



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TÚLIO DIEGO DA SILVA

RECONHECIMENTO, SINALIZAÇÃO E INDUÇÃO DE RESPOSTA NO TOMATEIRO
INFECTADO COM *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* : UMA ABORDAGEM
PROTEÔMICA

Recife, 2016

TÚLIO DIEGO DA SILVA

RECONHECIMENTO, SINALIZAÇÃO E INDUÇÃO DE RESPOSTA NO TOMATEIRO
INFECTADO COM *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* : UMA ABORDAGEM
PROTEÔMICA

Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do Programa
de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção
do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia
Orientadora

Prof^a Dr^a Márcia Vanusa da Silva
Co-orientadora

Recife, 2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Túlio Diego da

Reconhecimento, sinalização e indução de resposta no tomateiro infectado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: uma abordagem proteômica / Túlio Diego da Silva.
Recife: O Autor, 2016.

99 f.: il.

Orientadoras: Maria Tereza dos Santos Correia, Márcia Vanusa da Silva
Tese (doutorado) Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2016.
Inclui referências e anexos

1 Plantas agrícolas -- Controle I Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II Silva, Márcia Vanusa da (coord.) III. Título.

632.9

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-069

TÚLIO DIEGO DA SILVA

RECONHECIMENTO, SINALIZAÇÃO E INDUÇÃO DE RESPOSTA NO TOMATEIRO
INFECTADO COM *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* : UMA ABORDAGEM
PROTEÔMICA

Tese de Doutorado apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos
requisitos à obtenção do grau de doutor em Ciências
Biológicas..

Data da Aprovação: 23 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica ã UFPE

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Departamento de Bioquímica ã UFPE

Prof. Dr. Tercílio Calsa Júnior
Departamento de Genética ã UFPE

Dr. Ailton Reis
Laboratório de Fitopatologia ã Embrapa Hortaliças (CNPq)

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart
Departamento de Biologia Celular ã UnB

Recife, 2016

"Acreditar não é uma escolha, mas sim uma convicção. "
(STAR WARS)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha avó Lizete Felix, pelo amor, carinho, dedicação, educação e princípios ensinados;

Às Prof^{as}. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia e Márcia Vanusa, pela orientação, estima, atenção dada ao longo desse trabalho e por terem proporcionado mais um avanço na minha vida acadêmica;

À minha família, meu pai, Gilvam Bezerra, minha mãe Maria da Conceição e meu irmão, Themístocles Diogo, pelo amor, apoio e incentivo a nunca desistir;

À minha esposa Celina Oliveira, por todo amor, carinho, dedicação, atenção, paciência e por ser essa pessoa tão maravilhosa;

À Clébia Almeida, pela atenção e grande ajuda dada nos trabalhos e, acima de tudo, pela sua grande amizade;

À Universidade Federal de Pernambuco e o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, em nome dos servidores e funcionários;

Aos grandes amigos Bruno Lima, Felipe Ferreira e Karollina Lopes, por sempre estarem ao meu lado e me mostrarem o valor da amizade verdadeira;

Ao 3V, Clarissa França, Sarah Romini e Daniel Araújo pela amizade e longas conversas sobre a vida acadêmica e o mundo fora dela;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da UFPE, José Adelson (Júnior ou Delsinho), Raiana Apolinário (Kokeshi), Louise Oliveira, Bárbara Ramos, pelo companheirismo;

Aos demais amigos do Bio Mol, por todo o apoio e dedicação;

À Ana Cláudia Jardelino, por todo o carinho e amizade proporcionada ao longo dos anos;

Ao Dr. Ailton Reis, por me receber na Embrapa Hortaliças;

Ao grupo do Laboratório de Fitopatologia, Fabiana, Luana, Fred, Luiz, Maurício, Amanda, Cléia, Iran, novos amigos, que me acolherem calorosamente;

Ao Professor Marcelo Valle, pela parceria de longa data;

Aos professores Carlos André Ricart e Wagner Fontes, por toda ajuda e conselhos;

Aos amigos do Laboratório Bioquímica e Química de Proteínas, Arthur, Agenor Micaella, Nuno, por todo o tempo dedicado e grande amizade, que mesmo construída em pouco tempo, levarei para sempre;

Aos meus demais amigos, pela amizade, os momentos divertidos e pelo convívio que nos tornou uma família;

Ao CETENE, em nome de Júlia Campos e Nataly Amorim, por todo tempo dedicado e o espaço e equipamento cedidos;

Bem, e agradeço a todos aqueles que, mesmo não estando nesta pequena lista, colaboraram de alguma maneira para o desenvolvimento da minha carreira na pesquisa;

RESUMO

A fusariose é uma das doenças mais importantes do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). Ela é causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) e causa elevadas perdas na agricultura, pois o controle químico não é eficiente. Entender a interação planta-patógeno é a chave para o manejo da doença e o melhor guia para os programas de melhoramento. A maior parte da interação entre o patógeno e o hospedeiro ocorre através de proteínas de reconhecimento, sinalização ou das respostas desencadeadas. Assim, este estudo propôs avaliar as alterações no proteoma da raiz do tomateiro infectado com Fol, através da eletroforese bidimensional (2-DE), marcação com iTRAQ e espectrometria de massas. Foram utilizadas a cultivar BHRS 2,3 (resistente) e Viradouro (suscetível), além de um isolado da raça 3 de Fol, introduzido recentemente no país, tendo assim, poucas cultivares resistentes. Após 21 dias de crescimento, raízes foram cortadas, inoculadas com suspensão de esporos do patógeno e coletadas nos tempos um, quatro e sete dias após a inoculação. As proteínas foram extraídas, quantificadas, separadas por 2-DE, analisadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF e identificadas com a ferramenta MASCOT. Os extratos proteicos também foram digeridos com tripsina, marcados com iTRAQ, fracionados e dessalinizados. A LC-MS/MS foi feita através do cromatógrafo UPLC Dyonex 3000 com aquisição dos espectros realizada através do Orbitrap Elite. Quatro dias após a inoculação, 21 proteínas separadas por 2-DE mostraram-se diferencialmente reguladas na cultivar BHRS 2,3. 12 com aumento de expressão e nove sub reguladas. Após sete dias de inoculação, a cultivar Viradouro apresentou 204 proteínas com expressão diferencial, 93 proteínas reguladas positivamente e 111 proteínas reguladas negativamente. Além disso, foi possível identificar 41 proteínas do fungo. Não houveram proteínas reguladas com consistência estatística na cultivar resistente. Com 24 horas após a inoculação houve a regulação de seis proteínas na cultivar BHRS 2,3. Das proteínas reguladas após 24h, destaca-se a proteína de membrana remorina, relacionada à percepção de patógenos e nunca relatada no patossistema tomateiro/Fol. Após quatro dias, várias proteínas de defesa apresentaram aumento de expressão na cultivar resistente. Com sete dias de infecção, proteínas relacionadas com a defesa da cultivar Viradouro apresentaram diminuição na expressão, proteínas de reconhecimento de fungos, de sinalização e relacionadas a patogenicidade são exemplos. Além disso, várias proteínas ribossomais também estavam reguladas negativamente, prejudicando a síntese global de proteínas. Entre as proteínas com aumento de expressão, destacam-se proteínas relacionadas com explosão oxidativa, evento da reação de hipersensibilidade,

um mecanismo de defesa da planta. Em relação às proteínas do fungo observadas, a maior parte está relacionada ao desenvolvimento e proteínas estruturais. Entretanto, a enzima *4-coumarate-ligase-like 9*, relacionada a síntese do ácido jasmônico, pode indicar influência do fungo na biologia da planta. Os resultados evidenciaram diversas proteínas ativadas e desativadas durante a interação do tomateiro com o Fol, onde pode-se observar a dinâmica entre o ataque do fungo e as defesas da planta. Além disso, o aumento da expressão da remorina, nunca antes descrita nesse patossistema, pode contribuir com futuros estudos de manejo da fusariose.

Palavras Chave: *Solanum lycopersicum* L. murcha de fusário. Interação Planta-Patógeno. Proteômica. iTRAQ. LC-MS/MS.

ABSTRACT

The Fusarium wilt is one of the most important diseases in tomato cultivation (*Solanum lycopersicum* L.) around the world. It is caused by soil fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) and annually causes great losses to agriculture since chemical control is inefficient. Understanding the plant-pathogen interaction is the key to better handling the infection and it's the best guide for genetic enhancement programs. The greater part of the host-pathogen interaction is done through proteins, those being recognizing, signaling or triggered responses. Therefore, this paper proposes to evaluate the alterations to Fol-infected tomato root proteome through two-dimensional electrophoresis (2-DE), iTRAQ marking and mass spectrometry. BHRS 2,3 (resistant) and Viradouro (susceptible) cultivars were used, as well as an isolate of Fol race 3 for being recently introduced in the country, thus having few resistant tomato cultivars. After 21 days of growth, roots were cut, inoculated with a pathogen spore suspension and collected after one, four and seven days of inoculation. Proteins were extracted, quantified, separated by 2-DE, analyzed by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry and identified by MASCOT tool. Protein extracts were also digested with trypsin, marked with iTRAQ, fractioned and desalinized. LC-MS/MS was done through UPLC Dyonex 3000 chromatograph and specter acquisition was done via Orbitrap Elite. Four days after inoculation, 21 proteins separated by 2-DE turned up to be differentially regulated in cultivar BHRS 2,3, 12 with increased expression and nine sub regulated. After seven days of inoculation, cultivar Viradouro showed 204 proteins with differential expression, 93 of which positively regulated and 111 negatively. In addition, it was possible to identify 41 fungus proteins. There were no regulated proteins with statistic consistence in cultivar BHRS 2,3. After 24h of inoculation there was regulation of six proteins in cultivar BHRS 2,3. From the proteins regulated after 24h, remorin membrane protein stands out, since it is related to pathogen perception and had never been reported in tomato/Fol pathosystem. After four days, several defense proteins showed increased expression in the resistant cultivar. With seven days of infection, several defense related proteins from cultivar Viradouro showed a decrease in expression, with fungus recognition proteins, signaling proteins and proteins related to pathogenicity as examples. Furthermore, numerous ribosomal proteins were also negatively regulated, impairing global protein synthesis. Standing out between the proteins with increased expression were proteins related to oxidative explosion, an event component to the hypersensitivity reaction, which is one of the plant's main defense mechanisms. With regard to fungus proteins observed in the susceptible cultivar, most of those are related to growth and structural proteins. But enzyme *4-coumarate-ligase-like 9*

related to jasmonic acid synthesis may suggest fungal influence in the plant's biology. Results revealed several active and deactivated proteins during the tomato plant's interaction with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* fungus, where the dynamic between the fungus attack and plant defenses can be seen. Moreover, the increase in expression of remorin, never before described in the pathosystem, may contribute to future studies in handling Fusarium wilt.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L. Fusarium wilt. Plant-Pathogen interaction. proteomics. iTRAQ. LC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

