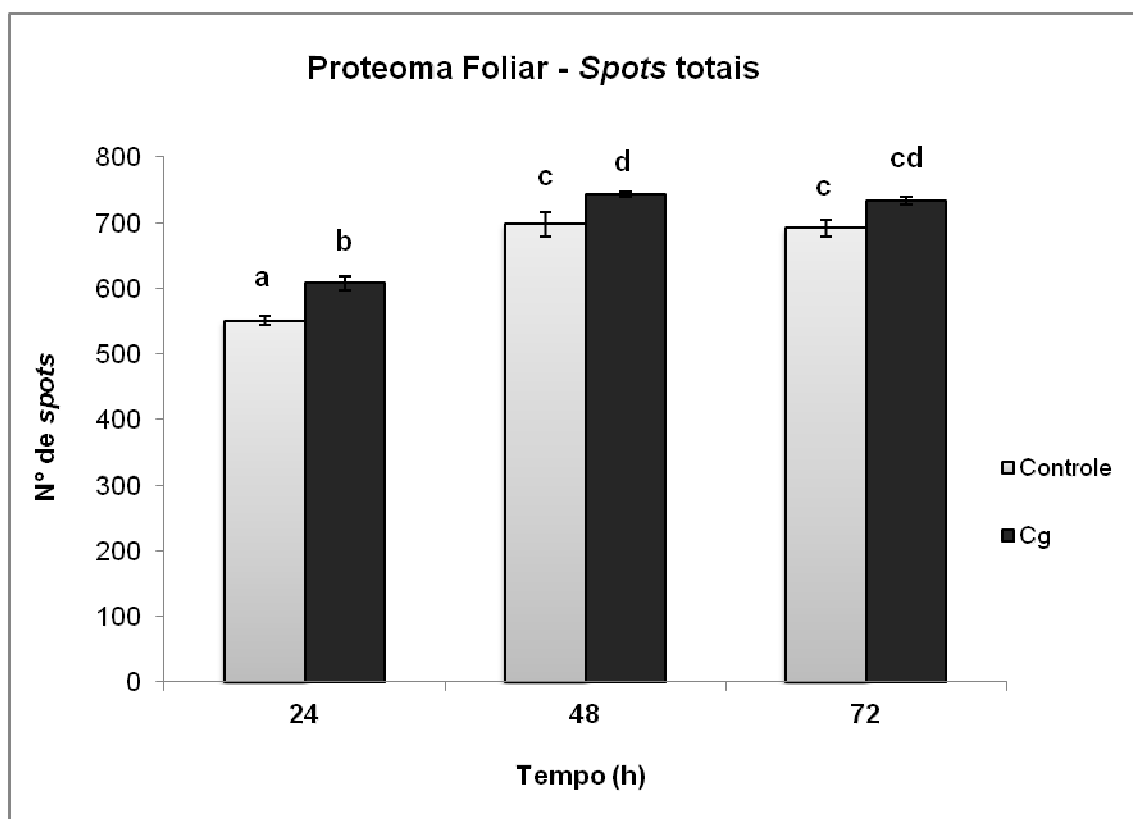
Como já descrito, foi realizada a análise proteômica comparativa entre plantas resistentes inoculadas (grupo denominado Cg) e não inoculadas (grupo controle) com o isolado LPVD-1 do fungo *C. gloeosporioides*. Para cada amostra experimental (A1, A2 e A3), foi obtido um mapa bidimensional, somando-se 6 géis para cada tempo experimental (24, 48 e 72 horas): 3 géis pertencentes ao grupo controle e 3 géis para o grupo inoculado, totalizando 18 géis que foram escaneados e analisados quanto à ocorrência e intensidade dos *spots*, ao longo do tempo (Figura 10).

Figura 10 – Perfil bidimensional das proteínas foliares do feijão-de-corda, genótipo BR-3, referentes aos grupos Controle e Cg (Inoculado com o isolado LPVD-1 do fungo *C. gloeosporioides*). Cada imagem é representativa de um conjunto 3 géis. Amostras de 400 µg de proteínas foram resolvidas em *strips* IPG pH 3-10 (13 cm), gradiente linear e, em seguida, separados SDS-PAGE (12,5%). Os géis foram corados com CBB coloidal. As setas indicam os *spots* diferencialmente expressos em cada tempo experimental. Setas marcadas nos géis referentes ao grupo controle representam proteínas subexpressas.



Com relação ao número total de *spots*, foram encontrados 551 ± 7 e 608 ± 11 para os grupos controle e Cg, respectivamente, referentes ao tempo de 24 horas após a inoculação. Em 48 horas o número total de *spots* se elevou consideravelmente, sendo avaliado em 698 ± 18 para o grupo controle e 743 ± 4 para o grupo Cg. Os géis referentes ao tempo experimental de 72 horas contabilizaram 692 ± 12 e 734 ± 5 para os grupos controle e Cg, respectivamente (Figura 11).

Figura 11 – Número total de *spots* para os grupos Controle e Cg referentes a cada tempo (h). Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) tanto entre os tempos experimentais quanto entre os grupos (Controle e Cg).



Plantas de feijão-de-corda, genótipo BR-3, inoculadas com o patógeno, apresentaram maior número de *spots* contabilizados quando comparadas com as plantas do grupo controle, fato ocorrido nos três tempos experimentais testados. Como consequência disso, a análise estatística da abundância relativa de cada *spot* proteico, ao longo do tempo, revelou que **126 spots** apresentaram expressão

diferencial entre os grupos experimentais (Controle e Cg). A partir disso, tais *spots* foram excisados dos géis bidimensionais, digeridos com tripsina e submetidos à identificação por Espectrometria de Massas (ESI-Q-TOF MS/MS).

A análise por Espectrometria de Massas (MS) identificou **118** proteínas, perfazendo, aproximadamente, 94% da quantidade de *spots* diferencialmente expressos submetidos à análise estatística. Dentre as 118, **102** proteínas apresentaram aumento significativo de expressão em decorrência do estabelecimento da interação incompatível, incluindo **39** proteínas induzidas após o contato com o fungo (não aparecem no grupo controle), além das **63** proteínas que tiveram sua expressão aumentada em comparação com as plantas não inoculadas. Em contrapartida, **16** proteínas apresentaram expressão diminuída após o contato com o fungo. Os *spots* foram numerados de 01 a 126, com o intuito de facilitar a identificação e organização das informações acerca de cada proteína e foram marcados nos perfis bidimensionais cuja expressão foi aumentada (figura 10). **8** *spots* não foram identificados por MS e correspondem aos números 01, 22, 27, 41, 54, 57, 108 e 118.

As proteínas identificadas foram organizadas na tabela 2, conforme a análise da similaridade com outras sequências de proteínas já depositadas no NCBI (banco de dados para pesquisa em bioinformática). Na tabela constam: número do *spot* (denominação feita a partir dos números de identificação fornecidos pelo *software PDQuest*), identidade das proteínas, número de acesso no banco de dados, organismo vegetal de referência, os valores de ponto isoelétrico e massa molecular (teóricos e experimentais), *score*, cobertura da sequência e o índice de variação (calculado com relação aos valores referentes ao grupo controle) de cada proteína no(s) respectivo(s) tempo(s) em que ocorreu expressão diferencial.

Tabela 2 – Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-de-corda, genótipo BR3, após inoculação com o isolado LPVD-1 de *C. gloeosporioides*, após análise por MS/MS e buscas no NCBI.

| Nº do Spot | Proteína | Acesso (NCBI) | Organismo de Referência | Mr / pI Experimental | Mr / pI Teórico | Score (a) | Cobertura (%) | Índice de variação (Cg/controle)(b) | | |
|-------------------------------|--|---------------|------------------------------|----------------------|-----------------|-----------|---------------|-------------------------------------|--------|--------|
| | | | | | | | | 24 hai | 48 hai | 72 hai |
| Metabolismo energético | | | | | | | | | | |
| 10 | Carbonic anhydrase | gi 270342124 | <i>Vigna unguiculata</i> | 26.18/6.78 | 35.44/8.57 | 150 | 14 | 315.1 | | |
| 24 | Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta | gi 356537120 | <i>Glycine max</i> | 46.77/4.86 | 45.31/5.89 | 252 | 11 | 596.1 | | |
| 28 | Vacuolar ATPase subunit E | gi 29290712 | <i>Phaseolus acutifolius</i> | 35.58/6.28 | 25.8/6.46 | 181 | 17 | 384.05 | | |
| 33 | Vacuolar ATPase subunit E | gi 29290712 | <i>Phaseolus acutifolius</i> | 35.58/6.28 | 25.8/6.46 | 181 | 17 | 281.55 | | |
| 30 | Isocitrate dehydrogenase [NADP]-like | gi 147820675 | <i>Vitis vinifera</i> | 49.77/6.23 | 54.67/7.6 | 56 | 8 | 335.75 | | |
| 35 | Malate dehydrogenase mitochondrial-like | gi 356517066 | <i>Glycine max</i> | 38.28/8.37 | 28.74/9.58 | 82 | 4 | 476.9 | | |
| 36 | ATP synthase gamma subunit | gi 114640 | <i>Pisum sativum</i> | 41.93/7.19 | 41.38/5.6 | 56 | 2 | 785.2 | | |
| 59 | ATP synthase delta chain, chloroplastic-like | gi 356514035 | <i>Glycine max</i> | 22.40/4.03 | 26.83/6.92 | 185 | 16 | 3,24 | 5,19 | |
| 55 | Fructose-1,6-bisphosphatase | gi 115452127 | <i>Oryza sativa</i> | 52.08/3.95 | 43.57/5.0 | 98 | 15 | 0.317 | | |
| 66 | Fructose-1,6-bisphosphatase | gi 225440564 | <i>Vitis vinifera</i> | 52.62/4.04 | 44.63/5.3 | 215 | 11 | 0.476 | | |

| | | | | | | | | | |
|-----|---|--------------|----------------------------|------------|-------------|------|----|-------|------|
| 67 | Fructose-1,6-bisphosphatase | gij356568028 | <i>Glycine max</i> | 52.49/4.15 | 44.61/5.25 | 448 | 31 | 0.460 | |
| 75 | ATP synthase CF1 beta subunit | gij393396089 | <i>Vigna unguiculata</i> | 59.10/4.81 | 53.74/5.2 | 1125 | 54 | | 2.3 |
| 80 | IMP dehydrogenase/GMP reductase, putative | gij124359898 | <i>Medicago truncatula</i> | 24.19/4.91 | 86.21/6.43 | 57 | 3 | | 1.87 |
| 86 | V-type proton ATPase catalytic subunit A-like | gij356521645 | <i>Glycine max</i> | 70.23/5.05 | 68.73/5.35 | 503 | 17 | | 0.32 |
| 89 | Triosephosphate isomerase, chloroplastic-like | gij356572486 | <i>Glycine max</i> | 26.67/5.46 | 33.14/6.35 | 312 | 12 | | 2.19 |
| 91 | Transketolase | gij356576867 | <i>Glycine max</i> | 76.75/5.37 | 80.00/6.03 | 397 | 9 | 0.58 | 0.54 |
| 92 | Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit 1 | gij356496761 | <i>Glycine max</i> | 69.95/5.69 | 69.25/6.2 | 177 | 5 | | 1.64 |
| 95 | PREDICTED: triosephosphate isomerase, chloroplastic-like | gij356572486 | <i>Glycine max</i> | 26.46/5.85 | 33.14/6.35 | 201 | 11 | 2.47 | 1.45 |
| 96 | Carbonic anhydrase | gij422034742 | <i>Vigna unguiculata</i> | 27.27/6.20 | 35.43/8.09 | 505 | 43 | | 2.26 |
| 97 | Lactate/malate dehydrogenase family protein | gij508714144 | <i>Theobroma cacao</i> | 42.68/5.81 | 35.69/6.6 | 406 | 25 | 3.33 | 2.45 |
| 98 | PREDICTED: fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic-like | gij356545061 | <i>Glycine max</i> | 38.25/5.93 | 42.84/6.86 | 645 | 39 | 2.28 | 2.1 |
| 99 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit | gij351726690 | <i>Vigna unguiculata</i> | 49.87/5.89 | 48.19/7.1 | 446 | 13 | | 0.16 |
| 103 | PREDICTED: aconitate hydratase, cytoplasmic-like | gij356550020 | <i>Glycine max</i> | 86.63/6.11 | 107.04/7.28 | 385 | 15 | | 2.69 |
| 117 | Malate dehydrogenase | gij357476083 | <i>Medicago truncatula</i> | 32.38/7.19 | 37.28/7.05 | 284 | 7 | 1.63 | 2.65 |
| 119 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A subunit | gij351721288 | <i>Glycine max</i> | 46.39/7.22 | 43.19/8.42 | 717 | 38 | | 0.35 |

| Fotossíntese | | | | | | | | |
|---------------------|--|---------------|------------------------------------|-------------|------------|-----|----|--------|
| 09 | Putative oxygen evolving complex protein | gij 22165105 | <i>Oryza sativa Japonica Group</i> | 17.68/6.90 | 19.77/7.88 | 68 | 6 | 233.6 |
| 15 | Photosystem II 10 kDa polypeptide isoform 1 | gij 449460036 | <i>Cucumis sativus</i> | 13.77/9.41 | 14.26/9.63 | 72 | 16 | 648.3 |
| 16 | Oxygen-evolving enhancer protein | gij 357494079 | <i>Medicago truncatula</i> | 25.99/8.99 | 29.18/9.08 | 85 | 5 | 326.16 |
| 29 | Oxygen-evolving enhancer protein 1 | gij 356559442 | <i>Glycine max</i> | 32.78/6.07 | 35.03/6.66 | 54 | 5 | 193.2 |
| 20 | Protein thylakoid formation 1, chloroplastic-like | gij 356543780 | <i>Glycine max</i> | 28.34/5.70 | 27.74/8.52 | 88 | 5 | 145.6 |
| 21 | Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I | gij 115768 | <i>Cucumis sativus</i> | 18.59/4.04 | 27.21/5.14 | 84 | 5 | 1301.6 |
| 26 | Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit | gij 3914561 | <i>Vigna unguiculata</i> | 78.47/5.94 | 52.46/6.23 | 131 | 6 | 233.75 |
| 32 | Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit | gij 393396088 | <i>Vigna unguiculata</i> | 117.95/6.04 | 52.68/6.13 | 186 | 9 | 1116 |
| 40 | 23kDa polypeptide of the oxygen evolving complex of photosystem II | gij 146454486 | <i>Sonneratia alba</i> | 24.34/6.35 | 25.19/5.98 | 53 | 7 | 233 |
| 42 | Electron transporter, putative | gij 255557945 | <i>Ricinus communis</i> | 22.29/9.97 | 28.67/9.68 | 62 | 6 | 912 |
| 44 | Plastocyanin | gij 130277 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | 17.10/3.40 | 17.22/5.66 | 113 | 22 | 2.2 |
| 61 | LHCII type I chlorophyll a/b binding protein | gij 8954293 | <i>Vigna radiata</i> | 27.04/4.25 | 27.9/5.29 | 200 | 11 | 2.3 |
| 64 | Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1 | gij 12620881 | <i>Gossypium hirsutum</i> | 52.55/4.82 | 47.95/5.54 | 351 | 18 | 3.06 |
| 69 | LHCII type I chlorophyll a/b-binding protein | gij 9587205 | <i>Vigna radiata</i> | 119.92/4.37 | 27.94/5.14 | 196 | 11 | 6.45 |