		Pág
Referencial Teórico		
Figura 1	Representação esquemática do tomateiro	12
Figura 2	Sintomas da murcha de fusário. A ñ Murcha de um lado da folha. B ñ Escurecimento dos vasos C ñ Corte transversal do caule.	16
Figura 3	Esquema da interação planta-patógeno	18
Figura 4	Estrutura do reagente iTRAQ. A ñ iTRAQ 4-plex; B ñ iTRAQ 8-plex. As linhas indicam os sítios de fragmentação.	22
Artigo 1		
Figura 1	Overview of the proteome of tomato roots infected with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> separated by two-dimensional electrophoresis. The resolution of 2-D (12.5%) proteome with IEF / SDS-PAGE and pI 4-7 linear 220-10 kDa molecular mass.	49
Figura 2	Expanded regions of the 2-D gels showing spots of proteins that were differentially expressed. Panel A shows the spots in the samples from the healthy plant. Panel B shows the spots in the samples from plants inoculated with <i>Fusarium oxysporum</i> . The spot numbers indicated by arrows are according to the numbers used in table 1	50
Artigo 2		
Figura 1	Gel SDS-PAGE unidimensional representativo de 100µg das proteínas totais extraídas da raiz do tomateiro coradas com Coomassie Blue R-250. M ñ Marcador de massa molecular; T1-T3 - Réplicas biológicas da cultivar BHRS 2,3, não inoculado; T4-T6 ñ Réplicas biológicas da cultivar Viradouro, não inoculado; T7-T9 - Réplicas biológicas da cultivar BHRS 2,3, inoculado; T10-T12 ñ Réplicas biológicas da cultivar Viradouro, inoculado.	79
Figura 2	Distribuição dos processos biológicos das proteínas da cultivar de tomateiro Viradouro reguladas após a infecção com o fungo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . A ñ proteínas com expressão aumentada; B ñ proteínas com expressão diminuída; C ñ proteínas do fungo.	80

LISTA DE TABELAS

Referencial Teórico		Pág
Tabela 1	Composição nutricional do tomate para cada 100g de fruto fresco	13
Artigo 1		
Tabela 1	List of root proteins that are differentially regulated in the BHRS tomato genotype after challenge with <i>F. oxysporum</i> .	47
Artigo 2		
Tabela 1	Proteínas da cultivar Viradouro, com aumento da expressão.	69
Tabela 2	Proteínas da cultivar Viradouro, com diminuição da expressão.	72
Tabela 3	Proteínas do Fol identificadas	76
Artigo 3		
Tabela 1	Proteínas da cultivar BHRS 2,3, reguladas após 24 horas de infecção com o Fol.	95

SUMÁRIO

	Pág.
1 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA	11
1.1 <i>Solanum lycopersicum</i> L.	12
1.1.1 Aspectos gerais e econômicos da cultura do tomateiro	12
1.2 Fusariose	14
1.3 Interação planta patógeno	17
1.3.1 Resistencia e suscetibilidade	17
1.3.2 Interação molecular	18
1.3.3 Genes I e resistencia a fusariose	19
1.4 Proteômica	20
1.4.1 Técnicas em proteômica	21
1.4.1.3 PROTEÔMICA BASEADA EM GEL	21
1.4.1.2 PROTEÔMICA "GEL FREE"	21
1.4.1.3 iTRAQ	22
1.5 Referencias	24
2 OBJETIVOS	31
	Analysis of protein profile of the root of tomato infected with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i>
3 ARTIGO 1	33
	Identificação e quantificação das diferenças no proteoma da raiz do tomateiro, infectado com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> por iTRAQ e LC-MS/MS
4 ARTIGO 2	51
	Estudo de proteínas de superfície do tomateiro, inoculado com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> via iTRAQ e LC-MS/MS
5 ARTIGO 3	81
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
7 ANEXO 1	Artigos publicados durante o doutorado 98

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 *Solanum lycopersicum* L.

1.1.1 Aspectos gerais e econômicos da cultura do tomateiro

O tomateiro é originário da América do sul, na região dos Andes, entre o norte do Chile e o Equador. Foi difundido pelos Incas e Maias na América central até chegar ao México, onde foi levado pelos espanhóis a Europa durante a colonização, daí então se espalhou pelo mundo. Chegou ao Brasil no final do século XIX, se tornando uma das culturas mais importantes para a economia nacional (FILGUEIRA, 2003; FANTOVA, 2006).

O tomateiro é uma planta dicotiledônea, pertencente à família Solanaceae. Seu sistema radicular é do tipo pivotante, podendo chegar a até 1,5 m de profundidade. O caule da planta jovem de tomateiro é ereto, herbáceo, succulento e coberto por pelos glandulares, e ao longo do crescimento se torna lenhoso e fino, não suportando assim o peso da planta em posição ereta (ABRAHÃO, 2011). As folhas são alternadas, compostas por número ímpar de folíolos, sendo peciolados e apresentam bordas serrilhadas. As flores são de coloração amarela, hermafroditas e autógamas. Os frutos são bagas carnosas de tamanhos, número de lóculos e formatos variados (SASAKI; SENO, 1994; ABRAHÃO, 2011) A figura 1 ilustra o tomateiro.



Figura 1: Representação esquemática do tomateiro (Fonte: Acervo Embrapa).

O tomate foi primeiramente chamado *Solanum lycopersicum*, mas foi reclassificado como *Lycopersicon esculentum*, utilizando como base para classificação características morfológicas. Entretanto com base em estudos moleculares pode-se observar que o tomateiro apresenta muito mais relação com o gênero *Solanum*, voltando então a ser chamado *Solanum lycopersicum*, classificação esta proposta por Linnaeus no século XVIII (PERALTA; SPOONER, 2000; ALVARENGA, 2004; ANDRADE; SOUZA; ASSIS, 2009).

A produção de tomate é concentrada para o mercado do produto fresco, principalmente após a busca de alimentos mais saudáveis. Além disso há demanda de tomate para a indústria de molhos e extratos, utilizados na culinária de todo o mundo. O tomate é um alimento funcional devido ao alto potencial nutricional, além de ser rico em licopeno, antioxidante que ajuda na prevenção de cânceres relacionados ao aparelho digestivo e próstata (MELO, 2003; CARVALHO; PAGLIUCA, 2007). A tabela 2 resume o conteúdo nutricional do tomate (JARAMILLO et al, 2007)

Tabela 2: Composição nutricional do tomate para cada 100g de fruto fresco.

Elemento	Quantidade
Água	93,5%
Proteína	0,9 g
Gorduras	0,1 g
Calorias	23
Carboidratos	3,3 g
Fibra	0,8 g
Fósforo	19 mg
Calcio	7 mg
Ferro	0,7 mg
Vitamina A	1,1 UI
Vitamina B1	0,05 mg
Vitamina B2	0,02 mg
Vitamina B3	0,6 mg
Vitamina C	20 mg

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação na safra de 20013/2014 a produção mundial de tomate chegou a aproximadamente 164 milhões de toneladas numa área plantada com cerca de 4,7 milhões de hectares, dando a cultura a 11^a posição no ranking mundial dos alimentos mais produzidos e a segunda hortaliça mais cultivada, perdendo apenas para a batata. O Brasil ocupa a posição de

nono lugar na lista dos maiores produtores dessa hortaliça (FAO, 2015), com uma área plantada de 65 mil hectares, produzindo mais de 4,1 milhões toneladas do fruto na safra de 2014 (IBGE ã SIDRA, 2015).

A região nordeste do Brasil representou aproximadamente 16% da produção nacional de tomate em 2013/2014. Pernambuco é o terceiro maior produtor dessa região, ficando atrás apenas da Bahia e do Ceará, está entre os dez maiores Estados produtores nacionais. Sua produção representa cerca de 3% da produção nacional com safra de 123 mil toneladas, numa área de 3.561 hectares no ano de 2014. A maior parte do tomate é plantado nas regiões agreste e sertão, onde gera uma receita de aproximadamente R\$100 milhões (IBGE ã SIDRA, 2015).

Entretanto a produção do tomate é severamente comprometida devido as várias doenças que acometem a cultura, causadas por bactérias, fungos, vírus e nematoides. Esses patógenos causam vários danos, atuando-nos diversos estágios de desenvolvimento e requerem um grande dispêndio de recursos para controle e/ou prevenção (ANDRADE; SOUZA; ASSIS, 2009).

Devido ao grande número de organismos infectantes, o tomateiro também apresenta um grande potencial científico, como planta modelo no estudo da interação planta-patógeno, onde associado ao fato de que o genoma do tomate já está sequenciado, permitirá grandes avanços no manejo dessa planta (ARIE et al., 2007). *Arabidopsis thaliana*, planta modelo mais utilizada, é bastante útil em vários estudos devido ao seu genoma ser relativamente pequeno e se ter facilidade em manipulá-la, entretanto quando se fala em estudos de ação de patógenos outros modelos devem ser sugeridos, pois *A. thaliana* possui poucos organismos infectantes e em alguns países, como o Japão, a legislação é bastante rigorosa, em se tratando de introduzir patógenos estrangeiros. Este problema é diminuído no tomate, pois, por ser cultivado em todo mundo, possui vários patógenos específicos para cada região, permitindo assim que cada país possa estudar a interação do tomateiro com os organismos nativos (ARIE et al., 2007).

1.2 Fusariose

Uma das doenças mais importantes que acometem a cultura do tomateiro, devido a sua agressividade e dificuldade no combate é a murcha de fusário, causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). É uma doença radicular, favorecida por temperatura alta e solos arenosos e/ou ácidos. Esta doença vem se disseminando de maneira muito rápida, por isso está cada vez mais sendo estudada, a fim de se obter

melhores técnicas de combate (CARVALHO; NETO; CARMO, 2005; ANDRADE; SOUZA; ASSIS, 2009).

O Fusário é um habitante do solo e pertence atualmente ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes e ordem Hypocreales. Espécies fitopatogênicas distribuídas dentro do gênero *Fusarium*, dentre as quais *F. oxysporum*, tem sua fase teleomórfica desconhecida, sendo uma espécie grupo, composta de dezenas de espécies (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Ele apresenta micélio septado, colônias pouco coloridas inicialmente, mas com a idade tornam-se amarelas com um tom de aspecto pálido e sob determinadas condições, adquire cor rosa pálida ou coloração purpúrea (VALE et al., 2000). Nesta espécie são produzidos três tipos de esporos assexuais: microconídios, macroconídios e clamidósporos. É comum aparecer macroconídios na superfície das plantas mortas pelo patógeno, formando agrupamentos semelhantes aos esporodóquios (AGRIOS, 2005). Os clamidósporos apresentam paredes espessas, duplas e rugosas, formato globoso e podem ser formados isolados, nas extremidades de conidióforos ou intercalados nas hifas ou nos macroconídios, constituindo as estruturas de resistência (NELSON et al., 1983; LESLIE; SUMMERELL, 2006). Os clamidósporos de *Fol* podem ter uma ou duas células (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Clamidósporos podem permanecer viáveis no solo na ausência do hospedeiro por anos. Por isso é importante ressaltar a adoção de medidas que impeçam a entrada do fungo, em áreas onde ainda não foi constatada a murcha de fusário (COSTA et al., 2007).

A espécie *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* é agrupada em três raças fisiológicas: 1, 2 e 3 conforme as suas habilidades de infectar e causar doença em uma série de cultivares diferenciadoras, possuidoras de genes em diferentes loci de resistência (BOHN; TUCKER, 1940). A murcha de fusário em espécies do gênero *Solanum* está restrita às espécies *Solanum lycopersicon* L. e *Solanum pimpinellifolium* L., entre outras, muito embora possa afetar outras solanáceas ornamentais, malváceas e gramíneas (VALE et al., 2000).

Na infecção, os esporos germinam sobre as raízes da planta e o tubo germinativo resultante deste processo penetra através de pelos absorventes ou por ferimentos. Após a penetração, as hifas crescem em direção aos vasos do xilema e passam a se desenvolver no seu interior, colonizando as células, produzindo esporos e promovendo a distribuição sistêmica do fungo pela planta, através da corrente ascendente de seiva. Com a evolução da colonização, ocorre o bloqueio dos vasos infectados, limitando parcial ou

totalmente a passagem da água e elementos minerais para a parte aérea da planta (BECKMAN, 1987; ANDRADE; SOUZA; ASSIS, 2009). No entanto, o que determina o sucesso ou não da penetração do hospedeiro e o desenvolvimento da doença são os mecanismos de resistência do hospedeiro frente aos mecanismos de ataque do fungo (TOYODA et al., 1988).

A doença pode se manifestar em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, no entanto é mais comum durante a floração e frutificação. Os sintomas na parte aérea se manifestam primeiramente nas folhas mais velhas, progredindo para as folhas mais novas, podendo ocorrer inicialmente de um lado da planta, ou metade da folha. Os folíolos murcham e secam, mas as folhas ficam presas no caule. Os vasos ficam com coloração parda e de aparência seca (Figura 2) (Kurozawa & Pavan, 2005).

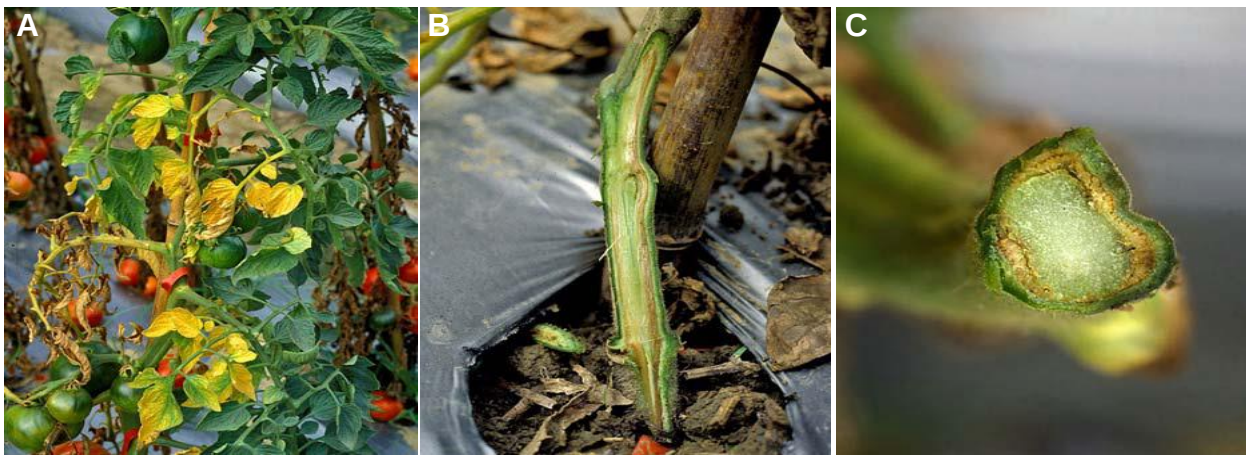


Figura 2: Sintomas da murcha de fusário. **A** ã Murcha na folha. **B** ã Corte longitudinal do caule, evidenciando o escurecimento dos vasos. **C** ã Corte transversal do caule. (Fonte: The World Vegetable Center)

As medidas utilizadas para o controle da murcha de fusário em tomateiro envolvem a manipulação da fertilidade do solo, impedimento da drenagem de água de local infectado para novas áreas de plantio, uso da rotação de culturas com plantas não hospedeiras por vários anos, prevenção da disseminação do patógeno eliminando o movimento de solo com presença do fungo, bem como evitando o trânsito de máquinas, animais e operários das lavouras doentes para áreas livres da doença (BECKMAN, 1987; JONES, 1991; LOPES; SANTOS, 1994). Entretanto, a utilização de cultivares resistentes tem se revelado como a alternativa mais eficiente para o controle da doença, embora apresente algumas dificuldades, pois induzem, o desenvolvimento de raças mais virulentas do fungo, devido a co evolução, que requerem um programa contínuo de criação e a introdução regular de novas cultivares resistentes, além da dificuldade na obtenção de cultivares que apresentem características agronômicas desejáveis e, também, o tempo necessário para sua obtenção (NELSON, 1983).

1.3 Interação Planta-Patógeno

As interações entre plantas e seus patógenos envolvem complexas redes de comunicação entre os organismos. Não apenas a planta tem que reconhecer e se defender contra o patógeno, como o microrganismo precisa modificar a biologia do hospedeiro, a fim de criar um ambiente favorável ao seu desenvolvimento e reprodução. Tanto a planta quando o patógeno envolve um conjunto de genes envolvidos capazes dessas comunicações (BOYD et al, 2012).

1.3.1 Resistência e suscetibilidade

Uma planta é considerada resistente a uma doença quando tem capacidade de evitar ou atrasar a entrada e subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos. As plantas selvagens normalmente estão expostas a inúmeros microrganismos patogênicos, como fungos, bactérias, vírus e nematóides, entretanto, a resistência mostra-se como a regra, enquanto a suscetibilidade aos agentes causadores de doenças mostra-se como a exceção. A resistência é caracterizada pela coordenação e dinamicidade, onde sua eficiência depende da expressão dos mecanismos de defesa em uma sequência lógica, após o contato do patógeno em potencial com o hospedeiro (PASCHOLATI, 1994). Para Fry (1982), a resistência do hospedeiro é a característica de alguns genótipos que conseguem ser afetados com menor severidade pelas doenças do que outros de espécies semelhantes. Quando o genótipo da planta não consegue parar ou retardar o organismo invasor e desenvolve a doença ela é dita suscetível (MIZUBUTI; MAFFIA, 2006).

1.3.2 Interação Molecular

A primeira linha de defesa da planta está no reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns, PAMPs*), moléculas essenciais para o microrganismo, que não podem ser deletadas ou mutadas e são altamente conservadas ao longo das diversas espécies microbianas (FELIX et al 1999). Os PAMPs mais caracterizados são o flg22, subunidade mais conservada da proteína de motilidade bacteriana flagelina e o elf18, um fator de elongação bacteriano, também a proteína bacteriana mais abundante. Para os fungos, o elicitor mais estudado é a quitina, constituinte da parede celular. Dentre outros elicitores fúngicos estudados, estão a xilanase e heptoglicanos (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012).

O reconhecimento dos PAMPs pelos receptores de reconhecimento de padrão (*Pattern Recognition Receptors, PRRs*) inicia a resposta imune desencadeada por PAMPs (*PAMP-Triggered Immunity, PTI*) caracterizada por acionar diversos eventos para contenção da colonização (Figura 3) (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012).