| | | | | | | | | | |
|--|---|--------------|--------------------------------|------------|------------|-----|----|-------|------|
| 83 | PsbP domain-containing protein 5 | gi 22326731 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 28.19/5.21 | 33.34/8.83 | 94 | 14 | 2.39 | 1.87 |
| 84 | Ferredoxin-NADP reductase, putative | gi 255586297 | <i>Ricinus communis</i> | 34.50/5.00 | 38.36/9.00 | 139 | 7 | 0.24 | |
| 100 | Putative rubisco activase | gi 149941202 | <i>Vigna unguiculata</i> | 47.51/6.01 | 27.95/8.31 | 660 | 58 | 2.9 | 3.23 |
| 101 | Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit | gi 77798410 | <i>Passiflora odontophylla</i> | 68.15/5.85 | 49.59/6.3 | 165 | 12 | | 1.18 |
| 104 | Photosystem I subunit VII | gi 7525086 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 12.90/6.89 | 90.32/6.67 | 208 | 62 | 1.59 | |
| 112 | NAD(P)H:plastoquinone dehydrogenase complex subunit O | gi 18410719 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 17.63/7.41 | 17.64/9.23 | 51 | 5 | 1.9 | |
| 120 | PREDICTED: thylakoid lumenal protein At1g03610 | gi 356543813 | <i>Glycine max</i> | 15.96/9.51 | 23.87/9.77 | 359 | 5 | 2.88 | 1.5 |
| 121 | Photosystem II oxygen-evolving complex protein 3 | gi 350536937 | <i>Solanum lycopersicum</i> | 16.57/9.54 | 24.55/9.64 | 203 | 13 | | 1.95 |
| 122 | PREDICTED: photosystem I reaction center subunit II | gi 225437028 | <i>Vitis vinifera</i> | 21.70/9.39 | 22.54/9.76 | 391 | 39 | 3.28 | |
| 124 | Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO1-like | gi 359806771 | <i>Glycine max</i> | 48.77/9.49 | 40.76/9.16 | 965 | 51 | 2.22 | |
| 125 | Peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO1-like | gi 359806771 | <i>Glycine max</i> | 49.18/9.60 | 40.76/9.16 | 997 | 40 | 4.9 | 1.73 |
| 126 | Glycolate oxidase | gi 228403 | <i>Lens culinaris</i> | 52.86/9.11 | 40.85/9.38 | 60 | 4 | 4.15 | |
| Metabolismo e Enovelamento de Proteínas | | | | | | | | | |
| 03 | Proteasome subunit alpha type-5-A | gi 15220961 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 26.04/3.72 | 25.93/4.7 | 55 | 5 | 247.7 | |
| 49 | Proteasome subunit alpha type-5-A | gi 15220961 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 25.93/3.89 | 25.93/4.7 | 196 | 17 | | 2.62 |

| | | | | | | | | | |
|-------------------------|--|--------------|----------------------------|------------|------------|-----|----|--------|------|
| 109 | PREDICTED: Proteasome subunit alpha type-7-like | gij356559270 | <i>Glycine max</i> | 28.52/6.95 | 27.17/6.92 | 252 | 25 | 1.56 | 1.87 |
| 11 | Aspartate aminotransferase | gij777387 | <i>Medicago sativa</i> | 48.60/6.67 | 49.85/7.68 | 275 | 13 | 1465.8 | |
| 14 | 10 kDa Chaperonin | gij358344787 | <i>Medicago truncatula</i> | 14.35/8.81 | 10.61/8.04 | 114 | 28 | 201.8 | |
| 37 | Cyclophilin | gij289780455 | <i>Vigna mungo</i> | 18.93/9.67 | 18.25/8.61 | 80 | 16 | 241.8 | |
| 65 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38 | gij356571435 | <i>Glycine max</i> | 46.15/3.97 | 48.7/5.07 | 555 | 31 | 2.98 | 1.65 |
| 74 | 60S acidic ribosomal protein P0 | gij351725493 | <i>Glycine max</i> | 38.35/4.89 | 34.13/5.15 | 280 | 16 | 3.03 | |
| 87 | Glutamine synthetase | gij452916816 | <i>Vigna unguiculata</i> | 45.91/5.10 | 39.48/5.7 | 103 | 9 | 2.32 | |
| 88 | PREDICTED: chaperone protein ClpC, isoform 1 | gij356508861 | <i>Glycine max</i> | 82.09/5.15 | 10.24/6.16 | 951 | 22 | 0.39 | |
| 106 | Isomerase peptidyl-prolyl cis-trans | gij224057792 | <i>Populus Trichocarpa</i> | 19.70/6.40 | 28.14/9.4 | 162 | 10 | 1.73 | 1.93 |
| 107 | PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase isoform 2 | gij356576933 | <i>Glycine max</i> | 20.04/6.54 | 22.7/9.1 | 237 | 19 | 1.86 | 1.74 |
| 115 | Peptidylprolyl isomerase | gij210062274 | <i>Ipomoea batatas</i> | 19.84/7.16 | 27.64/9.33 | 98 | 7 | 3.94 | |
| Homeostase Redox | | | | | | | | | |
| 05 | Peroxisredoxin IIE | gij255575353 | <i>Ricinus communis</i> | 17.04/4.70 | 23.77/7.63 | 120 | 17 | 524.36 | |
| 71 | Peroxisredoxin IIE | gij255575353 | <i>Ricinus communis</i> | 16.88/4.48 | 23.77/7.63 | 223 | 17 | 1.61 | 1.51 |
| 18 | Putative quinone oxidoreductase, chloroplastic-like | gij356523576 | <i>Glycine max</i> | 44.94/9.51 | 43.21/6.64 | 65 | 2 | 114.26 | |

| | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---|--------------|----------------------------|------------|------------|-----|-----|--------|----------|
| 19 | Putative quinone oxidoreductase, chloroplastic-like | gij356523576 | <i>Glycine max</i> | 45.19/9.62 | 43.21/6.64 | 65 | 2 | 382.3 | 324 |
| 23 | PREDICTED: nucleoredoxin 1-like | gij356526803 | <i>Glycine max</i> | 71.54/4.30 | 24.10/5.01 | 97 | 11 | 4.05 | |
| 34 | Ferric leghemoglobin reductase | gij5823556 | <i>Vigna unguiculata</i> | 63.84/6.40 | 55.74/8.08 | 228 | 10 | 600.25 | |
| 50 | Anionic peroxidase | gij415475 | <i>Glycine max</i> | 34.13/3.49 | 15.18/5.74 | 86 | 100 | 2.65 | |
| 58 | Thioredoxin M-type | gij356551189 | <i>Glycine max</i> | 13.90/4.61 | 24.03/8.38 | 174 | 17 | 1.86 | |
| 79 | Thioredoxin-like protein | gij272716025 | <i>Viola biflora</i> | 16.07/5.19 | 89.49/9.06 | 110 | 25 | 1.69 | 1.6 |
| 62 | Fruit protein pKIWI502 | gij357444597 | <i>Medicago truncatula</i> | 29.70/4.05 | 42.49/8.66 | 178 | 5 | 1.88 | |
| 72 | Fe-Superoxide Dismutase | gij6840824 | <i>Vigna unguiculata</i> | 26.44/4.81 | 27.39/5.31 | 363 | 29 | 1.92 | |
| 93 | Cu-Zn Superoxide dismutase | gij45643751 | <i>Citrullus lanatus</i> | 19.69/6.18 | 15.02/5.05 | 91 | 11 | 2.16 | |
| 94 | Cytosolic ascorbate peroxidase | gij1420938 | <i>Vigna unguiculata</i> | 27.11/5.84 | 27.01/5.64 | 478 | 59 | 1.74 | 2.12 1.4 |
| Resposta ao estresse | | | | | | | | | |
| 02 | Glycine-rich RNA binding protein 1 | gij6911142 | <i>Catharanthus roseus</i> | 16.38/3.68 | 14.15/8.71 | 52 | 6 | 541 | 544.9 |
| 08 | S-formylglutathione hydrolase | gij356500537 | <i>Glycine max</i> | 29.28/6.49 | 32.10/6.55 | 75 | 6 | 305.8 | |
| 25 | Small heat-shock protein, putative | gij255553171 | <i>Ricinus communis</i> | 24.70/5.23 | 26.72/7.79 | 70 | 4 | 596.1 | |
| 46 | Translationally-controlled tumor protein, TCTP | gij115502853 | <i>Cucurbita maxima</i> | 21.18/3.84 | 19.03/4.55 | 111 | 17 | 3.34 | |

| | | | | | | | | | |
|----------------------------|--|--------------|-----------------------------|------------|------------|-----|----|--------|----------|
| 60 | Heat shock 22 kDa protein | gi 1170368 | <i>Pisum sativum</i> | 20.99/4.61 | 22.86/7.90 | 62 | 5 | 2.46 | 2.45 |
| 63 | Late embryogenesis abundant protein, group 2 | gi 15224810 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 34.72/4.09 | 36.01/4.69 | 179 | 12 | | 2.62 |
| 68 | Heat shock cognate 90 kDa protein-like | gi 356495574 | <i>Glycine max</i> | 83.40/4.18 | 90.05/4.94 | 875 | 24 | 0.21 | |
| 76 | Heat shock protein 90 | gi 46093890 | <i>Nicotiana tabacum</i> | 78.96/4.40 | 80.07/4.95 | 325 | 7 | 0.5 | |
| 85 | Chloroplast drought-induced stress protein | gi 302120398 | <i>Vigna radiata</i> | 29.71/5.10 | 33.68/5.90 | 139 | 15 | 0.3 | |
| Defesa | | | | | | | | | |
| 07 | Cysteine Protease | gi 50355621 | <i>Daucus carota</i> | 29.17/5.91 | 39.48/5.34 | 67 | 3 | 115.9 | |
| 12 | Allene oxide synthase, chloroplastic-like | gi 356543668 | <i>Glycine max</i> | 53.24/6.90 | 25.09/8.74 | 119 | 10 | 123.7 | 76.6 |
| 13 | Allene oxide synthase, chloroplastic-like | gi 356543668 | <i>Glycine max</i> | 53.20/7.22 | 25.09/8.74 | 106 | 10 | 102.06 | |
| 45 | Cysteine proteinase RD21a-like | gi 356564154 | <i>Glycine max</i> | 24.20/3.45 | 52.08/5.55 | 91 | 5 | 3.99 | |
| 48 | Chitinase 2 | gi 35749992 | <i>Glycine max</i> | 27.15/3.63 | 34.03/5.14 | 102 | 17 | 2.72 | 1.55 |
| 53 | Ankyrin repeat domain-containing protein 2 isoform 1 | gi 508707078 | <i>Theobroma cacao</i> | 43.40/3.61 | 37.31/4.46 | 107 | 31 | | 2.11 |
| 73 | Pathogenesis-related protein 10 | gi 1449405 | <i>Vigna unguiculata</i> | 16.11/3.85 | 16.3/4.7 | 283 | 29 | 6 | 7 4.5 |
| 90 | Remorin-like | gi 356575961 | <i>Glycine max</i> | 30.19/5.66 | 32.60/7.21 | 89 | 11 | 1.18 | 3.39 4.6 |
| Sinalização celular | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|--|---|--------------|-----------------------------|------------|-------------|-----|----|------|--------|
| 04 | Serine/threonine protein kinase | gi 357489005 | <i>Medicago truncatula</i> | 31.89/3.51 | 80.67/8.24 | 55 | 2 | 527 | |
| 39 | G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase RLK1-like | gi 460366084 | <i>Solanum lycopersicum</i> | 16.67/4.86 | 93.12/6.18 | 53 | 1 | | 395 |
| 81 | G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase RLK1-like | gi 460366084 | <i>Solanum lycopersicum</i> | 17.36/5.82 | 93.12/6.18 | 53 | 1 | 2.68 | 1.97 |
| 105 | Nucleoside diphosphate kinase NDPK1 | gi 26245395 | <i>Glycine max</i> | 16.17/7.01 | 16.34/6.91 | 140 | 25 | 1.48 | 1.34 |
| 110 | Annexin-like protein | gi 357514981 | <i>Medicago truncatula</i> | 31.96/6.87 | 42.31/8.89 | 166 | 8 | 4.25 | |
| 111 | Nucleoside diphosphate kinase 2 NDPK2 | gi 266607 | <i>Spinacea oleracea</i> | 16.74/7.17 | 26.09/9.11 | 151 | 14 | 2.19 | 1.93 |
| 113 | PREDICTED: nucleoside diphosphate kinase IV | gi 460398169 | <i>Solanum lycopersicum</i> | 16.31/7.70 | 25.46/9.69 | 221 | 20 | 1.53 | 1.37 |
| Regulação e Metabolismo de Ácidos nucleicos | | | | | | | | | |
| 06 | DNA mismatch repair protein MSH1 | gi 470123867 | <i>Fragaria vesca</i> | 16.18/5.61 | 14.2/6.32 | 53 | 11 | 1.43 | |
| 31 | Glycyl-tRNA synthetase, putative | gi 255543218 | <i>Ricinus communis</i> | 74.56/6.32 | 77.21/6.6 | 62 | 1 | | 152.15 |
| 38 | Elongation factor-1 alpha 2 | gi 5917745 | <i>Lilium longiflorum</i> | 60.03/9.96 | 49.42/9.15 | 120 | 6 | | 256 |
| 43 | Alba-like protein C9orf23 homolog | gi 356516323 | <i>Glycine max</i> | 41.40/9.99 | 26.95/10.12 | 53 | 4 | | 326 |
| 47 | Ribonucleoprotein | gi 356508744 | <i>Glycine max</i> | 27.98/3.53 | 29.71/6.54 | 187 | 16 | | 0.41 |
| 77 | Elongation factor EF-G | gi 18407650 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 81.05/4.70 | 86.00/5.43 | 278 | 6 | 0.24 | 0.4 |
| 78 | Cell division cycle protein 48 | gi 381145559 | <i>Camellia sinensis</i> | 89.77/4.83 | 89.84/5.16 | 346 | 7 | 0.13 | |

| | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|---|--------------|-----------------------------|-------------|------------|-----|----|--------|------|
| 102 | PREDICTED: elongation fator 2-like | gi 356525774 | <i>Glycine max</i> | 87.74/6.02 | 93.98/5.8 | 344 | 9 | 2.5 | 2.02 |
| Transporte e Estrutura Celular | | | | | | | | | |
| 17 | Mitochondrial outer membrane protein porin 6 | gi 502150214 | <i>Cicer arietinum</i> | 29.49/9.58 | 30.03/9.07 | 107 | 6 | 149.96 | |
| 52 | Plastoglobulin-1 | gi 356496253 | <i>Glycine max</i> | 44.71/3.24 | 24.0/9.77 | 118 | 13 | 2.06 | |
| 56 | Profilin-2 ZmPRO2 | gi 548597 | <i>Zea mays</i> | 14.49/4.10 | 14.11/4.92 | 67 | 9 | | 1.6 |
| 82 | Actin depolymerizing factor 11 | gi 15223471 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 27.02/5.06 | 16.33/5.54 | 65 | 9 | 2.22 | |
| 116 | Voltage-dependent anion channel | gi 152031980 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | 28.17/7.78 | 64.14/9.82 | 79 | 23 | | 1.3 |
| 123 | Peroxisomal voltage-dependent anion-selective channel protein | gi 351725579 | <i>Glycine max</i> | 29.04/9.25 | 29.75/8.57 | 129 | 23 | 2 | 1.86 |
| Não conhecidas | | | | | | | | | |
| 51 | PREDICTED: unknown protein DS12 from 2D-PAGE of leaf | gi 356557247 | <i>Glycine max</i> | 33.26/3.91 | 31.27/5.13 | 261 | 11 | 1.68 | 2.28 |
| 70 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC100792883 | gi 356544363 | <i>Glycine max</i> | 107.96/3.99 | 14.95/4.69 | 98 | 1 | 0.34 | |
| 114 | Unknown | gi 388491410 | <i>Lotus japonicus</i> | 27.82/6.45 | 26.96/6.63 | 249 | 28 | 2.14 | .21 |