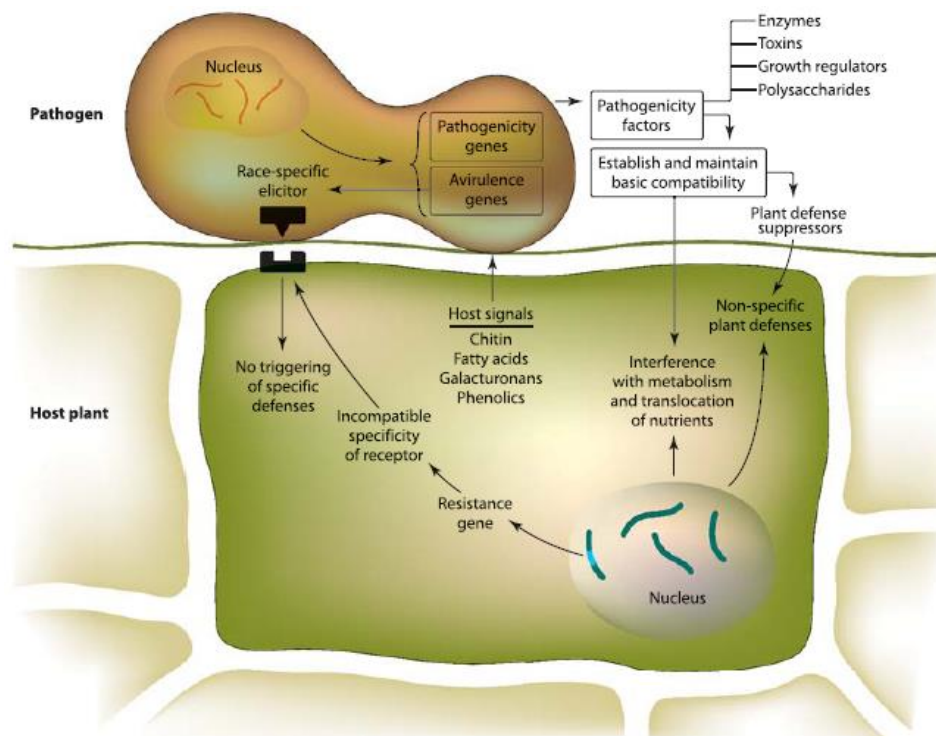


Figura 3: Esquema da interação planta-patógeno. (Fonte: Agrios, 2005).

Dentre os eventos desencadeados pela PTI estão a reação de hipersensibilidade, com morte celular programada e liberação de espécies reativas de oxigênio, alquilação do ambiente extracelular, com liberação de íons, como o Ca^{2+} , ativação de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), proteínas quinases responsáveis por sinalização celular e resposta a estímulos, liberação de fatores de transcrição do tipo WRKY reguladores

chave para a defesa de plantas, fechamento estomático, deposição de calose e lignificação, que aumentam a espessura da parede celular, liberação de hormônios, como ácido jasmônico e ácido salicílico, que por sua vez ativam outros mecanismos de defesa contra estresses abióticos, produzindo proteínas e outras substâncias com ação antimicrobiana, além da diminuição do metabolismo primário, por silenciamento gênico, concentrando as reservas energéticas para a defesa e diminuindo a fonte de recurso para o organismo invasor (NICAISE; ROUX; ZIPFEL, 2009).

Entretanto muitas vezes o organismo invasor possui diversas estratégias para driblar a PTI e prosseguir com a infecção. Estas substâncias, conhecidas como efetores ou proteínas de virulência (*Avr proteins*) estão cada vez mais sendo descritos, a fim de se entender qual o seu papel na supressão da resposta inicial da planta. *Magnaporthe oryzae*, um fungo patógeno do arroz, secreta uma proteína efetora que sequestra oligossacarídeos de quitina do meio extracelular, impedindo assim, seu reconhecimento pela planta. *Ustilago maydis*, causador do carvão em milho, secreta um efector que inibe a ação a enzima peroxidase, suprimindo a reação oxidativa (NICAISE; ROUX; ZIPFEL, 2009).

Para conseguir sobrepor as proteínas *Avr* as plantas fazem uso de um segundo mecanismo de defesa, chamado imunidade desencadeada por efetores (*Effector-Triggered Immunity, ETI*), por meio dos genes de resistência (*-R*). Esse mecanismo é muito mais específico e muito mais potente. Esta interação de genes *R/Avr* tem sido chamada de resistência gene-a-gene (DODDS et al, 2006). Os genes *R* são atualmente os principais alvos de estudo de melhoramento genético, visando obtenção de resistência as doenças causadas por microrganismos.

1.3.3 Genes *I* e resistência a fusariose

As plantas de tomateiro resistentes a raça 1 do Fusário, apresentam resistência a doença controlada por um gene *R* designado gene *I-1*. Este gene já era trabalhado em programas de melhoramento, permitindo o desenvolvimento de genótipos de tomateiro resistentes à doença. Estudos verificaram que a presença do gene de resistência *I-1* nas plantas permitiu o cultivo dos tomateiros durante vários anos nos Estados Unidos, até que a raça 2 tornou-se um sério problema. Com a identificação e a introdução do gene de resistência *I-2*, a doença causada pela raça fisiológica 2 do patógeno deixou de apresentar importância neste país (SOUZA, 2009).

Também foi observada, mediante a utilização de um gene marcador, a expressão do gene de resistência I-2 em tecidos vasculares dos frutos, folhas e raízes de plantas resistentes. Assim como nos tecidos que circundam os vasos do xilema, sugerindo uma correlação entre a atuação deste gene e o bloqueio do crescimento do patógeno no sistema vascular das plantas resistentes a raça 2 (GUTIÉRREZ, 2004). No Brasil, trabalhos realizados por Reis et al. (2005), identificaram fontes de resistência múltipla às três raças fisiológicas de *F. oxysporum* em acessos das espécies *S. habrochaites* L., *S. chilense* L., *S. pennellii* L. e *S. peruvianum* L. Recentemente Catanzariti et al (2015), isolou o gene I-3, que confere resistência a raça 3 do fusário. A cultivar de tomateiro Viradouro possui o gene I-1, que confere a ela resistência apenas a raça 1 do fusário, enquanto que a cultivar BHRS 2,3 apresenta o gene I-7, que confere resistência as três raças do fungo (REIS et al, 2005; GONZALEZ-CENDALES et al, 2015).

A utilização do controle genético de doenças de plantas requer um programa contínuo de criação e introdução de novas cultivares, que depende da presença de fontes de resistência na população hospedeira. Por isso estudos moleculares, sobre os mecanismos de defesa, têm sido cada vez mais realizados, mas ainda estão longe da elucidação desses fenômenos (REIS et al., 2005).

1.4 Proteômica

Proteínas são tores bioquímicos em todos os processos fisiológicos e patológicos (MANN et al, 2013). Devido a isso, o estudo das proteínas em larga escala e suas interações com outras moléculas biológicas têm aumentado de forma exponencial nos últimos anos. A proteômica estuda os proteomas, ou seja, o conjunto de proteínas expressas naquele determinado momento, seja na célula, tecido ou fluidos biológicos, dos organismos. O intuito é identificar e quantificar proteínas envolvidas em uma determinada condição biológica, podendo inclusive, determinar as modificações pós traducionais, além da determinação da sua origem nos compartimentos celulares e local de sua ação (YATES et al, 2009).

A dinâmica de proteínas em um sistema vivo é influenciada por diversos fatores internos e externos que determinam modificações estruturais e a conformação das proteínas. Neste sentido, o estudo e caracterização de mapas proteômicos apresentam-se como uma importante ferramenta complementar aos estudos de genômica (DIAS et al., 2007). A análise proteômica oferece a oportunidade de examinar simultaneamente alterações e classificar padrões temporais de acúmulo de proteínas que ocorrem durante o desenvolvimento da planta, possibilitando a identificação de proteínas marcadoras dos

diferentes estágios fisiológicos (SILVEIRA et al., 2008; LARANCE; LAMOND, 2015). Nos últimos anos vários estudos têm focado a caracterização da dinâmica de proteínas ao longo do desenvolvimento vegetal, associada à caracterização do genoma e transcriptoma (ROBERTS, 2002; HEAZLEWOOD; MILLAR, 2003; CHEN; HARMON, 2006; ROSSIGNOL et al., 2006).

1.4.1 Técnicas em proteômica

1.4.1.1 PROTEÔMICA BASEADA EM GEL

Os primeiros estudos de proteômica foram obtidos utilizando géis para a separação das proteínas. A técnica mais utilizada, eletroforese bidimensional (2-DE), as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoelétricos, em seguida, separadas por massa molecular. Assim, mapas de cada amostra são criados, onde cada spot corresponde a uma proteína ou um pequeno grupo proteico. Utilizando esses mapas, diferentes condições podem ser estudadas comparativamente e proteínas com expressão diferencial (up ou down regulated) podem ser identificadas (ZHU et al, 2003). Para o aumento da sensibilidade e reprodutibilidade da técnica 2-DE, foram desenvolvidos métodos que utilizam fluorescência para marcar as proteínas, assim a eletroforese diferencial (DIGE) surgiu. Essa técnica é robusta, pois permite a análise simultânea de mais de uma condição (multiplex), excluindo a necessidade de réplicas experimentais e os fluoróforos conseguem detectar proteínas em concentração que os métodos de revelação tradicionais, coomassie blue e nitrato de prata não conseguem (VRANAKIS et al, 2013).

Entretanto a proteômica baseada em gel possui muitas limitações, os métodos de coloração tradicionais têm baixa detecção e alguns deles incompatibilidade com a espectrometria de massas, há dificuldade da separação de proteínas de caráter hidrofóbico, limitações do alcance das tiras de pH imobilizado e os métodos que usam fluorescência são bastante caros (VADIVEL, 2015).

1.4.1.2 PROTEÔMICA GEL FREE

Devido as limitações, nos últimos anos a 2-DE tem sido gradativamente substituída pela proteômica livre de gel (VADIVEL, 2015). Uma das principais aplicações da *shotgun proteomics* é a *bottom up* ou *shotgun proteomics*. Nessa abordagem, as proteínas são solubilizadas, digeridas com uma protease sítio específico e os peptídeos separados por HPLC e identificados por espectrometria de massas.

Associadas a proteômica bottom up, várias estratégias foram desenvolvidas para a quantificação relativa ou absoluta dos peptídeos de interesse. A quantificação pode ser feita *label free* onde os peptídeos são quantificados a partir da área dos picos dos peptídeos antes da fragmentação (MS1) ou pela contagem dos picos formados depois da fragmentação (MS2) ou marcando as proteínas com tags (iTRAQ, TMT), onde os peptídeos são quantificados relativamente a partir da liberação da tag em MS2, ou aminoácidos modificados (SILAC), onde a quantificação ocorre pela razão dos picos dos peptídeos leves e pesados (ONG; MANN, 2005; COUTO et al, 2014).

1.4.1.3 iTRAQ

Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) é uma técnica que permite quantificação relativa de até oito condições simultaneamente, a partir da liberação do íon repórter em MS2 (COUTO ET AL, 2014). iTRAQ é conceitualmente elegante, pois os peptídeos são marcados no N-terminal e nos resíduos do aminoácido lisina. Assim, todo peptídeo selecionado para fragmentação gera dados de sequência e abundância para as proteínas de até oito amostras, de acordo com o desenho experimental (EVANS et al, 2012). O marcador do iTRAQ consiste em três partes (Figura 4), o radical *N-hydroxysuccinimide*, que é reativo com as aminas primárias dos peptídeos, um grupo balanceador, que corrige a massa da *tag*, deixando todas com a mesma massa e o grupo repórter, que é fragmentado em MS2 e gera o sinal que é quantificado (ROSS et al, 2004; AGGARWAL; CHOE; LEE, 2006).

Os peptídeos marcados com iTRAQ possuem a mesma variação de massa durante o MS1, devido a natureza isobárica dos marcadores. Esse acréscimo de massa é aproximadamente 145 para o 4-plex e 305 para o 8-plex (PICHLER et al, 2010). Após o MS2, os marcadores são fragmentados e o grupo repórter é liberado. As massas dos grupos reporter variam de 114-117 para o 4-plex e de 113-119 e 121 para o 8-plex (EVANS et al, 2012). A massa 120 é omitida para não haver contaminação com íon da fenilalanina (RAUNIYAR; YATES, 2014). A intensidade dos grupos *reporters* fragmentados, correspondem a contribuição de cada peptídeo marcado, oriundo de cada amostra, assim, a razão relativa das intensidades corresponde a abundância relativa de cada peptídeo de cada amostra (RAUNIYAR; YATES, 2014).

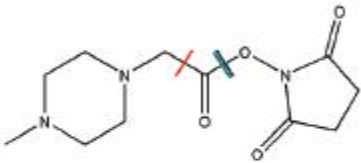
Structural Formula	Atomic/isotopic composition and monoisotopic mass shift of modification
A iTRAQ 4-plex 	114: 144.105918 $C_5^{13}C_2N_2^{18}OH_{12} = 144.105918$ 115: 144.099599 $C_6^{13}CN^{15}N^{18}OH_{12} = 144.099599$ 116 & 117: 144.102063 $C_4^{13}C_3N^{15}NOH_{12} = 144.102063$
B iTRAQ 8-plex 	113, 114, 116, 117 $C_7^{13}C_7N_3^{15}NO_3H_{24} = 304.20536$ 115, 118, 119, 121 $C_8^{13}C_6N_2^{15}N_2O_3H_{24} = 304.19904$

Figura 4: Estrutura do reagente iTRAQ. **A** ñ iTRAQ 4-plex; **B** ñ iTRAQ 8-plex. As linhas indicam os sitios de fragmentação. (Modificado de Aggarwal et al, 2006).

Em plantas, a marcação com iTRAQ tem sido utilizado no estudo da proteômica quantitativa de diversos tipos de estresses (PARK et al, 2004). Em estresse abióticos, como estresse salino em algodão (CHEN et al, 2016), estresse hídrico em tabaco (XIE et al, 2016) e metais em citrus (JIANG et al, 2015). E estresses bióticos, como interação com vírus em tabaco (WANG et al, 2016), bactérias no tomateiro (PARKER et al, 2013), fungos em algodão (FANG et al, 2015) e interações simbióticas, como micorrizas (SONG et al, 2015).

1.5 Referencias

- ABRAHÃO, C. **Relação K:Ca:Mg na solução nutritiva para o cultivo e mini tomate em substrato**. Dissertação (mestrado em agronomia). Universidade Estadual Paulista. p. 86, 2011.
- AGGARWAL, K.; CHOE, L. H.; LEE, K. H. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. **Briefings in functional genomics and proteomics**. v. 5(2). p. 112-120, 2006.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5.ed. San Diego: Academic Press, p.635. 2005.
- ALVARENGA, M.A.R. Origem botânica e descrição da planta. In: ALVARENGA, M. A. R. et al. (Eds.) **Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, p. 15-18, 2004.
- ANDRADE, D.E.G.T.; SOUZA, L.T.; ASSIS, T.C. murcho de fusário: importante doença do tomateiro no estado de Pernambuco. **Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**. v. 5, p. 243-263, 2009.
- ARIE, T. et al. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. **Plant Biotechnology**. v. 24, p.135-147, 2007.
- BECKMAN, C.H. The nature of wilt diseases of plants. St. Paul: **APS Press**, 1987. 175 p.
- BOHN, G.W.; TUCKER, C.M. Studies on Fusarium wilt of the tomato: Immunity in *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. and its inheritance in hybrids. Missouri. **Agricultural Experimental Station Research Bulletin**. v. 311, p.82, 1940.
- BOYD, L. A.; RIDOUT, C.; O'SULLIVAN, D. M.; LEACH, J. E.; LEUNG, H. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**. v.xx, p.1-8, 2012.
- CARVALHO, A.O.; NETO, J.J.; CARMO, M.G.F. Colonização de raízes de tomateiro por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em solução nutritiva com três fontes de nitrogênio. **Fitopatologia Brasileira**. v.30, n.1, p.26-32, 2005.
- CARVALHO, J.R.; PAGLIUCA, L.G. Tomate, um mercado que não para de crescer globalmente. **Revista Hortifruti Brasil** v. 6, n. 58, p. 6-14, 2007.

CATANZARITI, AM.; LIM, G. T. T.; JONES, D. J. The tomato I-3 gene: a novel gene for resistance to Fusarium wilt disease. **New Phytologist**. v.207, p.106-118, 2015.

CHEN, S.; HARMON, A.C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, p. 5504-5516, 2006.

CHEN, T.; ZHANG, L.; SHANG, H.; LIU, S.; PENG, J.; GONG, W.; SHI, Y.; ZHANG, S.; LI, J.; GONG, J.; GE, Q.; LIU, A.; MA, H.; ZHAO, X.; YUAN, Y. iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis of Cotton Roots and Leaves Reveals Pathways Associated with Salt Stress. **PLoS ONE**. doi:10.1371/journal.pone.0148487, 2016.

COSTA, H.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A. Doenças de hortaliças que se constituem em desafio para o controle. In: ZAMBOLIM, L. et al. (Eds.). **Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças**. Viçosa: Editora UFV. p.319-336, 2007.

COUTO, N.; EVANS, C. A.; PANDHAL, J.; QIU, W.; PHAM, T. K.; NOIREL, J.; WRIGHT, P. C. Making Sense Out of the Proteome: the Utility of iTRAQ and TMT. In: EYERS, C. E.; GASKELL, S. (Eds). **Quantitative Proteomics**. 1.ed. Cambridge. The Royal Society of Chemistry, 2014. 390 p.

DIAS L.L.C. et al. Two-dimensional gel electrophoretic protein profile analysis during seed development of *Ocotea catharinensis*: a recalcitrant seed species. **Brazilian Journal Plant Physiology**. v. 22, p. 23-33, 2009.

DODDS, P. N.; LAWRENCE, G. J.; CATANZARITI, AM.; TEH, T.; WANG, C. A.; AYLIFFE, M. A.; KOBE, B.; ELLIS, J. G. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. **PNAS**. v.103, n.23, p.8888-8893, 2006.

EVANS, C.; NOIREL, J.; OW, A. Y.; SALIM, M.; PEREIRA-MEDRANO, A. G.; COUTO, N.; PANDHAL, J.; SMITH, D.; PHAM, T. K.; KARUNAKARAN, E.; ZOU, X.; BIGGS, C. A.; WRIGHT, P. C. An insight into iTRAQ: where do we stand now?. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 404 p. 1011-1027, 2012.

FANG, W.; XIE, D.; ZHU, H.; LI, W.; XU, Z.; YANG, L.; LI, Z.; SUN, L.; WANG, J.; NIE, L.; TANG, Z.; LV, S.; ZHAO, F.; SUN, Y.; ZHAO, Y.; HOU, J.; YANG, X. Comparative

Proteomic Analysis of *Gossypium thurberi* in Response to *Verticillium dahliae* Inoculation. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16 p.25121- 25140, 2015.

FANTOVA, M. C. **Variedades autóctonas de tomates de Aragón**. Aragón: Centro de investigación de Tecnología Agroalimentaria de Aragón, 2006. 238 p.

FAO ñ FAOSTAT - Agricultural Statistics Database. [online]. Home: **World Agricultural Information Centre**, 2015. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

FELIX, G.; DURAN, J. D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. **The Plant Journal**. v.18, n.3, p.265-276, 1999.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. p. 193ñ214.

FRY, W.E. **Principles of plant disease management**. San Diego: Academic Press, 1982, 378p

GONZALEZ-CENDALES, Y.; CATANZARITI1, AM.; BAKER, B.; MCGRATH, D.J.; JONES, D. A. Identification of I-7 expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. **Molecular Plant Pathology**. doi: 10.1111/mpp.12294, 2015.

GUTIERREZ, A. H. **Caracterización de genes de poligalacturonasas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y su análisis in sistema heterólogos**. Madrid. Tese (Doutorado em Biologia). Universidad Complutense de Madrid. 190 p. 2004.

HEAZLEWOOD, J.L.; MILLAR, A.H. Integrated plant proteomics ñ putting green genomes to work. **Functional Plant Biology**. v 30, p. 471-482, 2003.

IBGE ñ SIDRA Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema de recuperação automática. Rio de Janeiro: **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2015. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 21 dez. 2015.