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

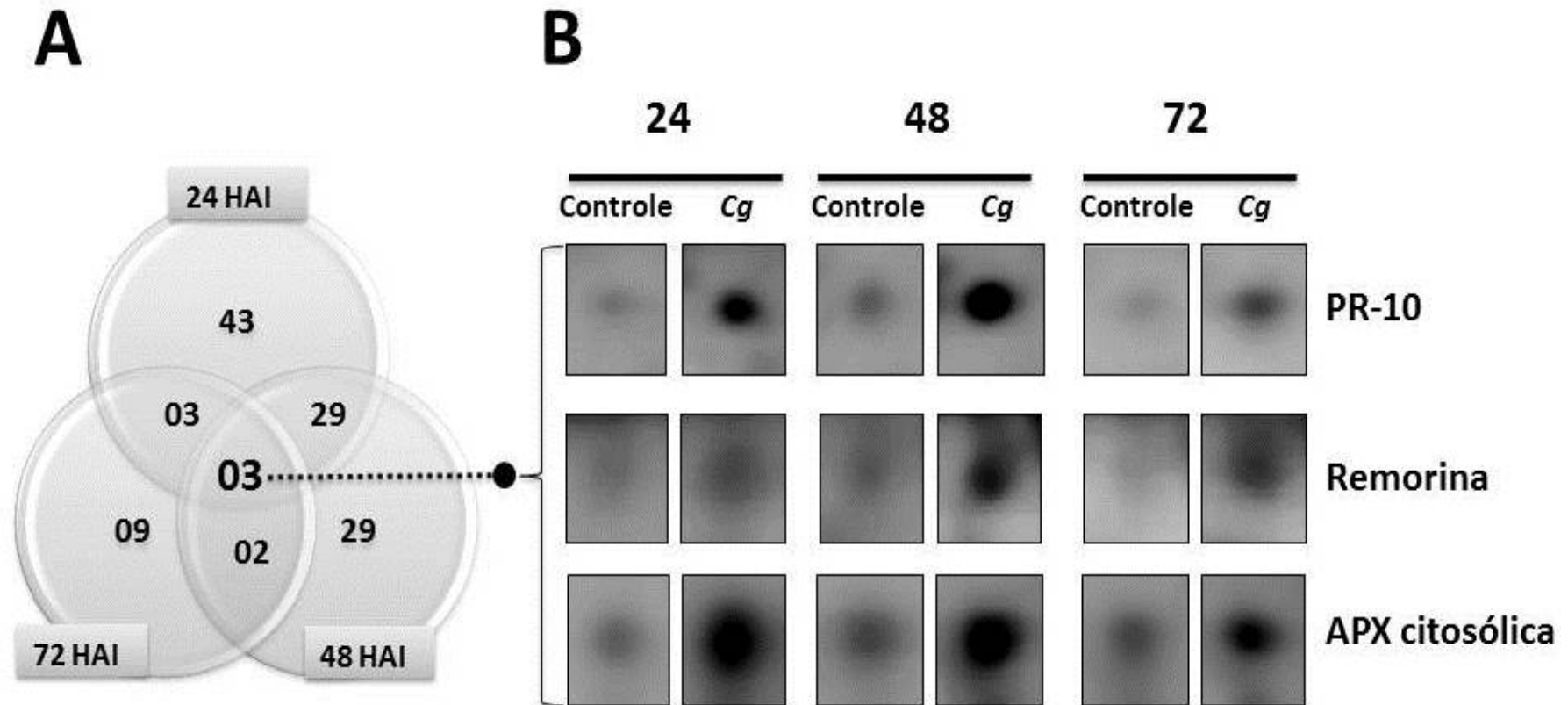
(b) Índice de variação de cada *spot* ao longo do tempo. Valor calculado a partir da divisão da média da intensidade dos *spots* nos géis do grupo inoculado pela respectiva intensidade nos géis do grupo controle.

A partir da análise dos dados relativos à intensidade dos *spots* em cada gel, fornecidos pelo *software* PDQuest, foi calculado o índice de variação de cada proteína com expressão diferencial em comparação aos respectivos valores de intensidade do *spot* nos géis referentes ao grupo de plantas não inoculadas.

Conforme citado anteriormente, a análise comparativa dos géis 2D para as duas condições experimentais (controle e inoculado com o fungo) permitiu a identificação de 39 proteínas que tiveram sua expressão induzida exclusivamente em decorrência da interação incompatível, sendo 16 induzidas apenas em 24 HAI, 2 proteínas induzidas em 24 e 48 HAI, 16 induzidas apenas em 48 HAI, 4 induzidas em 72 HAI e 1 proteína induzida em 24 e 72 HAI. Essas proteínas foram numeradas de 02 a 43, considerando que os *spots* nº 01, 22, 27 e 41 não foram identificados por MS. Por terem sido induzidas após a inoculação, tais proteínas apresentaram alto índice de variação (mostrado na tabela 2), haja vista a ausência de expressão de tais proteínas nas plantas do grupo controle.

A maioria das proteínas apresentou expressão diferencial em 24 e 48 horas após a inoculação do patógeno. O diagrama da Figura 12 representa o total de proteínas diferenciais exclusivas para cada tempo experimental, além de ressaltar a grande quantidade de proteínas expressas, simultaneamente, em dois tempos experimentais. Além disso, a figura 12 resalta as 3 proteínas que apresentaram diferenças de expressão em plantas inoculadas para os três tempos experimentais: Proteína relacionada à Patogênese – família 10 (PR-10), Remorina e Peroxidase do Ascorbato, isoforma citosólica.

Figura 12 – Total de *spots* diferenciais entre os tempos experimentais. A – Diagrama mostrando sobreposições entre o número de proteínas diferencialmente expressas identificadas por MS em cada tempo experimental (24, 48 e 72 horas após inoculação). B – Mudanças no padrão de expressão das proteínas com expressão diferencial em todos os tempos.

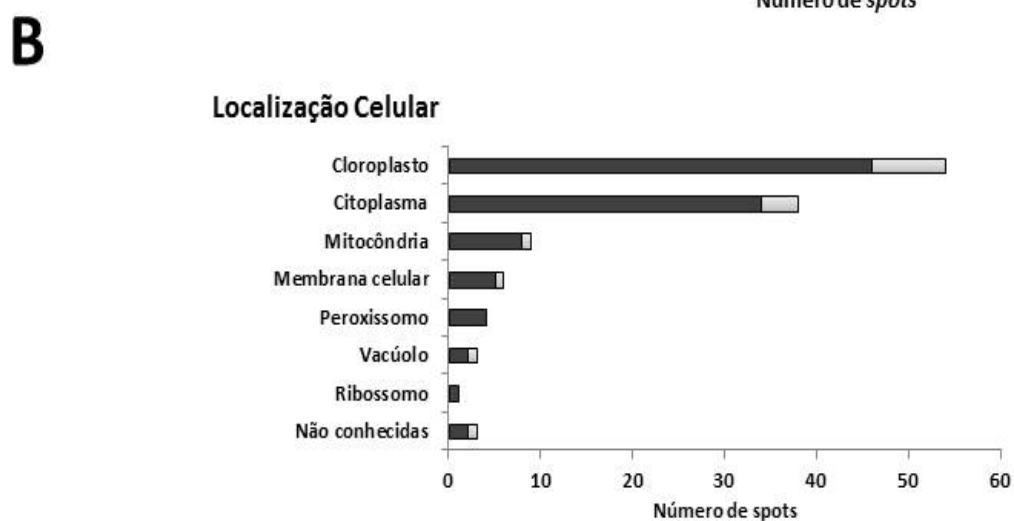
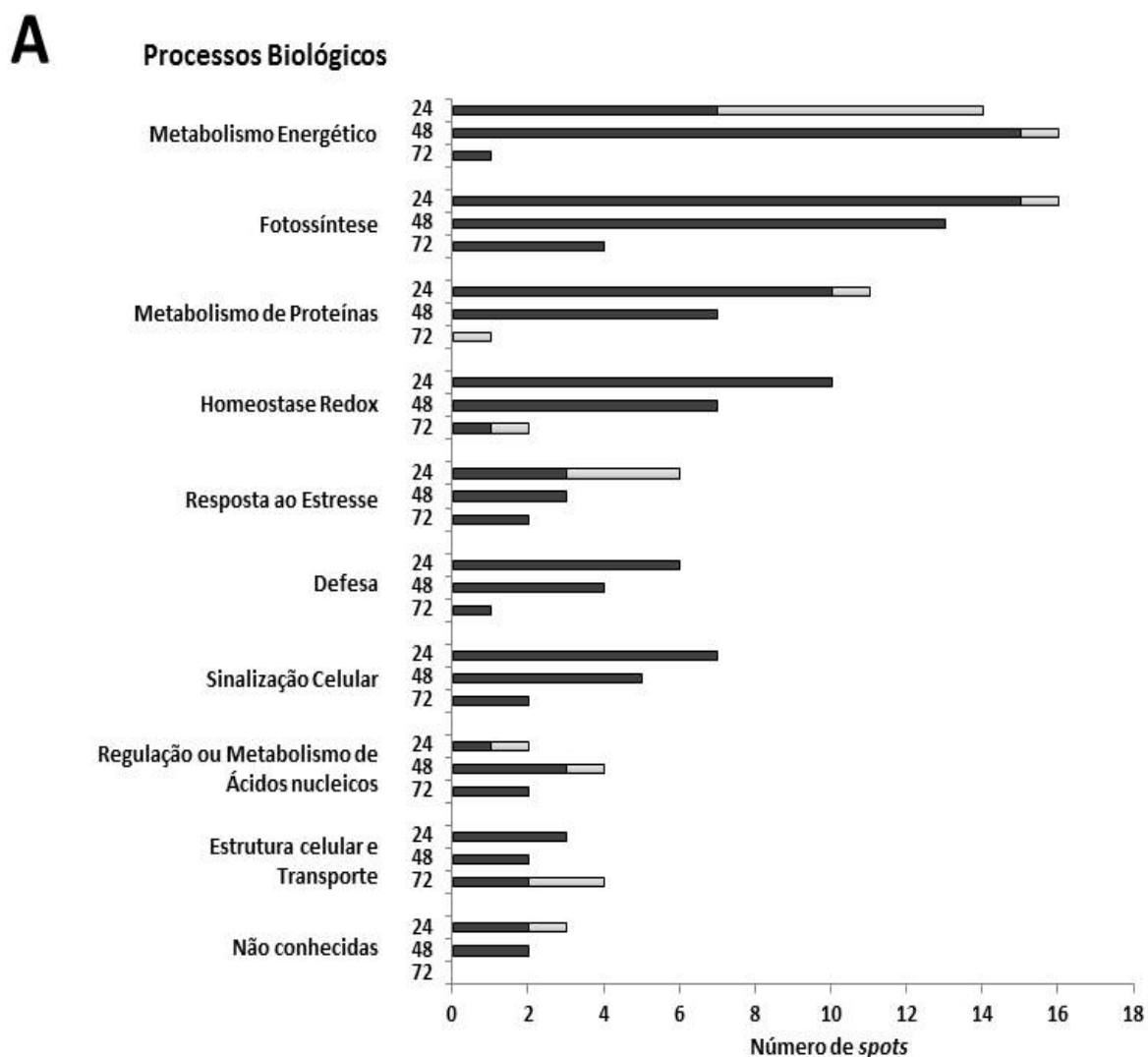


Após a inoculação com o fungo, plantas de feijão-de-corda resistente ao patógeno mostraram ativação da expressão e repressão de genes associados com uma grande diversidade de proteínas envolvidas em diversos processos celulares, que garantem a homeostase do vegetal durante a interação incompatível, tais como: Metabolismo energético (25), fotossíntese (26), metabolismo e enovelamento de proteínas (13), regulação e metabolismo de ácidos nucleicos (8), homeostase redox (13), resposta ao estresse (9), defesa e resistência à doença (8), sinalização celular (7), transporte transmembrana e estrutura celular (6), conforme mostrado na Tabela 2. Grande parte das proteínas identificadas está relacionada com o metabolismo energético e fotossíntese, considerando a diversidade de proteínas vegetais envolvidas com esses processos, bem como a importância dos mesmos para o crescimento e desenvolvimento da planta.

No que concerne à localização celular, a maior parte das proteínas identificadas são encontradas nos cloroplastos (54) e no citoplasma (38), além das proteínas localizadas nas mitocôndrias (9), vacúolo (3), peroxissomos (4), ribossomos (1) e membrana celular (6). Do total de 118 proteínas identificadas, 3 apresentam identidade desconhecida, apesar da sequência estar depositada nos bancos de dados.

A Figura 13 representa a classificação das proteínas quanto aos processos celulares que desempenham bem como a localização celular, destacando a quantidade de proteínas, em cada categoria, que tiveram a expressão aumentada após o contato com o patógeno (*“up-regulated”*), daquelas cuja expressão diminuiu nas plantas inoculadas em comparação com as plantas controle (*“down-regulated”*), ressaltando as diferenças de expressão ao longo dos tempos experimentais.

Figura 13 – Classificação das proteínas identificadas, após MS/MS e buscas no NCBI, quanto aos processos biológicos e localização celular, destacando a expressão diferencial ao longo do tempo. Barras em cinza claro representam as proteínas subexpressas; barras escuras representam proteínas superexpressas em decorrência da inoculação do fungo.



De modo geral, é válido mencionar a diversidade de proteínas diferencialmente expressas envolvidas em vias de resposta ao estresse, sinalização celular, defesa e resistência à doença e manutenção da homeostase redox, considerando a importância desses processos durante a interação planta-patógeno. Nesse contexto, algumas proteínas devem ser citadas.

Na categoria resposta ao estresse, merece destaque a expressão de proteínas como a proteína abundante nos estágios finais da embriogênese (*LEA protein = Late embryogenesis abundant protein, group 2*), proteína de tumor traducionalmente controlada (*TCTP = Translationally-controlled tumor protein*) e proteína ligante a RNA rica em glicina (*Glycine-rich RNA binding protein*), além das proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*).

Com relação às vias de sinalização celular, foram encontradas 7 proteínas com expressão diferenciada, enfatizando-se quinase serina/treonina, anexina e três proteínas quinases do tipo nucleosídeo difosfato (NDPK).

As proteínas relacionadas com a defesa vegetal, englobam 2 proteases cisteínicas, quitinase II, 2 isoformas da enzima aleno óxido sintase, proteína contendo o domínio ankirina e as proteínas remorina e PR-10, que apresentaram expressão diferencial ao longo dos três tempos experimentais testados.

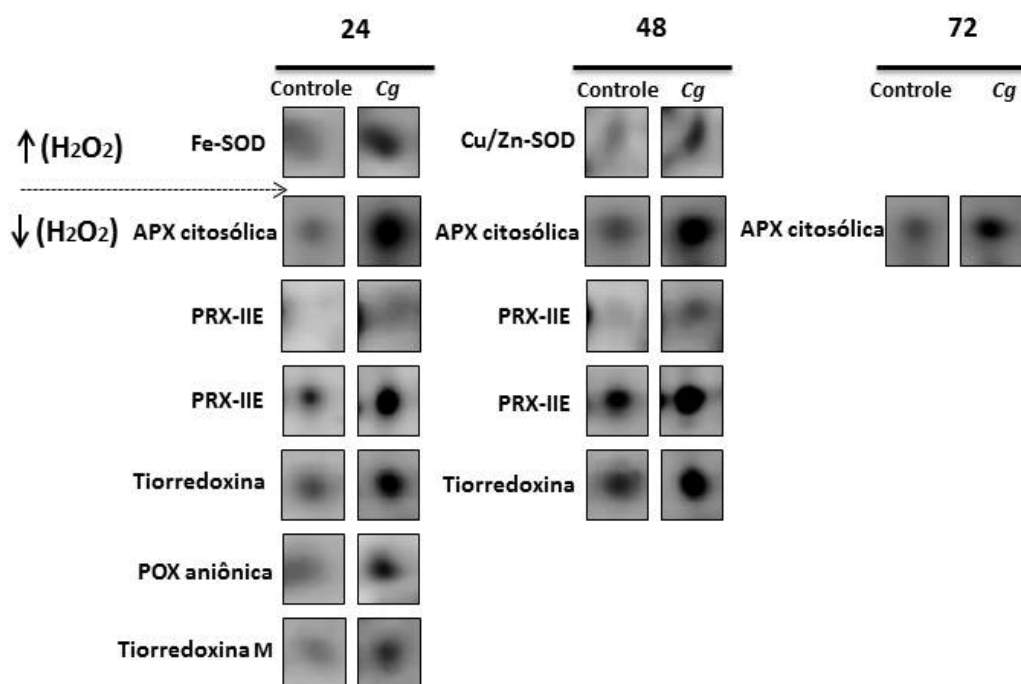
Proteínas envolvidas com a manutenção da homeostase redox também foram identificadas por MS. Houve expressão diferencial de proteínas formadoras de peróxido de hidrogênio (espécies reativas de oxigênio): Fe-SOD e Cu/Zn SOD. Em contrapartida, houve expressão considerável de enzimas removedoras de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), tais como 2 isoformas de peroxirredoxina 2E (sendo uma delas induzida após a inoculação), 2 tioredoxinas, uma peroxidase aniônica e a enzima ascorbato peroxidase (isoforma citosólica), que apresentou diferenças de expressão em todos os tempos. Nesse sentido, foi realizada a determinação de H_2O_2 com o objetivo de propor alguma correlação entre o padrão de mudanças de expressão de tais proteínas ao longo do tempo (Figura 14).