JARAMILLO, J., V.P. RODRÍGUEZ, M. GUZMÁN, M. ZAPATA Y T. RENGIFO. **Buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas**. Corpoica, FAO, Bogotá, 2007, 328p.

JIANG, HX.; YANG, LT.; QI, YP.; LU, YB.; HUANG, ZR.; CHEN, LS. Root iTRAQ protein profile analysis of two Citrus species differing in aluminum tolerance in response to long-term aluminum-toxicity. **BMC Genomics**. doi:10.1186/s12864-015-2133-9, 2015.

JONES, J.P. Fusarium wilt. In: JONES, J.B.; JONES, J.P.; STALL, R.E. ZITTER, T.A. (Eds.) **Compendium of tomato disease**. St. Paul: Minnsota, APS Press, p.15, 1991.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.P. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**. v. 2, p. 607ñ 626, 2005.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The Fusarium laboratory manual**. Ames: Blackwell, 388 p. 2006.

LOPES, C.A.; SANTOS, J.R.M. **Doenças do tomateiro**. Brasília: EMBRAPAñCNPH/SPI. 67p, 1994.

MANN, M.; NILS A.; KULAK, N. A.; NAGARAJ, N.; COX, J. The Coming Age of Complete, Accurate, and Ubiquitous Proteomes. **Molecular Cell**. V.49, p.583-590, 2013.

MELO, P.C.T. Desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do tomate para consumo in natura no Brasil e os desafios do melhoramento genético. In: **Congresso Brasileiro de Olericultura**. Recife. v.43, p.10, 2003.

MIZUBUTI, E.S.G.; MAFFIA, L.A. Controle Químico: os fungicidas e o meio ambiente. In: MIZUBUTI, E.S.G.; MAFFIA, L.A.(Ed.). **Introdução a Fitopatologia**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006, p. 146-147.

MONAGHAN, J.; ZIPFEL, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. **Current Opinion in Plant Biology**. v.15, p.349-357, 2012.

NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F.O. **Fusarium species: An illustrated manual for identification**. New York: The Pensylvania State University Press. 1983, 193p

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.109, p.1638-1647, 2009.

ONG, S.E.; MANN, M. Mass Spectrometry-based Proteomics Turns Quantitative. **Nature**. v.1, n.5, p. 252-262, 2005.

PARK, O.K. Proteomic studies in plants. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v. 37, p. 133-138, 2004.

PARKER, J.; KOH, J.; YOO, MJ.; ZHU, N.; FEOLE, M.; YI, S.; CHEN, S. Quantitative proteomics of tomato defense against *Pseudomonas syringae* infection. **Proteomics**. doi:10.1002/pmic.201200402, 2013.

PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. In.: FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Ed.). Revisão anual de patologia de plantas. Passo Fundo: **Revisão anual de patologia de plantas**, 1994, v. 2, cap. 1, p. 1-51.

PERALTA, I.E.; SPOONER, D.M. Classification of wild tomatoes: a review. **Kurtziana**. v. 28, n.1, p. 45-54, 2000.

PICHLER, P.; KÖCHER, T.; HOLZMANN, J.; MAZANEK, M.; TAUS, T.; AMMERER, G.; MECHTLE, K. Peptide Labeling with Isobaric Tags Yields Higher Identification Rates Using iTRAQ 4-Plex Compared to TMT 6-Plex and iTRAQ 8-Plex on LTQ Orbitrap. **Analytical Chemistry**. v.82(15) p.6546-6558, 2010.

RAUNİYAR, N.; YATES III, J. R. Isobaric Labeling-Based Relative Quantification in Shotgun Proteomics. **Journal of Proteome Research**. v. 13 p. 5293-2309, 2014.

REIS, A.; COSTA, H; BOITEUX, L.S.; LOPES, C.A. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30, p. 426-428, 2005.

ROBERTS, J.K.M. Proteomics and a future generation of plant molecular biologists. **Plant Molecular Biology**. v. 48, p. 143-154, 2002.

ROSS, P. L.; HUANG, Y. N.; MARCHESE, J. N.; WILLIAMSON, B.; PARKER, K.; HATTAN, S.; KHAINOVSKI, N.; PILLAI, S.; DEY, S.; DANIELS, S.; PURKAYASTHA, S.; JUHASZ, P.; MARTIN, S.; BARTLET-JONES, M.; HE, F.; JACOBSON, A.; PAPPIN, D. J. Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* Using Amine-reactive Isobaric Tagging Reagents. **Molecular & Cellular Proteomics**. v. 3(12) p. 1154-1169, 2004.

ROSSIGNOL, M. et al. Plant proteome analysis: a 2004 ã 2006 update. **Proteomics**. v. 6, p. 5529-5548, 2006.

SASAKI, J.L.S.; SENNO, S. Importância na adubação de algumas olerícolas (alho, cebola, couve-flor, pimentão e tomate). In: SÁ, M.E.; BUZZETI, C. (Coords.). **Importância da adubação na qualidade dos produtos agrícolas**. São Paulo: Ícone. p. 331-343, 1994.

SILVEIRA, V. et al. Endogenous abscisic acid levels and comparative proteome during seed development of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Biologia Plantarum**. v. 52, p. 101-104, 2008.

SONG, F.; QI, D.; LIU, X.; KONG, X.; GAO, Y.; ZHOU, Z.; WU, Q. Proteomic analysis of symbiotic proteins of *Glomus mosseae* and *Amorpha fruticosa*. **Scientific Reports**. doi: 10.1038/srep18031, 2015.

SOUZA, L. T. **Reação de genótipos de tomateiro às raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco. p 48, 2009.

TOYODA, H. et al.. Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid-resistant mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its application to biological control of *Fusarium* wilt of tomato. **Phytopathology**, v.78, n.11, p.1307-1311, 1988.

VADIVEL, A. K. A. Gel-based proteomics in plants: time to move on from the tradition. **Frontiers in Plant Science**. v.6, n.369, p.1-4, 2015.

VALE, F.X.R. et al. Doenças causadas por fungos em tomate. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R. **Controle de Doenças de Plantas - Hortaliças**. Viçosa: Gráfica Suprema, 2000. v.2, p.699-756.

VRANAKISA, I.; GONIOTAKISB, I.; PSAROULAKIA, I. A.; SANDALAKISA, V.; TSELENTISA, Y.; GEVAERTC, K.; TSIOTISE, G. Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. **Journal of Proteomics**. v.97, p.88-99, 2013.

WANG, J.; WANG, XR.; ZHOUB, Q.; YANG, JM.; GUO, HX.; YANG, LJ.; LIU, WK. iTRAQ protein profile analysis provides integrated insight into mechanisms of tolerance to TMV in tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Journal of Proteomics**. v. 132 p.21ñ30, 2016.

XIE, H.; YANG, DH.; YAO, H.; BAI, G.; ZHANG, YH.; XIAO, BG. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals proteomic changes in leaves of cultivated tobacco (*Nicotiana tabacum*) in response to drought stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 469 p.768-775, 2016.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**. v.11, p.49-79, 2009.

ZHU, H.; BILGIN, M.; SNYDER, M. Proteomics. **Annual Review of Biochemistry**. v.72, p.783-812, 2003.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar e caracterizar proteínas diferencialmente expressas de membrana e parede celular do tomateiro (envolvidas com o reconhecimento) após a inoculação do fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycoperscici*, além de estudar outros componentes envolvidos com a infecção provenientes do fungo.

Objetivos Específicos:

- Identificar proteínas diferencialmente expressas de tomateiro relacionadas à resistência ao *F. oxysporum* f. sp. *lycoperscici*;
- Analisar o perfil protéico das proteínas diferencialmente expressas de membrana e parede celular de cultivar resistente e sensível de tomateiro ao *F. oxysporum* f. sp. *lycoperscici*;
- Analisar o perfil protéico do fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycoperscici* relacionado ao processo de infecção no hospedeiro;
- Identificar proteínas que estejam relacionadas com a patogenicidade no tomateiro.

3 ARTIGO 1

Manuscrito aceito no periódico Genetic and Molecular Reseach

Analysis of protein profile of tomato root infected with *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*

Running title: Protein profile of tomato root infected with *F. oxysporum*

T.D. Silva¹, C.M.A. Almeida¹, C.B. Malafaia¹, L.M.S. Oliveira¹, M.V. Silva², M.T.S. Correia²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas ã Centro de Ciências Biológicas ã Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Rua Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária. CEP: 50670-901, Recife ã PE, Brasil

²Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária. CEP: 50670-420, Recife - PE Brasil

Corresponding author: M.T.S. Correia

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária. CEP: 50670-420, Recife - PE Brasil

Tel.: +55 81 2126 8547

Fax: +55 81 2126 8576

E-mail: mtscorreia@gmail.com

ABSTRACT. Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* (Fol) is one of the main diseases affecting tomatoes. The BHRS genotype of tomato is, however, resistant to this disease. A proteomic approach was used to understand the defense mechanisms of this genotype using the tomato root, the first tissue that interacts with the fungus, as a target. Protein was extracted and separated by two dimensional electrophoresis followed by staining with Coomassie brilliant blue. The proteins were identified by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. A total of 22 proteins were identified, 21 of which showed differential expression with 12 proteins being upregulated and nine being downregulated. Plants responded to the pathogen with increased expression of pathogenesis-related proteins. We noted the induction of proteins involved in hypersensitivity reaction and other defense mechanisms. The expression of proteins of primary metabolism related to energy production, however, decreased, as did the expression of two proteins related to defense against abiotic stress. These results demonstrate the presence of important mechanisms for defense against Fol in the tomato genotype BHRS.