No que concerne à interação e atividade de tais proteínas frente à inoculação, cabe mencionar algumas proteínas que possuem ação direta sobre o patógeno, bem como algumas proteínas que podem ativar vias de defesa conferindo resistência,

mas agindo de forma indireta sobre o patógeno. Na Figura 15 são elencadas proteínas envolvidas direta ou indiretamente com a resistência à doença, enfatizando os tempos experimentais cuja variação de intensidade foi significativa.

Figura 14 – Modulação do estresse oxidativo em plantas de feijão-de-corda, em decorrência da inoculação do genótipo BR-3 com o isolado LPVD-1 de *C. gloeosporioides*, por comparação entre o padrão de expressão diferencial de proteínas envolvidas com a formação e remoção de H_2O_2 e a determinação quantitativa de H_2O_2 . A – Expressão diferencial de proteínas formadoras e removedoras de H_2O_2 em plantas inoculadas. B – Determinação quantitativa de H_2O_2 para cada tempo experimental. Legenda: Superóxido dismutase dependente do íon Ferro (Fe-SOD); Superóxido dismutase dependente dos íons cobre e zinco (Cu/Zn-SOD); Ascorbato peroxidase (APX citosólica); Peroxirredoxina 2E (PRX-IIe); Peroxidase aniônica (POX aniônica). Barras indicam desvio padrão; Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias.

A



B

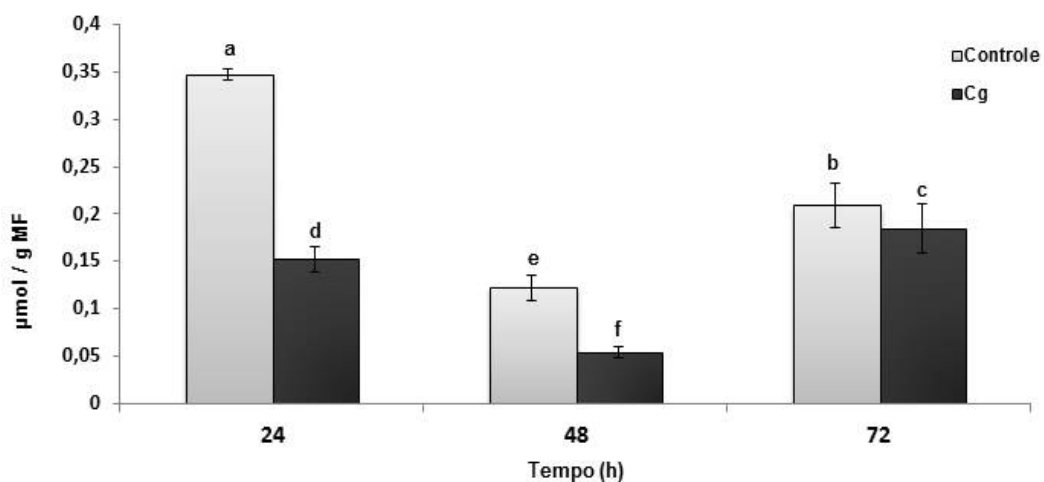
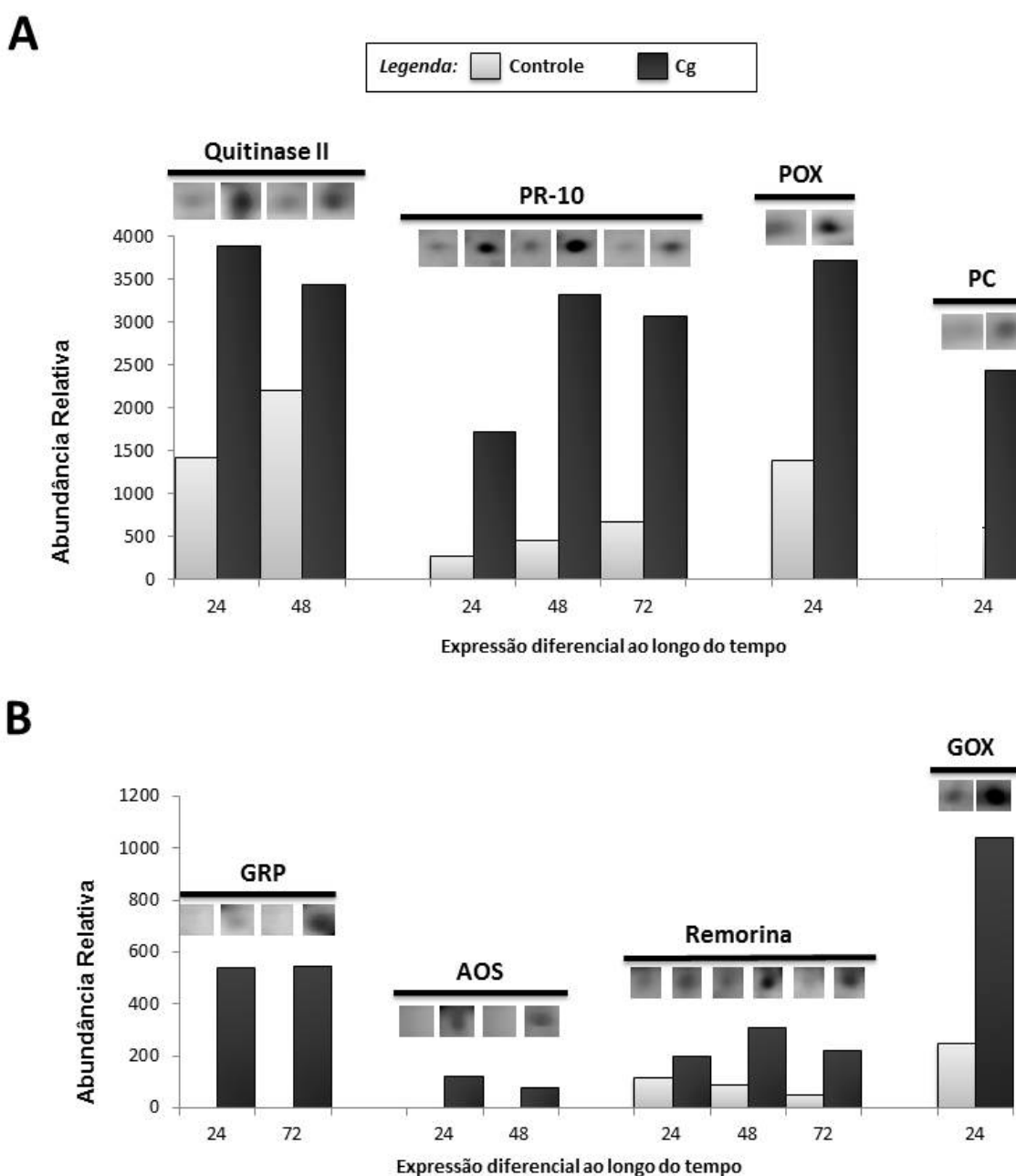


Figura 15 – Abundância relativa e Expressão diferencial de proteínas relacionadas com a defesa contra fungos. A – Proteínas envolvidas diretamente em mecanismos de resistência à infecção fúngica: Quitinase II; Proteína relacionada à patogênese (PR-10); Peroxidase – isoforma aniônica (POX); Protease cisteínica (PC). B – Proteínas que conferem resistência contra fungos de forma indireta: Proteína ligante a RNA rica em glicina (GRP); Aleno óxido sintase (AOS); Remorina; Glicolato oxidase (GOX);



5. DISCUSSÃO

5.1 Interação Incompatível entre feijão-de-corda e *C. gloeosporioides*

Mecanismos de defesa do feijão-de-corda, genótipo BR-3, são eficazes em combater a tentativa de infecção pelo isolado LPVD-1 de *C. gloeosporioides*, causador da antracnose em plantas suscetíveis, como, por exemplo, o genótipo TE-97 TRACUATEUA. Como consequência, os sintomas da doença não aparecem em folhas do genótipo BR-3, mesmo em 8 dias após a inoculação, o que evidencia o estabelecimento da interação incompatível com o patógeno (Figura 7).

Durante a interação compatível, fungos do gênero *Colletotrichum* possuem estratégias específicas que suplantam as respostas de defesa das plantas hospedeiras. Nesse contexto, ocorre a germinação dos esporos na superfície foliar, com a formação do tubo germinativo e posterior desenvolvimento dos apressórios, estruturas de infecção que interagem diretamente com o tecido vegetal.

As espécies do gênero *Colletotrichum* conseguem penetrar diretamente na superfície dos tecidos do hospedeiro, diferentemente de outras espécies fúngicas que o fazem por penetração indireta, via estômatos, embora, ocasionalmente, dependendo das condições, a penetração se dê indiretamente. Os apressórios melanizados (característica taxonômica do gênero *Colletotrichum*) penetram na cutícula iniciando o processo infeccioso, resultando no desenvolvimento das hifas que também têm a capacidade de penetrar na epiderme, maximizando a proliferação da doença (Deising *et al.*, 2000; Cannon *et al.*, 2012).

Esses eventos descritos acima não ocorrem em plantas de feijão-de-corda resistentes ao patógeno, com exceção do desenvolvimento de alguns apressórios. Fotomicrografias das folhas do genótipo BR-3 inoculadas com o fungo mostraram a ocorrência da germinação de alguns esporos fúngicos e desenvolvimento dos apressórios nos três tempos experimentais. Apesar disso, não foi observado o desenvolvimento de hifas, o que impediu a proliferação do patógeno no tecido vegetal (Figura 8). Além disso, não foram observadas quaisquer lesões visíveis nas folhas de feijão-de-corda, mesmo 72 horas após a inoculação do fungo, o que confirma a resistência do genótipo BR-3 ao isolado LPVD-1 (Figura 8). Isso se deve, provavelmente, à capacidade do BR-3 de reconhecer, por meio de suas proteínas R

(Głowacki *et al.*, 2011), moléculas efetoras liberadas pelos apressórios no sítio da tentativa de infecção, e desencadear uma cascata de eventos de defesa, caracterizando a resposta induzida por efetores do patógeno, ou ETI (do Inglês Effector-Triggered Immunity) (Barrett & Heil, 2012; Głowacki *et al.*, 2011; Faulkner & Robatzek, 2012. Li *et al.*, 2013). Também, há a possibilidade do reconhecimento, por parte da planta, de padrões associados aos patógenos/micróbios ou PAMPs/MAMPs (do Inglês, *Pathogen (Microbe)-Associated Molecular Pattern*), por meio de receptores de reconhecimento de padrões ou PRRs (do Inglês, *Pattern Recognition Receptors*) específicos (Beck *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013), resposta essa denominada PTI (do Inglês, *PAMP-Triggered Immunity*). Caso esses mecanismos de reconhecimento falhem, patógenos hemibiotróficos, como o *Colletotrichum gloeosporioides*, iniciam a fase biotrófica da infecção secretando proteínas efetoras como armas moleculares para evitar ou suprimir a imunidade da planta (Kleemann *et al.*, 2012). Logo depois, o fungo entra na fase necrotrófica, que leva à extensiva morte das células vegetais e o surgimento de lesões patogênicas (Cannon *et al.*, 2012), que se expandem, colonizando o hospedeiro.

Nesse sentido, a fim de compreender a batalha molecular entre o fungo e a planta, é extremamente importante investigar os mecanismos envolvidos com a resistência à doença. Assim, o uso da proteômica, como uma das metodologias disponíveis, pode auxiliar na identificação de proteínas envolvidas e, por conseguinte, seus genes associados, bem como elucidar que vias metabólicas estão sendo alteradas, caso ocorra reprogramação genética da planta frente à ameaça.

Pouco se sabe sobre moléculas efetoras de espécies de *Colletotrichum*. Stephenson *et al.*, (2000) relataram a existência do gene CgDN3, que codifica uma proteína secretada pelo *C. gloeosporioides*, que foi implicada em suprimir respostas de defesa em *Stylosanthes guianensis*, visto que espécimes do fungo mutantes para CgDN3 foram incapazes de infectar e se reproduzirem em folhas do hospedeiro, devido à ativação da resposta hipersensitiva (HR) no sítio de infecção.

5.2 Extração de proteínas de folhas de feijão-de-corda utilizando solução tampão Tris-Fenol pH 8,0

Com o objetivo de estudar as mudanças que ocorrem no proteoma das folhas de feijão-de-corda após a inoculação do isolado LPVD-1, foram testados quatro métodos de extração de proteínas para verificar o conteúdo de proteínas totais extraídas, bem como a compatibilidade com a abordagem eletroforese bidimensional.

O preparo das amostras é a etapa crucial para a obtenção de perfis de proteínas com resolução de alta qualidade em estudos proteômicos. De modo geral, tecidos vegetais apresentam diversos interferentes que dificultam a resolução das proteínas isoladas em géis bidimensionais, com destaque para as proteases e os metabólitos secundários (Wang *et al.*, 2008).

Inicialmente, o tecido vegetal deve ser macerado a fim de favorecer a interação do conteúdo celular com as substâncias extratoras. A obtenção do pó foliar por pulverização em nitrogênio líquido é eficaz para esse propósito, além de minimizar a degradação proteolítica durante o rompimento do tecido (Wang *et al.*, 2008). Além disso, podem ser utilizados inibidores de proteases sintéticos durante os processos de extração.

Além das proteases, os metabólitos secundários podem afetar severamente o processo de extração de proteínas e separação em géis 2D. Por exemplo, compostos fenólicos podem formar complexos irreversíveis com proteínas, e a oxidação de fenólicos pelas enzimas fenol-oxidases e peroxidases pode originar compostos que aumentam o *background* impedindo a resolução das proteínas nos géis. Pigmentos, polissacarídeos e lipídios também podem comprometer a separação das proteínas durante a eletroforese bidimensional (Granier, 1988; Vâlcu & Schlink, 2006).

Uma estratégia eficaz para a eliminação de interferentes é a lavagem inicial das amostras com solução TCA/acetona, a fim de obter um precipitado de coloração branca, livre de pigmentos e metabólitos secundários, em combinação com algum método de extração de proteínas utilizando o reagente fenol (Wang *et al.* 2008).

O reagente fenol dissolve proteínas (incluindo proteínas de membrana), e as mantém retidas em uma fase fenólica permitindo a separação de interferentes como polissacarídeos e ácidos nucleicos, que ficam retidos na fase aquosa. A partir disso, as proteínas podem ser precipitadas com metanol, apresentando alto grau de pureza (Isaacson *et al.*, 2006).

Dentre os métodos de extração de proteínas testados neste trabalho, o método 2, extração utilizando tampão Tris fenol pH 8,0 (adaptado do método descrito por Gondim, 2010), foi definido como o protocolo de extração proteica de folhas de feijão-de-corda (conforme mostrado nas Figuras 5 e 6), considerando o alto teor de proteínas que refletiu diretamente na quantidade de *spots* totais separados por eletroforese bidimensional.

Além disso, o perfil 2D referente às proteínas extraídas por esse método apresentou excelente resolução e reduzido *background*, haja vista a eficiência desse método em eliminar interferentes aumentando o grau de pureza do conteúdo de proteínas totais. Esses resultados reforçam os dados da literatura descritos anteriormente, evidenciando o grau de acurácia do reagente fenol em métodos de extração de proteínas em estudos proteômicos.

5.3 Mudanças no Proteoma foliar de feijão-de-corda durante a interação incompatível

Em decorrência da definição do método de extração de proteínas, foi realizado o experimento de inoculação do isolado fúngico LPVD-1 em plantas do genótipo BR-3, com o objetivo de avaliar possíveis mudanças no proteoma foliar em virtude da interação incompatível.

Após a extração de proteínas para as amostras foliares das plantas inoculadas (grupo Cg) e não inoculadas (grupo controle) referentes aos tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI), foi realizada a dosagem de proteínas solúveis totais (Bradford, 1976). O conteúdo de proteínas foi significativamente superior nas folhas do grupo controle em 24 e 48 horas, não diferindo em 72 horas. Em relação ao grupo Cg, o conteúdo de proteínas totais

apresentou aumento em 72 HAI diferindo, estatisticamente, dos valores obtidos em 24 e 48 HAI (Figura 9).

Apesar das diferenças quantitativas no teor de proteínas das folhas do grupo controle em relação ao grupo Cg, os mapas bidimensionais referentes a este grupo apresentaram maior número de *spots* totais em todos os tempos experimentais, evidenciando as mudanças que ocorrem no proteoma foliar após o contato com o patógeno (Figura 11).

Os perfis bidimensionais apresentaram excelente resolução, e boa reprodutibilidade considerando a semelhança entre os perfis de cada tempo experimental. Poucas mudanças visíveis foram detectadas, com exceção da intensidade dos *spots* nos géis ao longo do tempo que, visualmente, mostrou-se mais pronunciada nos géis de 48 e 72 horas, considerando o maior número de *spots* contabilizados em tais perfis. A partir da análise das imagens dos géis 2D (*software PDQuest*), foi possível verificar as alterações minuciosas nos padrões de expressão de proteínas, principalmente em plantas do grupo Cg.

5.3.1 Proteínas diferencialmente expressas em folhas de feijão-de-corda após o contato com o fungo

Durante a interação incompatível entre o feijão-de-corda e o fungo *C. gloeosporioides*, foram observadas diferenças no padrão de expressão de 118 proteínas. Dessas, 102 foram superexpressas e apenas 16 subexpressas no grupo Cg em relação ao perfil das plantas controles não inoculadas.

Os *spots* com expressão diferencial foram marcados nos perfis bidimensionais (Figura 10), nos respectivos tempos experimentais onde ocorreram as mudanças de expressão. A maior parte dos *spots* foi marcada nos perfis de 24 e 48 HAI do grupo Cg, mostrando que as mudanças no proteoma foliar, induzidas após o contato com o fungo, ocorrem nos primeiros dias após a inoculação.

Esse fato também justifica a interação incompatível entre a planta e o fungo, considerando que a resistência à doença está associada à rápida capacidade de

respostas à infecção, quando ocorre ativação de mecanismos moleculares efetivos em combater o desenvolvimento do patógeno.

Além disso, 29 proteínas apresentaram expressão diferencial tanto em 24 quanto em 48 horas após a inoculação do patógeno, mostrando que as respostas da planta frente ao contato com o fungo são mantidas ao longo do tempo, devido, provavelmente, à importância atribuída às funções celulares desencadeadas por esse conjunto de proteínas (Figura 12).

Após 72 horas da inoculação do patógeno, não houve grandes diferenças no padrão de proteínas, o que reforça a efetividade das respostas iniciais rápidas à infecção. Três proteínas apresentaram expressão diferencial em todos os tempos experimentais testados: Proteína relacionada à patogênese, família 10 (PR-10), remorina, e peroxidase do ascorbato, isoforma citosólica (Figura 12). Posteriormente, será discutido o papel dessas proteínas na defesa da planta.

As proteínas identificadas por MS são envolvidas em diversos processos bioquímicos e fisiológicos da planta, corroborando a complexidade do proteoma no que concerne ao amplo espectro de respostas que a planta pode ativar/reprimir após o contato e elicitação por parte do patógeno.

Devido o grande número de proteínas diferencialmente expressas identificadas, bem como a diversidade de funções que desempenham nas células, a Tabela 2 foi sistematizada com base nos processos celulares gerais em que estão envolvidas tais proteínas.

Todas as proteínas identificadas neste trabalho apresentaram correlação com outras proteínas similares, principalmente de espécies de plantas dicotiledôneas, sendo 42 de *Glycine max*, 12 de *Vigna unguiculata*, considerando que o genoma de *Vigna unguiculata* ainda não foi sequenciado, 8 de *Arabidopsis thaliana*, 7 de *Medicago truncatula*, 6 de *Ricinus communis*, além de diversas outras espécies vegetais utilizadas como organismos de referência (Tabela 2).

5.3.1.1 Mudanças no Metabolismo energético e Fotossíntese durante a interação incompatível

Neste estudo, diversas proteínas com expressão diferencial estão envolvidas em vias do metabolismo energético (25) e do processo fotossintético (26). Essas proteínas perfazem a maior parte das mudanças observadas no proteoma foliar de feijão-de-corda em decorrência da interação incompatível. Com relação ao metabolismo energético, houve mudanças na modulação de proteínas relacionadas com a via glicolítica, gliconeogênese, via das pentoses e ciclo de Krebs.

Glicólise e gliconeogênese são vias antagônicas do metabolismo de carboidratos e apresentam regulação coordenada. Curiosamente, todas as proteínas, identificadas neste estudo, relacionadas com essas vias, tiveram sua expressão diminuída em 24 horas após o contato do patógeno: *spots* 99 e 119 correspondentes a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, subunidades B e A, respectivamente. No mesmo período de tempo, 3 isoformas da enzima frutose 1,6-bifosfatase (*spots* 55, 66 e 67) foram reprimidas.

A inibição da glicólise também foi observada durante a interação incompatível entre *Fragaria ananassa* e *Colletotrichum fragariae*. Considerando os produtos metabólicos dessa via, tal inibição poderia bloquear possíveis fontes de energia para o patógeno (Fang *et al.*, 2012). No que concerne à gliconeogênese, é válido discutir que a diminuição da expressão das isoformas da enzima frutose 1,6-bifosfatase interfere no funcionamento da via, visto que tal enzima constitui um dos principais pontos de regulação, afetando a síntese de frutose 6-fosfato, molécula precursora para a síntese de outros açúcares. Como consequência, isso pode afetar a quantidade de açúcares disponíveis como nutrientes para o patógeno.

Neste estudo, também foi observada a diminuição da expressão da enzima transcetolase (*spot* 91) em 24 e 48 horas após o contato com o fungo. Essa enzima constitui um dos pontos-chaves da regulação da via das pentoses fosfato, que fornece pentoses e poder redutor para processos biossintéticos, além de participar do ciclo de Calvin, controlando a fixação de carbono fotossintético (Gerhardt *et al.*, 2003).

Em contrapartida, as enzimas relacionadas com o ciclo do ácido cítrico apresentaram aumento de expressão após a inoculação do fungo: *spots* 35 e 117, correspondentes à malato desidrogenase, e o *spot* 92 identificado como succinato desidrogenase (ubiquinona), ambas envolvidas em reações de redução das coenzimas NAD (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) e FAD (Flavina adenina dinucleotídeo) que fornecem poder redutor para a síntese de ATP.

Além disso, a enzima succinato desidrogenase participa do processo de transporte de elétrons para a fosforilação oxidativa, que resulta na síntese de ATP, dirigida pela enzima sintase do ATP. Essa enzima também foi superexpressa em decorrência da inoculação fúngica, correspondendo aos *spots*: 36, 59 e 75 referentes às subunidades gama, delta e beta, respectivamente.

As mudanças no padrão de expressão dessas enzimas reforçam o fato de que os mecanismos de resistência à doença exigem determinado aporte energético para a síntese de compostos que tenham ação sobre o patógeno, e confirmam a importância das alterações no metabolismo primário durante a interação incompatível (Swarbrick *et al.*, 2006; Berger *et al.*, 2007).

Plantas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas com *hrpA* (PAMP oriundo de *P. syringae*) mostraram um aumento na expressão da enzima malato desidrogenase, confirmando o possível envolvimento dessa enzima na interação planta-patógeno (Jones *et al.*, 2006), considerando que a síntese de oxaloacetato, produzido pela enzima, pode direcionar a síntese de aminoácidos e posterior síntese de proteínas possivelmente envolvidas com a resistência.

Nos vegetais, a síntese de proteínas depende, inicialmente, do processo de assimilação do nitrogênio e da disponibilidade de α -cetoácidos, como, por exemplo, o oxaloacetato e o α -cetogluturato para a biossíntese de aminoácidos. Nesse estudo, também foram superexpressas as enzimas citosólica: aconitase (*spot* 103) que catalisa a formação do isocitrato citosólico, e isocitrato desidrogenase (*spot* 30) que, além de produzir poder redutor na forma de NADPH, catalisa a transformação do isocitrato em α -cetogluturato citosólico, que poderá ser direcionado ao cloroplasto sendo utilizado para a assimilação do nitrogênio (Chen, 1998) e posterior biossíntese de aminoácidos, ressaltando o papel dessa via para o patossistema estudado.

Além do metabolismo energético, mudanças no padrão de proteínas envolvidas com a fotossíntese também foram observadas. Com exceção do *spot* 84 (ferredoxina-NADP redutase) que foi subexpresso em plantas inoculadas, todas as demais proteínas envolvidas com este processo foram superexpressas. A maior parte das mudanças ocorreu 24 horas após a inoculação do fungo, em diversas proteínas relacionadas com as etapas de captação de luz e transporte de elétrons (*spots* 09, 15, 16, 20, 21, 29, 42, 44, 61, 69, 83, 104, 112, 120, 121, 122) para a produção de energia requerida para a síntese de açúcares no ciclo de Calvin. Em 24 e 48 HAI ocorreu o aumento da expressão da enzima rubisco ativase (*spots* 64 e 100) responsável pela ativação da enzima rubisco (ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase) durante a fixação do CO₂.

Em 48 HAI, houve a superexpressão da rubisco (*spots* 26, 32 e 101), enzima que dá início ao ciclo de Calvin, haja vista que o aumento da expressão de diversas enzimas envolvidas na fase fotoquímica em 24 HAI, provavelmente ocasionaria o aumento de energia disponível para a síntese de produtos fotoassimilados. Nesse sentido, é válido lembrar que os mecanismos de defesa exigem determinado custo energético para as células (Neilson *et al.*, 2013), implicando, diretamente, na demanda por fotoassimilados que também fornecem esqueletos carbônicos utilizados para respostas de defesa subsequentes (Essmann *et al.*, 2008; Major *et al.*, 2010).

Após o reconhecimento do patógeno, pode ocorrer uma diminuição gradual da taxa de fotossíntese no local da infecção. Apesar disso, a ativação de enzimas envolvidas na fotossíntese durante a interação planta-fungo também foi observada para o patossistema *Fragaria ananassa* versus *Colletotrichum fragariae* em 24 e 48 HAI, conferindo rápidas respostas de defesa ao fungo (Fang *et al.*, 2012).

Além disso, Rinaldi e colaboradores (2007) verificaram um aumento da expressão de genes que codificam para proteínas relacionadas com a formação do aparato fotossintético e do ciclo de Calvin em decorrência da interação incompatível entre plantas de álamo e o fungo causador da ferrugem (*Melampsora larici-populina*). Esses resultados são similares aos encontrados neste trabalho e corroboram o envolvimento do processo fotossintético durante a resistência à doença.

Fotorrespiração é um processo acoplado, metabolicamente, à assimilação do CO₂ durante a fotossíntese. A proteína glicolato oxidase (GOX) é uma enzima chave desse processo catalisando a oxidação do glicolato a glioxilato produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Foyer *et al.*, 2009). Neste estudo, GOX foi superexpressa em plantas de feijão-de-corda no período de 24 horas após inoculação com o fungo.

A enzima GOX está envolvida na resistência não hospedeira – resistência vegetal a todas as formas patogênicas de determinada espécie de patógeno (Heath, 2000) – de *Nicotiana benthamiana* à infecção por *P. syringae*, regulando as respostas de defesa por meio da produção de H₂O₂, além de ativar a HR na resistência mediada por ETI para o mesmo patossistema (Rojas & Mysori, 2012). Os níveis de H₂O₂ produzidos por GOX também podem afetar a homeostase redox alterando a expressão gênica de enzimas antioxidantes (Noctor *et al.*, 2002).

A GOX também pode desencadear a produção de ROS em plantas de *Arabidopsis thaliana* durante a resistência não hospedeira. Em *Arabidopsis*, 2 genes que codificam para essa enzima (*AtGOX3* e *AtHAOX2*) foram induzidos em plantas infectadas com *P. syringae*. Entretanto, plantas mutantes para esses genes mostraram redução significativa na expressão de genes de defesa. Além disso, o aumento de H₂O₂ formado por GOX independe da atividade NADPH oxidase, principal enzima envolvida no processo de explosão oxidativa. Esses resultados sugeriram que o H₂O₂ gerado por GOX é usado como sinal para ativar vias de transdução de sinais envolvidas em respostas de defesa (Rojas *et al.*, 2012).

O aumento considerável da expressão da enzima GOX em plantas de feijão-de-corda inoculadas com o isolado LPVD-1, logo em 24 HAI, sugere a importância dessa enzima em respostas iniciais durante a interação incompatível, considerando que a produção de H₂O₂ poderia ativar a sinalização de vias envolvidas com a defesa. Neste sentido, GOX parece exercer uma ação indireta sobre o patógeno (Figura 15).

5.3.1.2 Efeitos no Metabolismo de Proteínas e Resposta ao Stress

Diversos trabalhos têm mostrado alterações no metabolismo de proteínas relacionadas, principalmente, com as modificações pós-traducionais, concernentes

ao enovelamento proteico, e com as vias de biossíntese e degradação de proteínas durante a interação planta-patógeno (Fang *et al.*, 2012; Petriccione *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013).

Para o patossistema feijão-de-corda versus *C. gloeosporioides*, a maioria das proteínas identificadas, nessa categoria, foram superexpressas, destacando-se as subunidades alfa 5-A (03 e 49) e alfa 7 (109) do proteassoma 26S, proteínas da família das ciclofilinas (37, 65, 106, 107 e 115), envolvidas no enovelamento de proteínas, além das enzimas relacionadas com o metabolismo de aminoácidos: aspartato aminotransferase (11) e glutamina sintetase (87) e síntese proteica (proteína ribossomal 60S acídica, *spot* 74). Apenas a proteína chaperona ClpC, isoforma 1(88) foi subexpressa.

Neste estudo, foram identificadas duas subunidades do proteassoma 26S, que é um complexo multienzimático responsável pela degradação de proteínas ubiquitinadas, contribuindo com a renovação proteica. Até o momento, quase não há evidências do envolvimento do proteassoma na morte celular programada e resistência à doença em plantas (Hatsugai *et al.*, 2009), principalmente contra patógenos fúngicos.

O proteassoma desempenha um papel na resposta hipersensitiva induzida por patógenos bacterianos. Hatsugai e colaboradores (2009) observaram que a deficiência da subunidade do proteassoma PBA1 suprime a morte celular resultante da HR em resposta à infecção com moléculas efetoras de *P. syringae* em *Arabidopsis thaliana*. Esses resultados indicam que o proteassoma é requerido para a morte celular (PCD) mediada pelo gene R (ETI), podendo conferir imunidade contra patógenos bacterianos.

Além das subunidades do proteassoma, 5 proteínas da família das ciclofilinas foram identificadas para a categoria metabolismo de proteínas. Tem sido discutido que a abundância e diversidade de isoformas dessas proteínas sugerem sua importância em diversos processos celulares (além do papel crucial no enovelamento proteico), tais como processamento de RNAm, degradação de proteínas e transdução de sinais, durante o desenvolvimento da planta e resposta ao estresse (Romano *et al.*, 2004).

Ciclofilinas possuem atividade peptidil-prolil isomerase podendo agir diretamente sobre as proteínas-chaves relacionadas com diversos processos celulares, como as respostas de defesa (Romano *et al.*, 2004). As ciclofilinas podem reconhecer moléculas efetoras do patógeno (Coaker *et al.*, 2005), bem como ciclofilinas do patógeno podem funcionar como moléculas efetoras, agindo como determinantes de virulência, conforme observado para o patossistema arroz-*Magnaporthe grisea* (Muriel *et al.*, 2002).