Key words: *Solanum lycopersicum*; Biotic stress; Fusarium wilt; Proteomics

INTRODUCTION

The fusarium wilt, caused by the soil fungus *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* (Fol), is one of the most aggressive diseases affecting the tomato crop. The disease causes great damage, especially in sensitive cultivars and in environments where the air and soil temperature are high, as in tropical countries during the warm seasons (Agrios, 2005). The classical strategies, such as the use of fungicides and crop rotation have not been efficient due to the resistant spores that remain viable for several years, and because of the impact of pesticide residues on human health. Selective breeding has contributed to the emergence of more aggressive new breeds of pathogen. Therefore, it is necessary to develop new and efficient control strategies that do not compromise the environmental safety (Mandal et al., 2009). Resistant cultivars developed by gene transfer appear to be one of the most promising options to combat the disease (Dean et al., 2012). However, resistance to diseases involves a complex mechanism involving recognition of virulence determinants by plant receptors followed by specific signal transduction pathways leading to the production and release of reactive oxygen species, phytoalexins, pathogenesis-related (PR) proteins, in addition to programmed cell death (Torres et al., 2006). Studies on inductors show that resistance to Fol may be related to salicylic acid (Mandal et al., 2009). However, little is known about the molecular relationships among the metabolic

pathways, such as recognition, signaling, and plant response, in addition to components not directly related to infection.

Root is the first site to detect and fight soil fungus infections such as Fol. Consequently, understanding the molecular mechanisms happening in this tissue is necessary to improve resistance to the pathogen. Differential proteomics, essentially finds out proteins with different expression levels among different samples caused by a specific factor, is an important part of global proteomic studies. An overview of protein expression can be obtained at high resolution by separating proteins by dimensional (2-DE) electrophoresis combined with peptide identification via tandem mass spectrometry (MS/MS; Manaa et al., 2011; Que et al., 2011). This proteomic approach has become a powerful tool for studying plant development in general and its use has significantly increased in the studies of various stresses, both biotic and abiotic in origin (Faurobert et al., 2007).

The present study analyzed the protein profile of the BHRS tomato cultivar, known for its resistance to Fol, with an aim of identifying those with differential expression, using the 2-DE proteomic technologies associated with Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, tandem Time of Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF-TOF/MS), which are associated with the defense against the fungus.

MATERIAL AND METHODS

Tomato line and *Fusarium oxysporum* isolate

The wild-type BHRS tomato genotype, resistant to fusarium wilt but having no economic value, was used in the present study. The material was procured from the Vegetable Improvement Program of the Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), Recife, Pernambuco, Brazil. The race 2 isolate of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* was obtained from the Mycology Collection of the Department of Phytopathology from the Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil.

Experimental design and protein extraction

Seeds were sown in 128-celled Styrofoam trays filled with sterile substrate Plantmax®. Plants, with first-two pairs of true leaves fully open (about 21 days after planting) were removed from the cells with a gentle jet of water to preserve their root integrity. The apical sector (about 2 cm) of the root was removed and then dipped for 20 min in a spore suspension containing approximately 2×10^6 conidia/ml, cultured in potato dextrose broth for seven days at 28°C, under continuous light. A group of plants was mock-inoculated

with water and used as control. After inoculation, the plantlets were transplanted to 1.5 kg plastic pots containing sterile soil and maintained in a greenhouse. The experimental plots contained three pots, with four plants each, in a randomized block design. Plants were collected 1, 2, 4, and 6 days after the inoculation and were stored at -80°C .

Roots (1000 mg) were ground in ice-cold extraction buffer containing 8 M urea, 4% CHAPS, 10 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), and 7 mM dithiothreitol (DTT). The mixture was centrifuged at 12,000 g for 20 min, and the supernatant collected. Proteins were precipitated with five-volumes ice-cold trichloroacetic acid/acetone (10% trichloroacetic acid in 100% acetone) at -20°C for 6 h and then collected by centrifugation at 20,000 g for 20 min. The precipitated protein was centrifuged at 20,000 g for 20 min, washed three times in 10 mL ice-cold acetone, with vigorous disruption of the pellet with a glass rod between each wash, and air-dried. The proteins obtained were dissolved in a lysis buffer (8 M urea, 4% CHAPS, 7 mM DTT, and 2% pharmalyte 4–7) at room temperature and stored in aliquots at -80°C , until they were used.

Two-dimensional electrophoresis (2-DE) and image analysis

Protein samples (600 μg) mixed with 250 μL rehydration buffer (containing 8 M urea, 2% w/v CHAPS, 20 mM DTT, and 0.5% IPG buffer; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), and 0.002% bromophenol blue were loaded onto IPG strips (13 cm), with a linear pH range 4–7 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), after a brief sonication and centrifugation. Isoelectric focusing was performed in an Ettan IPGphor 3 isoelectric focusing system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) following the manufacturer protocol. Before electrophoresing in the second dimension, the IPG strips were equilibrated for 15 min, first in a buffer containing 6 M urea, 30% (w/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, and 100 mM Tris-HCl, pH 8.8, supplemented with 100 mM DTT and subsequently for 15 min in the same buffer with 0.25 M iodoacetamide added. The equilibrated IPG strips were transferred onto 12.5% SDS polyacrylamide gels and electrophoresed on an Ettan SE 600 Ruby electrophoresis unit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The separated proteins were visualized by staining the gels with Coomassie brilliant blue (CBB)-R250 (Candiano et al, 2004). Images of the CBB-stained gels were acquired at 300 dpi resolution and 16-bit pixel depth, and subsequently analyzed with ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) software according to the protocols provided by the manufacturer. The intensity of each spot was normalized by total valid spot intensity. Protein spots were considered differentially expressed if the intensity changed more than two times in the different stages.

MALDI-TOF/TOF MS

In-gel digestion of proteins was performed as described by Shevchenko et al. (2006), with minor modifications. Trypsin was used at a concentration 25 ng/> L and the in-gel reduction and alkylation steps were omitted. The peptides, thus generated, were dissolved in 10 µL 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA). A saturated solution of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA; 4 mg/mL) in 50% acetonitrile (ACN) and 0.3% TFA was mixed with equal amounts of sample, spotted on an Anchor Chip 800/384 target plate (Bruker Daltonics, Germany), and dried in laminar airflow for recrystallization. For MS calibration, 0.5 µL peptide calibration standard (Bruker Daltonics, Germany) was spotted on the target with 0.8 µL CHCA matrix and recrystallized, as described above. The samples were analyzed on a MALDI TOF/TOF mass spectrometer Ultraflex III (Bruker Daltonics, Germany) used in the reflectron mode. The peptides with a signal-to-noise ratio above 100 were further analyzed by MS/MS using the LIFT technology embedded in the Ultraflex MS; on an average, ten MS/MS spectra were measured for each protein digest leading to the identification of 2-10 peptides. Data processing was realized using the Flex analysis and BioTools software packages (Bruker Daltonics, , Germany).

Data analysis was performed using BioTools 3.0 software, using MASCOT (Matrix Science, London, UK) as a search engine. The parameters were set as follows: database was NCBI (nr); retrieval genera were set as all; data acquisition method was set as combined; maximum missing cut site allowed was set as 1; enzyme was set as trypsin. The quality error scope was set as follows: PMF 0.3D; MS/MS 0.4D.

RESULTS AND DISCUSSION

The time-points for sample collection were chosen based on previous experiments Malafaia et al, 2013. About 1400-1800 µg protein was extracted from 1 g root tissue of the treated plants. The resolution of approximately 600 µg of protein loaded on each gel showed an average of 450-550 spots with pI ranging between 4 and 7 and the molecular mass ranging between 90 and 10 kDa (Figure 1). The 2-DE comparative analysis carried out among the treatments achieved 65% (22 of 34 spots) successful identifications of the proteins. The changes in protein expression, in the plants before and after the pathogen inoculation, were evaluated by comparing the protein profiles. The assessment performed in triplicate revealed 21 differentially expressed spots (Figure 2). Of the identified proteins, the expression of 11 was increased whereas that of 10 proteins was decreased. However, calreticulin, which was present at a high concentration, did not show a differential expression (Table 1). Among the upregulated proteins, two were of unknown function,

while among those with known functions, one was involved in primary metabolism, seven in defense against stresses, and one in signaling. Among the identified proteins showing a decreased expression, five were related to primary metabolism, one to abiotic stress, one to recovery from oxidative stress, and two were of unknown function. The proteins with no differential expression were associated with both primary metabolism and defense.

Several strategies are employed by plants to perceive and resist stresses induced by pathogens (Kundu et al., 2011). The genotype of BHRS tomato has no relevant agronomic characteristics; however, it is resistant to diseases such as fusarium wilt, unlike other genotypes of economic importance. Therefore, studies on defense mechanisms that confer characteristic resistance to this genotype are important for breeding resistant cultivars. Root is the first tissue to interact with the fusarium pathogen; therefore, it was used in this study to identify proteins involved in the defense against this phytopathogen. The proteome of tomato roots has been discussed in previous reports (Li et al., 2008), but such studies have not analyzed the influence of fungal infection.

There was an increase in the plant defense-related proteins after infection with the pathogen. In addition, there was an increased expression of chitinase (PR-3), PR-5 protein, LeMir (*Lycopersicon esculentum miraculin*), nucleoside diphosphate kinase (NDPK), RNA binding glycine rich protein (GRP), superoxide dismutase (Cu-Zn SOD), and actin. Usually, there is an increase in the expression of PR proteins, along with fortification of other responses, when plants are challenged by pathogens. The PR proteins (spots 12 and 13) were present in the unchallenged plants at low concentration, but their expression was observed to increase under pathogen attack or abiotic stress (Dahal et al., 2009). Plant chitinases, which are mostly endochitinases, are reported to participate in the protection, due to their fungal cell wall degrading potential that limits the invasion and growth of pathogen into the host (Ahmed et al., 2012). The PR-5 proteins, also known as thaumatin-like protein due to their similarity with this protein, have been observed to participate in the defense against many pathogens and other abiotic stressors (Ren et al., 2011). Although the mechanisms of action for this protein group have not yet been elucidated, their performance in fighting fungal infections, for example, by inhibition of spore germination and mycelial growth, has been described (Tachi et al., 2009). The induction of PR proteins is considered an activation marker of the basal defense in plants (Dahal et al., 2009).