Em decorrência da inoculação do isolado LPVD-1, foram identificadas 5 proteínas da família das ciclofilinas confirmando o papel de tais proteínas na resistência do feijão-de-corda ao fungo. Considerando a capacidade de reconhecimento de moléculas efetoras patogênicas devido à atividade peptidil-prolil isomerase, tais proteínas poderiam estar envolvidas no reconhecimento de efetores do isolado LPVD-1, possivelmente ativando vias de sinalização para a defesa. Além disso, poderiam agir como moléculas antifúngicas, haja vista ter sido reportada a atividade antifúngica de ciclofilinas purificadas de sementes de feijão (Ye & Ng, 2000).

Proteínas do metabolismo de aminoácidos também foram superexpressas em plantas inoculadas. As enzimas aspartato aminotransferase (11) e glutamina sintetase (87) apresentaram alterações de expressão em 24 HAI, sendo a enzima aspartato aminotransferase induzida após a inoculação. Essa enzima catalisa a transferência do grupo amino do aspartato para o α -cetoglutarato, produzindo oxaloacetato e glutamato, funcionando como enzima reguladora chave da reciclagem de esqueletos carbônicos e o metabolismo de nitrogênio (Zhou *et al.*, 2009).

O glutamato formado poderá ser transformado em glutamina pela enzima glutamina sintetase, ambos sendo precursores da biossíntese dos demais aminoácidos proteicos. Em concordância com a superexpressão das enzimas isocitrato desidrogenase citosólica e malato desidrogenase, esses achados reforçam a possível indução da biossíntese de aminoácidos durante a interação incompatível entre o feijão-de-corda e o fungo, considerando que a formação de aminoácidos fornece os monômeros para a síntese de proteínas necessárias para a resistência à doença.

A identificação das proteínas por MS/MS também revelou mudanças no padrão de proteínas vegetais envolvidas com a manutenção da homeostase celular em resposta ao estresse. Ao todo, 9 proteínas foram alteradas após a inoculação com o fungo, destacando-se a proteína ligante de RNA rica em glicina (*spot* 02) que foi induzida em 24 e 72 HAI; proteína tumoral traducionalmente controlada (TCTP, *spot* 46) e proteína LEA grupo 2 (*spot* 63), além das proteínas de choque térmico (HSP): 2 superexpressas (*spots* 25 e 60) e 2 HSP 90 subexpressas (*spots* 68 e 76).

As proteínas ligantes de RNA ricas em glicina (GRPs) pertencem à família das RBPs (do inglês *RNA-binding proteins*) e contém motivos estruturais de reconhecimento de RNA na porção N-terminal, e uma região rica em glicina na porção C-terminal. As funções celulares dessas proteínas ainda não são bem conhecidas, mas há evidências do seu papel nas respostas de adaptação ao estresse (Fulda *et al.*, 2011). Nesse sentido, foi observado que ocorre a superexpressão de RNAm que codifica para essa enzima em situações de estresse como o frio, injúria, estresse hídrico e infecção viral (Bocca *et al.*, 2005).

Lee *et al.*, (2012) estudaram os diferentes papéis da GRP7 em respostas de defesa contra *P. carotovorum*, *B. cinerea* e o vírus mosaico do tabaco (patógenos bacteriano, fúngico e vírus, respectivamente) em plantas de *A. thaliana*, mostrando que GRP7 apresenta efeitos negativos durante a resposta ao fungo *B. cinerea*, apesar de conferir resistência contra o *patovar* bacteriano e o vírus utilizados no trabalho.

GRPs executam papéis celulares importantes por se ligarem às moléculas de RNA, regulando o metabolismo e o processamento de RNA. Nesse sentido, é provável que tais proteínas possam modular o direcionamento de diversos tipos de RNA, incluindo moléculas de RNA envolvidas em respostas de defesa de plantas (Lee *et al.*, 2012). Além disso, um estudo recente sobre o transcriptoma de plantas de batata infectadas com *F. solani* demonstrou o envolvimento de genes relacionados ao metabolismo e processamento de RNA em mecanismos de defesa contra patógenos (D'Ippólito *et al.*, 2010).

Apesar de poucos estudos relatarem o papel das GRPs em respostas de defesa contra patógenos, foi observada a indução dessa proteína em 24 e 72 HAI em plantas de BR-3 resistentes ao isolado LPVD-1 do fungo *C. gloeosporioides*.

Neste patossistema, a indução dessa proteína poderia estar relacionada com a função de ligação a moléculas de RNA relacionadas com a adaptação ao possível estresse proveniente da inoculação fúngica, tendo, portanto, uma ação indireta sobre o patógeno (Figura 15).

Na categoria resposta ao estresse, também foi observado um aumento da expressão da proteína tumoral traducionalmente controlada (TCTP, *spot 46*) em 48 HAI. TCTP foi inicialmente identificada em células tumorais de mamíferos e, em plantas, são induzidas em resposta aos estresses biótico e abiótico (Alfenas-Zerbini *et al.*, 2009). Alguns pesquisadores consideram TCTP como proteína relacionada com a patogênese, porém, os mecanismos de ação de tais proteínas ainda são desconhecidos (Zhao *et al.*, 2012).

Gupta *et al.*, (2013) mostraram que TCTP regula negativamente a resposta hipersensitiva em *Nicotiana benthamiana* infectada com patógenos bacterianos. Isso ocorre porque o silenciamento do gene *NbTCTP*, que codifica para o peptídeo que apresenta similaridade com TCTP, aumenta rapidamente a resposta hipersensitiva em resposta à infecção. Nesse sentido, discutem que TCTP pode estar envolvida com a regulação da morte celular durante a HR. Esse foi o primeiro estudo relacionando TCTP com PCD em plantas, ressaltando a necessidade de novos estudos acerca dos possíveis mecanismos regulados por essa proteína, durante a interação planta-patógeno.

Morte celular e crescimento celular são processos acoplados, logo, falhas no controle da regulação do crescimento celular podem levar à PCD. Gupta *et al.*, (2013) também demonstraram que a proteína TCTP parece regular o ciclo celular, controlando, tanto o processo de morte celular durante o crescimento da planta quanto a morte das células durante a HR mediada por ROS e sinalização por proteínas quinases do tipo MAPK (do inglês: *Mitogen-Associated Protein Kinase*). Por fim, novos estudos que proponham o entendimento da função anti-morte celular de TCTP poderão elucidar os mecanismos regulatórios da PCD em plantas.

A proteína LEA 2 (63) também foi superexpressa durante a interação incompatível. Proteínas LEA estão envolvidas em mecanismos de proteção da estrutura de proteínas frente aos estresses ambientais, como o estresse oxidativo, hídrico e de seca. A superexpressão de ZmLEA 3, uma isoforma de LEA 2

proveniente de plantas de milho, em plantas transgênicas de fumo aumentou a resposta hipersensitiva frente à infecção com *P. syringae* pv. *DC3000* e aumentou a expressão de proteínas relacionadas à patogênese, mostrando o possível papel dessa proteína em respostas de defesa contra patógenos (Liu *et al.*, 2013).

Por fim, 2 proteínas de choque térmico (HSPs), correspondendo às proteínas sHSP (do inglês: small heat-shock, *spot* 25) e proteína de choque térmico de 22 kDa (*spot* 60), ambas classificadas como “*small HSPs*” (pequenas HSPs) tiveram sua expressão aumentada em plantas inoculadas com o fungo. Entretanto, 2 HSP 90 foram subexpressas após o contato com o patógeno. Tais proteínas são chaperonas moleculares e protegem as células contra os efeitos deletérios advindos de diversos tipos de estresse (Young & Elliot, 2002).

Fang *et al.*, (2012) também verificaram aumento de expressão de HSPs durante a interação incompatível entre *Fragariae ananassa* e *C. fragariae*. Os autores discutem, com base em trabalhos anteriores e nos seus achados, que as proteínas *small HSPs* são requeridas durante os estágios iniciais de reconhecimento do fungo, auxiliando a célula no ajuste à invasão patogênica, possivelmente pela manutenção da integridade estrutural de proteínas de defesa.

5.3.1.3 Modulação da Homeostase Redox durante a interação incompatível

As vias de sinalização acionadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) são mecanismos de transdução de sinais conservados evolutivamente e encontrados em todos os seres vivos aeróbicos. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é a principal molécula sinalizadora que ativa/reprime vias de sinalização envolvidas em diversos processos biológicos como a regulação do crescimento e desenvolvimento, bem como respostas frente a estresses bióticos e abióticos (Mittler *et al.*, 2011).

Apesar da importância do H_2O_2 em vias de sinalização, essas moléculas podem causar danos oxidativos em proteínas, DNA e lipídios. Consequentemente, as plantas desenvolveram eficientes sistemas antioxidantes com o intuito de regular a geração de ROS, a fim de manter a homeostase redox celular. Esses sistemas consistem de catalases (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidases (POX), que existem em múltiplas isoformas (Wang *et al.*, 2013). Outras enzimas

antioxidantes regulam a homeostase redox incluindo oxidoredutases como as peroxirredoxinas, glutarredoxinas e tiorredoxinas, além dos tampões redox ascorbato e glutathione (Foyer & Noctor, 2011).

Durante a interação incompatível, o ataque do patógeno pode induzir PCD no sítio da infecção por intermédio da resposta hipersensitiva. A sinalização para a PCD é mediada por H_2O_2 e envolve a transcrição e atividade de um vasto número de genes que codificam proteínas quinases MAPK (Pinto *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013) que, por sua vez, transmitem o sinal ativando fatores de transcrição que regulam a expressão gênica, ativando o processo de morte celular dependente de H_2O_2 (Gadjev *et al.*, 2006).

Nessa perspectiva, é válido discutir a importância das respostas de defesa mediadas por H_2O_2 , bem como a ativação da expressão de proteínas antioxidantes, durante a interação incompatível entre o genótipo BR3 e o isolado LPVD-1, em virtude da diversidade de proteínas identificadas envolvidas com a homeostase redox. Todas as proteínas identificadas por MS/MS, para essa categoria, apresentaram aumento de expressão em 24 e 48 HAI, reforçando a ativação de respostas rápidas após o contato com o fungo.

No que concerne às proteínas formadoras de H_2O_2 , houve diferenças na expressão temporal das isoformas da enzima superóxido dismutase (SOD): a enzima SOD ligante ao íon ferro (*spot* 72) foi superexpressa em 24 HAI, apresentando decréscimo de expressão em 48 HAI, tempo experimental em que houve a superexpressão de SOD ligante aos íons cobre e zinco (*spot* 93).

Em contrapartida, houve superexpressão das enzimas removedoras de H_2O_2 , a fim de evitar possíveis danos oxidativos às biomoléculas. Foram identificadas 2 peroxirredoxinas de origem cloroplástica (*spots* 05 e 71), 2 tiorredoxinas (*spots* 58 e 79), 1 peroxidase aniônica (*spot* 50) e 1 ascorbato peroxidase (*spot* 94), que foi superexpressa em plantas inoculadas nos três tempos experimentais testados, o que sugere a importância dessa enzima na regulação dos níveis de H_2O_2 e manutenção da homeostase redox.

Com o objetivo de verificar como seria a possível modulação do estresse oxidativo, foi realizado um ensaio quantitativo para analisar diferenças na

concentração de H₂O₂ entre plantas controles e inoculadas. Para todos os tempos experimentais os índices de H₂O₂ foram superiores em plantas controle, confirmando a ativação da expressão das enzimas antioxidantes após o contato com o patógeno. As diferenças na concentração de H₂O₂ foram mais pronunciadas em 24 HAI e diminuíram ao longo do tempo (apesar de diferir estatisticamente em todos os tempos experimentais; $p \leq 0,001$), haja vista a expressão diferencial do maior número de proteínas removedoras de H₂O₂ ocorrer em 24 HAI (Figura 14).

Além de evitar possíveis danos oriundos do aumento de H₂O₂ proveniente da atividade da SOD, a superexpressão de enzimas antioxidantes mantém os níveis de H₂O₂ adequados para a ativação de vias de sinalização dependentes de ROS, principalmente a enzima ascorbato peroxidase (APX), que tem sido relatada como proteína reguladora chave da morte celular programada dependente de H₂O₂ (de Pinto *et al.*, 2006).

Além da APX, as peroxirredoxinas e tioredoxinas são enzimas antioxidantes que removem o excesso de H₂O₂, estando diretamente envolvidas com o controle do estresse oxidativo. As peroxirredoxinas, além de funcionar como antioxidantes, modulam a sinalização celular dependente de ROS e funcionam como sensores do estado redox celular (Dietz *et al.*, 2006).

A peroxidase aniônica também está envolvida na regulação do estresse oxidativo, reduzindo os níveis de peróxido de hidrogênio. Além disso, essa proteína pode interagir diretamente com o patógeno (Figura 15) e pertence ao grupo de proteínas relacionadas à patogênese, família PR-9 (Van loon & Van strien, 1999). Diversos trabalhos têm mostrado o papel das peroxidases na defesa contra patógenos. Nesse sentido tem sido relatada atividade antifúngica direta dessas proteínas (Ye & Ng, 2002; Wang *et al.*, 2011), bem como o aumento da atividade peroxidásica em decorrência das interações compatível e incompatível (Golubenko *et al.*, 2007) e a indução da atividade peroxidásica em plantas de feijão-de-corda tratadas com ácido salicílico (Fernandes *et al.*, 2006). Além disso, as peroxidases estão envolvidas com o processo de lignificação, conferindo resistência a patógenos fúngicos (Fang *et al.*, 2012).

5.3.1.4 Proteínas envolvidas na defesa e resistência à doença

Algumas proteínas relacionadas com respostas de defesa foram identificadas durante a interação incompatível com o fungo *C. gloeosporioides*. Após o contato com o patógeno, ocorre um aumento da expressão de proteínas relacionadas à patogênese: quitinase II (*spot* 48) em 24 HAI e PR-10 (*spot* 73), em todos os tempos experimentais, além da peroxidase aniônica (citada anteriormente). Houve aumento de expressão ainda, da proteína remorina (*spot* 90) nos três tempos experimentais, indução de duas isoformas de aleno óxido sintase (*spots* 12 e 13) em 24 HAI e superexpressão de 2 proteases cisteínicas (*spots* 07 e 45).

Proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) são fortemente induzidas em resposta à injúria e à infecção (Van Loon *et al.*, 2006). Elas se acumulam abundantemente no sítio da infecção, contribuindo para o desenvolvimento da SAR. Após o contato com o fungo, houve aumento da quitinase II em 24 HAI. Essa enzima pode agir diretamente sobre o patógeno bloqueando o crescimento fúngico ou, indiretamente, pela liberação de elicitores fúngicos (oligômeros de quitina fúngica) induzindo aumento de atividade quitinásica e outras respostas de defesa no hospedeiro (Saboki *et al.*, 2011).

Além da quitinase II, uma proteína relacionada à patogênese, classe 10, também foi identificada por MS/MS. De modo geral, a maioria dessas proteínas possui atividade ribonucleásica, atuando na defesa contra vírus (Bufe *et al.*, 1996). Essas proteínas apresentam complexos padrões de expressão e desempenham diversas funções biológicas em diferentes espécies (Liu *et al.*, 2006).

Diversos tipos de estresses bióticos ativam a expressão transcricional de PR-10, sugerindo sua importância em respostas de defesa contra patógenos. A expressão induzida de genes PR-10 em resposta ao ataque de patógenos tem sido amplamente investigada em plantas. Os patógenos que ativam a expressão de PR-10 incluem vírus, bactérias e fungos (Hashimoto *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006).

Experimentos de localização imunocitoquímica mostraram que as proteínas PR-10 se ligam à parede celular do fungo causador da ferrugem (*Cronartium ribicola*), tanto intracelularmente quanto no espaço extracelular de plantas de pinheiro doce (Ekramoddoullah, 2004). Além disso, foi relatado que uma proteína

denominada *Ocatin*, uma PR-10 de *Oxalis tuberosa*, apresenta atividade antifúngica (Flores *et al.*, 2002). Um proteína recombinante (*CaPR-10*) de *Capsicum annuum* inibiu o crescimento do patógeno oomiceto *P. capsici* (Park *et al.*, 2004).

Esses achados demonstram o papel das proteínas PR-10 em respostas de defesa frente a patógenos fúngicos. Neste estudo, foi observado aumento de expressão considerável (>4,5) da PR-10 em todos os tempos avaliados. As mudanças no padrão de expressão encontradas em plantas inoculadas foram analisadas pelo índice de variação da expressão proteica em relação aos valores encontrados em plantas controle (ver Tabela 2). Essas alterações indicam a importância dessa proteína para a resistência do feijão-de-corda ao ataque do fungo *C. gloeosporioides*, uma vez que, mesmo em 72 HAI, o índice de variação foi, aproximadamente, 4 vezes maior em plantas inoculadas. Por fim, PR-10 poderia estar interagindo diretamente com o patógeno, inativando seu desenvolvimento.

A proteína remorina (*spot 90*) também apresentou aumento de expressão em todos os tempos experimentais testados. Remorinas são proteínas de plantas vasculares com função ainda desconhecida. São proteínas transmembranares, possuindo domínios citosólicos, além de serem encontradas nos plasmodesmas. O papel fisiológico dessas proteínas tem sido analisado em plantas transgênicas, mostrando que a remorina interfere no movimento célula-a-célula do vírus X que infecta batata, ligando-se diretamente à proteína *TGBp1*, responsável pelo movimento viral (Raffaele *et al.*, 2009).

Em virtude da localização subcelular, remorinas provavelmente desempenham papéis importantes em processos de transdução de sinais. O papel dessas proteínas na interação planta-bactéria tem sido observado durante a simbiose e formação dos nódulos radiculares entre *M. truncatula* e *Sinorhizobium meliloti*, mostrando que ocorre indução dessa proteína durante a nodulação (Lefebvre *et al.*, 2009).

Estudos têm sugerido o envolvimento de remorinas na ETI, haja vista o aumento da expressão do gene *AtREM1.2*, que codifica para remorina, em plantas de *Arabidopsis* expressando o efector bacteriano *AvrRPM1*. Isoformas adicionais da proteína foram encontradas em estado ativado indicando a diferencial fosforilação do gene *AtREM1.2* dependente da interação entre *AvrRPM1* (molécula efetora do

patógeno) e sua correspondente proteína *R*, *RPM1* (Widjaja *et al.*, 2009; Jarsch & Ott, 2011). Além disso, tem sido reportado que o gene *AtREM1.2* interage com *RIN4*, molécula envolvida na sinalização das respostas de defesa mediada pelas proteínas *NB-LRR* (Liu *et al.* 2009).

Os *spots* 07 e 45 foram identificados como protease cisteínica e protease cisteínica *RD21a-like*, respectivamente. Proteases podem ter papel direto na hidrólise de proteínas secretadas por patógenos, prevenindo a patogênese. Tais enzimas podem desempenhar diversas funções em respostas de defesa, agindo no reconhecimento, sinalização e atuação direta sobre o patógeno (Van der Hoorn & Jones, 2004).

D'Silva *et al.*, (1998) estudaram a ativação de proteases cisteínicas em plantas de feijão-de-corda, infectadas com o fungo da ferrugem, durante a resposta hipersensitiva, mostrando a ativação de proteases do tipo caspases no processo de morte celular induzida em plantas, reforçando a importância dessas proteases na resistência à doença.

Essas evidências sugerem a participação de proteases cisteínicas em respostas de defesa contra patógenos. Após inoculação de plantas resistentes de feijão-de-corda BR-3 com o fungo *C. gloeosporioides*, isolado LPVD-1, houve indução de uma protease cisteínica em 24 HAI, referente ao *spot* 07, bem como o aumento de expressão da protease cisteínica *RD21a*, *spot* 45, no mesmo período de tempo, o que demonstra a necessidade de ativação de tais proteínas em momentos iniciais da interação planta-fungo, haja vista a capacidade dessas proteínas em reconhecer e hidrolisar proteínas envolvidas com a virulência do patógeno.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As mudanças que ocorrem no proteoma foliar de plantas de feijão-de-corda, genótipo BR-3, induzidas pelo contato com o fungo *C. gloeosporioides*, isolado LPVD-1, sugerem relação com o fenótipo de resistência à antracnose. De modo geral, diversas proteínas apresentaram alterações no padrão de expressão basal em decorrência da inoculação fúngica.

Nessa perspectiva, os mecanismos de defesa do genótipo BR-3 frente ao isolado LPVD-1 consistem na regulação de componentes celulares como, metabolismo, fotossíntese e resposta ao estresse oxidativo, assegurando o estabelecimento de uma nova homeostase para que, proteínas relacionadas com a defesa, resposta ao estresse e demais funções, possam atuar bloqueando o desenvolvimento e proliferação da doença.

Esses achados apresentam grande relevância por contribuir com o entendimento dos principais eventos celulares que caracterizam a interação incompatível entre o feijão-de-corda e o fungo *C. gloeosporioides*, provendo perspectivas para o direcionamento de programas de melhoramento dessa cultura frente ao ataque de patógenos fúngicos.

REFERÊNCIAS

ACQUADRO, A.; FALVO, S.; MILA, S.; ALBO, A. G.; COMINO, C.; MOGLIA, A.; LANTERI, S. Proteomic in globe artichoke: Protein extraction and sample complexity reduction by PEG fractionation. *Electrophoresis*, v. 30, p. 224-230, 2009.

ALFENAS-ZERBINI, P.; MAIA, I. G.; FÁVARO, R. D.; CASCARDO, J. C. M.; BROMMON-SCHENKEL, S. H.; ZERBINI, F. M. Genome-wide analysis of differentially expressed genes during the early stages of tomato infection by a potyvirus. *MPMI*, v. 22, 352-361, 2009.

AN, C.; MOU, Z. Salicylic acid and its function in plant immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 53, p. 412-428, 2011.

ANDRADE, A. *Sequenciamento, identificação e análise de proteínas do caule de mudas de Eucalyptus grandis*. 120p. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba – SP, 2006.

ANDRADE, E. M.; UESUGI, C. H.; UENO, B.; FERREIRA, M. A. S. V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao Mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 32(1), 2007.

ANDRADE, F. N. *Avaliação e seleção de linhagens de tegumento e cotilédone verdes para o mercado de feijão caupi-verde*. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, 2010.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, v.55, p.373-399, 2004.

ARAÚJO-FILHO, J. H. *Análise proteômica de raízes de feijão-de-corda (Vigna unguiculata), cv. CE-31, inoculadas com o nematóide das galhas (Meloydogine incognita)*. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2011.

ARMESTO, C.; MAIA, F. G. M.; ABREU, M. S.; FIGUEIRA, A. R.; SILVA, B. M.; MONTEIRO, F. P. Genetic transformation with the GFP gene of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from coffee with blister spot. *Brazilian Journal of Microbiology*, p.1222-1229, 2012.

ASANO, T.; KIMURA, M.; NISHIUCHI, T. The defense response in *Arabidopsis thaliana* against *Fusarium sporotrichioides*. *Proteome science*, v. 10, p.1-10, 2012.

BALOWS, A.; HAUSLER, W. J.; Herrman, K. L. Manual of clinical microbiology. 5th ed. American Society of Microbiologists, Washington, DC. 1364p., 1991.

BARRET, L. G., HEIL, M. Unifying concepts and mechanisms in the specificity of plant–enemy interactions. *Trends in Plant Science* 17: 282-292. 2012.

BARRETO, A. L. H. *Estratégias de Infecção dos fungos Colletotrichum lindemuthianum [(Sacc & Magnus) Briosi & Cav.] e Colletotrichum gloeosporioides [(Penz) Penz & Sacc.] em feijão-de-corda [Vigna unguiculata (L.) Walp.] e respostas bioquímicas e moleculares associadas à defesa da planta*. Tese (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2005.

BARRETO, A. L. H. *et al.*, Infection process and host defense responses in compatible and incompatible interactions between cowpea (*Vigna unguiculata*) and *Colletotrichum gloeosporioides*. *International Journal of Plant Science*. v. 168(2), p. 193-203, 2007.

BECK, M.; HEARD, W.; MBENGUE, M.; ROBATZEK, S. The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 367-374, 2012.

BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, v. 58(15/16), p. 4019-4026, 2007.

BOCCA, S. N.; MAGIOLI, C.; MANGEON, A.; JUNQUEIRA, R. M.; CARDEAL, V.; MARGIS, R.; SACCHETTO-MARTINS, G.; Survey of glycine-rich proteins (GRPs) in the Eucalyptus expressed sequence tag data-base (ForEST). *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, p. 608-624, 2005.

BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review in Plant Biology*. v. 60, p. 379-406. 2009.

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

BUFE, A.; SPANGFORT, M. D.; KAHLERT, H.; SCHLAAK, M.; BECKER, W-M. The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity. *Planta*, v. 199, p. 413-15, 1996.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L. *et al.*, Blue silver: a very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, v. 25, p. 1327-1333, 2004.

CANNON, P. F.; DAMM, U.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B.S. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology*, v. 73, p. 181-213, 2012.

CANTÚ, M.D. *Análise proteômica diferencial aplicada para o estudo da morte súbita dos citros*. 229p. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos – SP. 2007.

CHEN, R. Plant NADP-dependent isocitrate dehydrogenases are predominantly localized in the cytosol. *Planta*, v. 207, p. 280-285, 1998.

- COAKER, G.; FALIK, A.; STASKAWICZ, B. Activation of a phytopathogenetic bacteria effector protein by eukaryotic cyclophilin. *Science*, v. 308, p. 548-550, 2005.
- COLL, N. S.; EPPLE, P.; DANGL, J. L.; Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differentiation*. v. 18, p. 1247-1256, 2011.
- CUNHA, R.B., CASTRO, M.S., FONTES, W. *Espectrometria de massa de proteínas*. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, ano IX, 36, 2006.
- DASS, C. *Introduction to mass spectrometry*. In: Principles and practice of biological mass spectrometry, Amsterdam: Wiley, 2001.
- DEISING, H. B.; WERNER, S.; WERNITZ, M. The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 1631-1641, 2000.
- DEMPSEY, D. A.; KLESSIG, D. F. SOS – too many signals for systemic acquired resistance? *Trends in Plant Science*. v. 17(9), p. 538-545, 2012.
- DE PINTO, M.C.; PARADISO, A.; LEONETTI, P.; DE GARA, L. Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxi-dase at the crossroad between defence and cell death. *The Plant Journal*, v. 48, p. 784-795, 2006.
- DIETZ, K. J.; JACOB, S.; OELZE, M. L.; LAXA, M.; TOGNETTI, V.; MIRANDA, S. M.N.; BAIER, M.; FINKEMEIER, I. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany*, v. 57(8), p. 1697-1709, 2006.
- DIOUF, D. Recent advances in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] “omics” research for genetic improvement. *African Journal of Biotechnology*, v. 10(15), p. 2803-2810, 2011.
- D'IPPÓLITO, S.; MARTÍN, M. L.; SALCEDO, M. F.; ATENCIO, H. M.; CASALONGUÉ, C. A.; GODOY, A. V.; FIOL, D. F. Transcriptome profiling of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* infected potato tubers provides evidence of an inducible defense response. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 75, p. 3-12, 2010.
- D'SILVA, I.; POIRIER, G. G.; HEATH, M. C. Activation of Cysteine Proteases in Cowpea Plants during the Hypersensitive Response - A Form of Programmed Cell Death. *Experimental Cell Research*, v. 245, p. 389-399, 1998.
- DURRANT, W. E., DONG, X. Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology*, v. 42, p. 185-209, 2004.
- EBRAHIM, S.; USHA, K.; SINGH, B. Pathogenesis-related (PR)-proteins: Chitinase and -1,3-glucanase in defense mechanism against malformation in mango (*Mangifera indica* L.). *Scientia Horticulturae*, v. 130, p. 847-852, 2011.

EKRAMODDOULLAH, A. K. M. Physiology and molecular biology of a family of pathogenesis-related PR-10 proteins in conifers. *Journal of Crop Improvement*, v. 10, p. 261-80, 2004.

EMECHEBE, A.M.; FLORINI, D.A. Shoot and pod diseases of cowpea induced by fungi and bacteria. In: SINGH, B.B.; MOHAN, D.R. R.; DASHIELL, K. E.; JACKAI, L., Advances in cowpea research. *International Institute of Tropical Agriculture*, Ibadan, Nigeria, p. 176-192, 1997.

ESSMANN, J.; SCHMITZ-THOM, I.; SCHON, H.; SONNEWALD, S.; WEIS, E.; SCHARTE, J. RNAi-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco. *Plant Physiology*, v. 47, p. 1288-1299, 2008.

FAN Q., NIROULA M., FELDSTEIN P. A., BRUENING G. Participation of the Cowpea mosaic virus protease in eliciting extreme resistance. *Virology* 417: 71-78. 2011.

FANG, X.; Chen, W.; XINA, Y.; ZHANG, H.; YAN, C.; YU, H.; LIU, H.; XIAO, W.; WANGA, S.; ZHENG, A.; LIU, H.; JIN, L.; MA, H.; RUAN, S. Proteomic analysis of strawberry leaves infected with *Colletotrichum fragariae*. *Journal of Proteomics*, v. 75, p. 4074-4090, 2012.

FAO/WHO. *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*. 2. ed. World Health Organization, Geneva, p. 194-315, 2004.

FAULKNER, C.; ROBATZEK, S. Plants and pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 699-707, 2012.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, v. 8, p. 677-700, 2007.

FLOR, H. H. Host-parasite interaction in flax rust: its genetic and other implications. *Phytopathology*, v. 45, p. 680-685, 1955.

FLORES, T.; ALAPE-GIRON, A.; FLORES-DIAZ, M.; FLORES, H. E. Ocatin, a novel tuber storage protein from the andean tuber crop oca with antibacterial and antifungal activities. *Plant Physiology*, v. 128, p. 1291-1302, 2002.

FOYER, C. H.; BLOOM, A. J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review in Plant Biology*, v. 60, p. 455-484, 2009.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology*, v. 155, p. 2-18, 2011.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, St Paul, v.82, n.6, p.596-605, 1998.

FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; SANTOS, A. A.; VIANA, F. M. P. Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale L.*) in Brazil. *Crop Protection*, v.21, p. 489-494, 2002.

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

FREIRE-FILHO, F. R.; ROCHA, M. de M.; RIBEIRO, V. Q.; SITTO LIN, I. N. *Avanços e perspectivas da cultura do feijão-caupi*. Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, v.1, p. 235-250, 2008.

FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata L. Walp*), cultivar BRS-Milênio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28(2), p.470-476, 2008.

FULDA, S.; MIKKAT, S.; STEGMANN, H.; R. HORN. Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Plant Biology*, v. 13, p. 632-664, 2011.

GADJEV, I.; VANDERAUWERA, S.; GECHEV, T. S.; LALOI, C.; MINKOV, I. N.; SHULAEV, V.; APEL, K.; INZÉ, D.; MITTLER, R.; VAN BREUSEGEM, F. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 141, p. 436-445, 2006.

GAY, C., COLLINS, J., GEBICKI, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. *Analytical Biochemistry*, v. 273, p. 149-155, 1999.

GERHARDT, S.; ECHT, S.; BUSCH, M.; FREIGANG, J.; AUERBACH, G.; BADER, G.; MARTIN, W. F.; BACHER, A.; HUBER, R.; FISCHER, M. Structure and properties of an engineered transketolase from maize. *Plant Physiology*, v. 132, p. 1941-1949, 2003.

GHOSH, M. Antifungal Properties of Haem Peroxidase from *Acorus calamus*. *Annals of Botany* v. 98, p. 1145-1153, 2006.

GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology*, v. 43, p. 205-227, 2005.

GLOWACKI, S.; MACIOSZEK, V. K.; KONONOWICZ, A. K. R proteins as fundamentals of plant innate immunity. *Cellular & Molecular Biology Letters* 16: 1-24, 2011.

GOLUBENKO, Z.; AKHUNOV, A.; KHASHIMOVA, N.; BERESNEVA, Y.; MUSTAKIMOVA, E.; IBRAGIMOV, F.; ABDURASHIDOVA, N.; STIPANOVIC, R. Induction of Peroxidase as Disease Resistance Response in Resistant (*Hibiscus trionum*) and Susceptible (*Althea armeniaca*) Species In the Family Malvaceae. *Phytoparasitica*, v. 35(4), p. 401-413, 2007.

GONDIM, D. M. F. *Bases Bioquímicas da Interação do Cajueiro Anão Precoce com o Fungo Lasiodiplodia theobromae causador da Resinose*. 143p. Tese (Doutorado em Bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE. 2010.

GÖRG, A.; OBERMAYER, 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.

GRANIER, F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 9, p. 712-718, 1988.

GUPTA, M.; YOSHIOKA, H.; OHNISHI, K.; MIZUMOTO, H.; HIKICHI, Y.; KIBA, A. A Translationally Controlled Tumor Protein Negatively Regulates the Hypersensitive Response in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiology*, v. 54(8), p. 1403-1414, 2013.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C. P., *et al.* Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 78, p. 51-65, 2012.

GUST, A. A.; NURNBERGER, T. A life or death switch. *Nature*, v. 486, p. 198-199, 2012.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 55(2), p. 77-84, 1999.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; KANYUKA, K. Resistance genes (R genes) in plants. *eLS*, 2007.

HARP, T. L.; PERNEZNY, K.; IVEY, M. L. L.; MILLER, S. A.; KUHN, P. J.; DATNOFF, L. The etiology of recent pepper anthracnose outbreaks in Florida. *Crop Protection*, v. 27, p. 1380-1384, 2008.

HASHIMOTO, M.; KISSELEVA, L.; SHINICHIRO SAWA,; TOSHIKO FURUKAWA,; SETSUKO KOMATSU,; TOMOKAZU KOSHIBA. A Novel Rice PR10 Protein, RSOsPR10, Specifically Induced in Roots by Biotic and Abiotic Stresses, Possibly via the Jasmonic Acid Signaling Pathway. *Plant Cell Physiology*, v. 45(5), p. 550-559, 2004.

HATSUGAI, N.; IWASAKI, S.; TAMURA, K.; KONDO, M.; FUJI, K.; OGASAWARA, K.; NISHIMURA, M.; HARA-NISHIMURA, I. A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes & Development*, v. 23, p. 2496-2506, 2009.

HEATH, M. C. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*. v. 3, p. 315 – 319, 2000.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. *The water-culture method for growing plants without soil*. Californian Agricultural Experimental Station, Berkeley: University of California, 1950, 139p.

HOK, S.; ATTARD, A.; KELLER, H. Getting the most from the host: How pathogens force plants to cooperate in disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. v. 23, p. 1253-1259. 2010.

IAKIMOVA, E. T.; SOBICZEWSKI, P.; MICHALCZUK, L.; *et al.* Morphological and biochemical characterization of *Erwinia amylovora*-induced hypersensitive cell death in apple leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. v. 63, p. 292-305, 2013.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. 2008. Disponível em: www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa. Acesso em: 06 dez. 2012.

ISAACSON, T.; DAMASCENO, C. M. B.; SARAVANAN R. S.; HE, Y.; CATALA, C.; SALADIE, M.; ROSE, J. K. C. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nature Protocols*, v. 1, p. 769-774, 2006.

JARSCH, I. K.; OTT, T.; Perspectives on Remorin Proteins, Membrane Rafts, and Their Role During Plant-Microbe Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 24(1), p. 7-12, 2011.

JONES, A. M. E.; THOMAS, V.; BENNETT, M. H.; MANSFIELD, J.; GRANT, M. Modifications to the Arabidopsis Defense Proteome Occur Prior to Significant Transcriptional Change in Response to Inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology*, v. 142, p. 1603-1620, 2006.

JONES, J. D. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Current Opinion in Plant Biology*. v. 4, p. 281-287. 2001.

JONES, J.D.; DANGL, J.L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, p. 323-329, 2006.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. *Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas*. 4. ed. São Paulo, Editora Ceres, v.2, p.607-626, 2005.

KLEEMANN, J. et. al. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathogens*, v. 8(4), p. 1-15, 2012.

KOGA, H.; DOHI, K.; NISHIUCHI, T.; KATO, T.; TAKAHARA, H.; MORI, M.; KOMATSU, S. Proteomic analysis of susceptible rice plants expressing the whole plant-specific resistance against *Magnaporthe oryzae*: Involvement of a thaumatin-like protein. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 77, p. 60-66, 2012.

KUZNIAK, E.; KAZMIERCZAK, A.; WIELANEK, M.; GLOWACKI R.; KORNAS, A. Involvement of salicylic acid, glutathione and protein S-thiolation in plant cell death-mediated defence response of *Mesembryanthemum crystallinum* against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 63, p. 30-38, 2013.

LEE, H. J.; KIM, J. S.; YOO, S. J.; KANG, E. Y.; HAN, S. H.; YANG, K. Y.; KIM, Y. C.; GARDENER, M. B.; KANG, H. Different roles of glycine-rich RNA-binding protein7 in plant defense against *Pectobacterium carotovorum*, *Botrytis cinerea*, and tobacco mosaic viruses. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 60, p. 46-52, 2012.

LEFEBVRE, B. *et al.* A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 1-6, 2009.

LI, Y., et al. Mechanism of plant-microbe interaction and its utilization in disease resistance breeding for modern agriculture. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 83:51-58, 2013.

LIMA, G. A. S. *Produção de feijão no Ceará*. Companhia Nacional de Abastecimento, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 03/07/2013.

LIU, J.-J.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 68, p. 3-13, 2006.

LIU, J.; ELMORE, J. M.; FUGLSANG, A. T.; PALMGREN, M. G.; STASKAWICZ, B. J.; COAKER, G. RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biology*, v. 7, p. 1-16, 2009.

LIU, Y.; WANG, L.; XING, X.; SUN, L.; PAN, J.; KONG, X.; ZHANG, M.; LI, D. ZmLEA3, a multifunctional group 3 LEA protein from maize (*Zea mays* L.), is involved in biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Physiology*, v. 54(6), p. 944-959, 2013.

MAJOR, I. T.; NICOLE, M.-C.; DUPLESSIS, S.; SE´GUIN, A. Photosynthetic and respiratory changes in leaves of poplar elicited by rust infection. *Photosynth Research*, v. 104, p. 41-48, 2010.

MANDADI, K. K.; SCHOLTHOF, K. B. G. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *The Plant Cell*. p. 1-17, 2013.

MARTÍNEZ, E. P.; HÍO, J. C.; OSORIO, J. A.; TORRES, M. F. Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. *Agronomía Colombiana*, v. 27(2), 211-218, 2009.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*. vol 3, p. 232-249, 2011.

MCCLUNG, C. R. Defence at dawn. *Nature*, v. 470, p. 44-45, 2011.

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

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, Suplemento, p.523-524, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V.B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Science*, v. 16, p. 300-309, 2011.

MOCHIDA, K.; SHINOZAKI, K. Genomics and bioinformatics resources for crop improvement. *Plant Cell Physiology*, v. 51(4), p. 497-523, 2010.

MURIEL, C. V.; PASCALE, V. B.; NICHOLAS, N. J. A Magnaporthe grisea cyclophilin acts as a virulence determinant during plant infection. *The Plant Cell*, v. 14, p. 917-930, 2002.

MUR, L. A.; KENTON, P.; LLOYD, A. J.; OUGHAM, H.; PRATS, E. The hypersensitive response: the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, v. 59, p. 501-520, 2008.

NEILSON E. H., GOODGER J. Q. D., WOODROW I. E., MOLLER, B. L. Plant Chemical defense: at what cost? *Trends in Plant Science*, 18 (5), 250-258, 2013.

NEWMAN, M. A.; SUNDELIN, T.; NIELSEN, J. T.; ERBS, G. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, p. 1-14, 2013.

NICAISE, V.; ROUX, M.; ZIPFEL, C. Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiology*, v. 150, p.1638-1647. 2009.

NOCTOR, G.; VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; DRISCOLL, S.; NOVITSKAYA, L.; FOYER, C. H. Drought and oxidative load in the leaves of the C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany*, v. 89, p. 841-850, 2002.

PARK, C. J.; KIM, K. J.; SHIN, R.; PARK, J. M.; SHIN, Y. C.; PAEK, K. H. Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant Journal*, v. 37, p. 186-198, 2004.

PEREIRA, H. S.; SANTOS, J. B.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijoeiro com resistência à antracnose selecionadas quanto a características agronômicas desejáveis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.39, n.3, p.209-215, 2004.

PETRICCIONE, M; DI CECCO, I.; ARENA, S.; SCALONI, A.; SCORTICHINI, M. Proteomic changes in *Actinidia chinensis* shoot during systemic infection with a pandemic *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strain. *Journal of Proteomics*, v. 78, p. 461-476, 2013.

PINTO, M. C.; LOCATO, V.; DE GARA, F. Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant Cell Environment*. v. 35, p. 234-244, 2012.

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

RAFFAELE, S. *et al.* Remorin, a Solanaceae Protein Resident in Membrane Rafts and Plasmodesmata, Impairs Potato virus X Movement. *The Plant Cell*, v. 21, p. 1541-1555, 2009.

RAFIQI, M.; ELLIS, J. G.; LUDOWICI, V. A.; HARDHAM, A. R.; DODDS, P. T. Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 15, p. 477-482, 2012.

RAJU S.; JAYALAKSHMI S. K.; SREERAMULU, K. Differential elicitation of proteases and protease inhibitors in two different genotypes of chickpea (*Cicer arietinum*) by salicylic acid and spermine. *Journal of Plant Physiology*, v. 166, p. 1015-1022, 2009.

RINALDI, C.; KOHLER, A.; FREY, P.; DUCHAUSSOY, F.; NINGRE, N.; COULOUX, A.; WINCKER, P.; LE THIEC, D.; FLUCH, S.; MARTIN, F.; DUPLESSIS, S. Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiology*, v. 144 p. 347-366, 2007.

ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M.; JONES, J. D. G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: More than just Jasmonate-Salicylate antagonism. *Annual Review Phytopathology*, v. 49, p. 317-343, 2011.

ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; LE BIHAN, M. C.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; ROEPSTORFF, P. 2D gels still have a niche in proteomics. *Journal of Proteomics*, v. 88, p. 4-13, 2013.

ROJAS, C. M.; MYSORE, K. S. Glycolate oxidase is an alternative source of H₂O₂ production during plant defense responses and functions independently from NADPH oxidase. *Plant Signaling & Behavior*, v. 7, p. 752-755, 2012.

ROJAS, C. M.; SENTHIL-KUMAR, M.; WANG, K.; RYU, C. M.; KAUNDA, L. A.; MYSORE, K. S. Glycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, v. 24, p. 336-352, 2012.

ROMANO, P. G. N.; HORTON, P.; GRAY, J. E. The Arabidopsis Cyclophilin Gene Family 1. *Plant Physiology*, v. 134, p. 1268-1282, 2004.

SANABRIA, A.; MAHUKU, G.; KELEMU, S.; CADAVID, M.; GARCIA, C.; HÍO, J. C.; MARTÍNEZ, E.; OSORIO, J. A. Molecular identification and characterization of *Colletotrichum* sp. isolates from Tahiti lime, tamarillo, and mango. *Agronomía Colombiana*, v. 28(3), p. 391-399, 2010.

SELLSCHOP. J. P. F. Cowpeas. *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Field Crop*, v.15, n.4, p.259-266, 1962.

SILVA, M. G. S.; VITTI, G. C.; TREVIZAN, A. R. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 42, p. 527-535, 2007.

SILVA, L. G. C. *Caracterização de isolados de Colletotrichum gloeosporioides associados à antracnose do cajueiro*. 90p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, 2011.

SILVA, M. D. M. *Atributos biológicos de neossolo e produtividade do feijão-caupi após três anos de aplicações consecutivas de lodo de curtume compostado*. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Produção Vegetal). Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI. 2012.

SILVEIRA, J. A. G.; COSTA, R. C. L.; OLIVEIRA, J. T. A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium* spp. under moderate nitrate level. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 187-194, 2001.

SOARES, A. L. L.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B. *Nodulação e produtividade de feijão-caupi cv. Poços de Caldas por estirpes selecionadas de rizóbio em Iguatama - MG*. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, Teresina. Anais, Teresina: Embrapa, 2006.

SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Review Immunology*, v.12, p. 89-100, 2012.

STEPHENSON, S. A.; HATFIELD, J.; RUSU, A. G.; MACLEAN, D. J.; MANNERS, J. M. CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. *Molecular Plant Microbe Interact*, v. 13, p. 929-941, 2000.

SUZUKI, N.; KOUSSEVITZKY, S.; MITTLER, R.; MILLER, G. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environment*, v. 35, p. 259-270, 2012.

SWARBRICK, P. J.; SCHULZE-LEFERT, P.; SCHOLLES, J. D. Metabolic consequences of susceptibility and resistance in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant, Cell and Environment*, v. 29, p. 1061-1076, 2006.

VÂLCU, C. M.; SCHLINK, K. Reduction of proteins during sample preparation and two-dimensional gel electrophoresis of woody plant samples. *Proteomics*, v. 6, p. 1599-1605, 2006.

VANDER HOORN R. A.; JONES, J. D. The plant proteolytic machinery and its role in defense. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 7, p. 400-407, 2004.

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

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

WANG, S.; SHAO, B.; RAO, P.; DENG, Z.; XIE, M. Limlin, a novel leguminous peroxidase with antifungal activity from *Phaseolus limensis*. *Journal of Food Biochemistry*, v. 35, p. 1206-1222, 2011.

WANG, W.; TAI, F.; CHEN, S. Optimizing protein extraction from plant tissues for enhanced proteomics analysis. *J. Sep. Scientiae*, v. 31, p. 2032-2039, 2008.

WANG, Y.; LIN, A.; LOAKE, G. J.; CHU, C. H₂O₂-induced Leaf Cell Death and the Crosstalk of Reactive Nitric/Oxygen Species. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 55(3), p. 202-208, 2013.

WAWIRE, M.; OEY, I.; MATHOOKO, F. M.; NJOROGE, C. K.; SHITANDA, D.; SILA, D.; HENDRICKX, M. Effect of harvest age and thermal processing on poly-g-glutamate folates and minerals in African cowpea leaves (*Vigna unguiculata*). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 25, p. 160-165, 2012.

WIDJAJA, I.; NAUMANN, K.; ROTH, U.; WOLF, N.; MACKEY, D.; DANGL, J. L.; SCHEEL, D.; LEE, J. Combining subproteome enrichment and Rubisco depletion enables identification of low abundance proteins differentially regulated during plant defense. *Proteomics* v. 9, p. 138-147, 2009.

WUA, L.; HANA, Z. I.; WANGA, S.; WANGA, X.; SUND, A.; ZUA, X.; CHEN, Y. Comparative proteomic analysis of the plant-virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. *Journal of Proteomics*, v. 89, p. 124-140, 2013.

XIE, L.; ZHANG, J.; WAN, Y.; HU, D. Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*, v. 11(1), p. 61-70, 2010.

YANG, Y.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Development*, v.11, p. 621-639, 1997.

YE, X. Y.; NG, T. B. A novel cyclophilin-like antifungal protein from the mung bean. *Biochemistry Biophysical Research Communications*, v. 273, p. 1111-1115, 2000.

YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation of a novel peroxidase from French bean legume and first demonstration of antifungal activity of a non-milk peroxidase. *Life sciences*, v. 71, p. 1667-1680, 2002.

YOUNG, R. A.; ELLIOTT, T. J. Stress proteins, infection and immune surveillance. *Cell*, v. 59, p. 5-8, 1989.

ZHAO, F.; FANG, W.; XIE, D.; ZHAO, Y.; TANG, Z.; LI, W.; NIE, L.; LV, S. Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Gossypium thurberi* inoculated with cotton *Verticillium dahliae*. *Plant Science* v. 185-186, p. 176-184, 2012.

ZHOU, Y.; CAI, H.; XIAO, J.; LI, X.; ZHANG, Q.; LIAN, X. Over-expression of aspartate aminotransferase genes in rice resulted in altered nitrogen metabolism and increased amino acid content in seeds. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 118, p. 1381-1390, 2009.