Hypersensitive reaction (HR) is one of the most efficient forms of plant defense against pathogens (Karrer et al., 1998). LeMir (spots 16 and 17) was secreted and

concentrated in roots in response to infestation by nematodes, suggesting its involvement in plant's defense against these organisms (Brenner et al., 1998). Moreover, overexpression of this protein was observed in lesions caused by hypersensitive response in tomato plants, demonstrating that LeMir plays an important role in regulating a variety of RH types (Xu et al., 2012). Another HR mechanism is the release of reactive oxygen species (ROS; Souza et al., 2011). Some ROS, such as H_2O_2 , were confirmed as large signaling molecules, promoting greater tolerance of plants to pathogens (Kim et al., 2007). The enzyme superoxide dismutase (SOD; spot 19) is one of the proteins responsible for the antioxidative response, transforming superoxide into hydrogen peroxide (Madanala et al., 2011). The use of SOD to control the ROS concentration in cells is a strategy to activate the signaling of defense pathways such as those involving mitogen-activated protein kinases (MAPKs), which seems to be central in the cellular response to multiple stressors (Apel and Hirt, 2004).

Actin (spot 22) is an essential component in all living beings, responsible for the cytoskeleton formation in several cells of organisms (Franklin-Yong and Gourelay, 2008). In plants, the actin cytoskeleton is also used as a sensor for stress monitoring and is a part of the mechanisms that trigger the HR and programmed cell death (PCD). The actin filaments are reorganized, and accumulate and line up near the infection site, thus allowing isolation of the area where there is PCD (Franklin-Yong and Gourelay, 2008). Although, there is evidence for the actin-ROS interaction during the HR, the fact has not yet been proven (Franklin-Tong and Gourelay, 2008). Thus, increased expression of two LeMir isoforms against the Fol infection as well as that of an enzyme related to ROS and actin, processes related to HR and MCP, is indicative of the resistance of the BHRS genotype to this disease.

NDPK (spot 21) is a protein responsible for cellular organization, regulating the nucleotide groups in the cells (Kihara et al., 2011). It has been reported to be involved in signal transduction in plants. In potatoes, NDPK was associated with increased tolerance to multiple stresses (Tang et al., 2008). In rice, there was an increased NDPK1 expression in response to infection by the pathogen, *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, in addition to elicitors, such as salicylic acid and jasmonic acid, showing a defensive role of NDPK against microorganisms (Cho et al., 2004).

GRP (spots 14 and 15) are involved in various pathways and have a structural function, providing elasticity to the cell wall. They are also involved in post-transcriptional regulation of genes in response to stress (Wang et al., 2012). Increased GRP expression

has been reported in response to salt stress, cold, heat, injury, and viral and fungal infections (Kwak et al., 2005). However, their mechanisms of action have not been fully elucidated (Wang et al., 2012). The presence of two isoforms of this protein, with increased expression in response to Fol, corroborates the results of these studies, suggesting that GRP has a role in plant defense.

A decrease in the expression of some proteins associated with primary metabolism (spots 1, 5, 8, and 9) was observed in response to the fungus. ATP synthase is a key protein responsible for energy production (Rexroth et al., 2012). The ROS production, resulting from the infection, directly affects the efficiency of this enzyme due to oxidation of its tryptophan residues, resulting in degradation of the enzyme oxidized by specific proteases (Rexroth et al., 2012). The decreased expression of proteins such as malate dehydrogenase and triose phosphate isomerase, linked to energy cycles (Sukalovic et al., 2011), is related to resource reduction for the fungus and limits its development. Calreticulin is a protein that participates in both the regulation of plant development and protection against abiotic and biotic stresses (An et al., 2011). With respect to biotic stresses, calreticulins were found to play a role in defense against viruses (Shen et al., 2010). Thus, the presence of this protein in the BHRS genotype, even without increased expression, shows its role in different routes, by which it can interact.

However, some proteins related to stress defense showed decreased expression (spots 2, 3, and 4). Glutathione *S*-transferase (GST) is responsible for maintaining the redox state of plants; it combines electrophilic xenobiotics with glutathione, thus reducing their toxicity (Sytykiewicz, 2011). Another defense-related protein that also showed decreased expression upon Fol infection was the class I heat shock resistance (HSP) protein. This group acts as chaperone, linking other proteins, stabilizing unstable structures, and facilitating the modeling of inactive proteins. They are expressed rapidly and abundantly under various stress conditions (Bondino et al., 2012). Decreased expression of HSP and GST proteins during infection is an unusual event. However, the decrease of GST may be related to the fact that during the hypersensitivity reaction there was a need for some ROS being present in the tissue, but this fact needs to be proven.

The present study revealed proteome modifications in the BHRS genotype upon the Fol challenge that could contribute to the understanding of this plant-pathogen interaction. The differential expression of the proteins related to defense or stress and primary metabolism in response to the pathogen supports their fundamental role in the plant

defense mechanisms. However, further studies are warranted to find other mechanisms and to identify the initiation of processes such as perception of the infection and signaling.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE), Banco do Nordeste (BNB) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Agrios GN** (2005). Plant pathology. 5th edn. Academic Press, St. Louis.
- Ahmed NU, Park JI, Seo MS, Kumar TS, et al.** (2012). Identification and expression analysis of chitinase genes related to biotic stress resistance in *Brassica*. *Mol. Biol. Rep.* 39: 3649-3657.
- An Y, Lin RM, Wang FT, Feng J, et al.** (2011). Molecular cloning of a new wheat calreticulin gene TaCRT1 and expression analysis in plant defense responses and abiotic stress resistance. *Genet. Mol. Res.* 10: 3576-3585.
- Apel K and Hirt H** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Bondino HG, Valle EM and Have A** (2012). Evolution and functional diversification of the small heat shock protein/ α -crystallin family in higher plants. *Planta* 6: 1299-1313.
- Brenner ED, Lambert KN, Kaloshian I and Williamson VM** (1998). Characterization of LeMir, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. *Plant Physiol.* 118: 237-247.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, et al.** (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25: 1327-1333.
- Cho SM, Shin SH, Kim KS, Kim YC, et al.** (2004). Enhanced expression of a gene encoding a nucleoside diphosphate kinase 1 (OsNDPK1) in rice plants upon infection with bacterial pathogens. *Mol. Cells* 18: 390-395.
- Dahal D, Heintz D, Dorselaer AV, Braun HP, et al.** (2009). Pathogenesis and stress related, as well as metabolic proteins are regulated in tomato stems infected with *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 838-846.
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, et al.** (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13: 414-430.
- Faurobert M, Mihr C, Bertin N, Pawlowski T, et al.** (2007). Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiol.* 143: 1327-1346.

- Franklin-Tong VE and Gourlay CW** (2008). A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochem. J.* 413: 389-404.
- Karrer EE, Beachy RN, Holt CA.** (1998). Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. *Plant Mol. Biol.*;36:681ñ690.
- Kihara A, Saburi W, Wakuta S, Kim MH, et al.** (2011). Physiological and biochemical characterization of three nucleoside diphosphate kinase isozymes from rice (*Oryza sativa* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 1740-1745.
- Kim MS, Kim HS, Kim HN, Kim YS, et al.** (2007). Growth and tuberization of transgenic potato plants expressing sense and antisense sequences of Cu/Zn superoxide dismutase from lily chloroplasts. *J. Plant Biol.* 50: 490-495.
- Kundu S, Chakraborty D and Pal A** (2011). Proteomic analysis of salicylic acid induced resistance to mungbean yellow mosaic India virus in *Vigna mungo*. *J. Proteomics* 74: 337-349.
- Kwak KJ, Kim YO and Kang H** (2005). Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. *J. Exp. Bot.* 56: 3007-3016.
- Li J, Wu XD, Hao ST, Wang XJ, et al.** (2008). Proteomic response to iron deficiency in tomato root. *Proteomics* 8: 2299-2311.
- Madanala R, Gupta V, Deeba F, Upadhyay SK, et al.** (2011). A highly stable Cu/Zn superoxide dismutase from *Withania somnifera* plant: gene cloning, expression and characterization of the recombinant protein. *Biotechnol. Lett.* 33: 2057-2063.
- Malafaia, CB, Silva, TD, Amaral, DOJ, Almeida, CMA, et al.** (2013). Evaluation of the resistance and differential induction of chitinases in tomato in response to inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant Physiol. Pathol.* 1:3.
- Manaa A, Ahmed HB, Valot B, Bouchet JP, et al.** (2011). Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. *J. Exp. Bot.* 62: 2797-2813.
- Mandal S, Mallick N and Mitra A** (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 642-649.
- Que Y, Xu L, Lin J, Ruan M, et al.** (2011). Differential protein expression in sugarcane during sugarcane-*Sporisorium scitamineum* interaction revealed by 2-DE and MALDI-TOF-TOF/MS. *Comp. Funct. Genomics* doi: 10.1155/2011/989016.

- Ren X, Kong Q, Wang P, Jiang F, et al.** (2011). Molecular cloning of a PR-5 like protein gene from cherry tomato and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. *Mol. Biol. Rep.* 38: 801-807.
- Rexroth S, Poetsch A, Rögner M, Hamann A, et al.** (2012). Reactive oxygen species target specific tryptophan site in the mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 381-387.
- Shen W, Yan P, Gao L, Pan X, et al.** (2010). Helper component-proteinase (HC-Pro) protein of Papaya ringspot virus interacts with papaya calreticulin. *Mol. Plant Pathol.* 11: 335-346.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, et al.** (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1: 2856-2860.
- Souza WR, Vessecchi R, Dorta DJ, Uyemura SA, et al.** (2011). Characterization of *Rubus fruticosus* mitochondria and salicylic acid inhibition of reactive oxygen species generation at complex III/Q cycle: potential implications for hypersensitive response in plants. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43: 237-246.
- Sukalovic VHT, Vuletić M, Marković K and Vučinić Z** (2011). Cell wall-associated malate dehydrogenase activity from maize roots. *Plant Sci.* 181: 465-470.
- Sytykiewicz H** (2011). Expression patterns of glutathione transferase gene (GstI) in maize seedlings under juglone-induced oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 7982-7995.
- Tachi H, Fukuda-Yamada K, Kojima T, Shiraiwa M, et al.** (2009). Molecular characterization of a novel soybean gene encoding a neutral PR-5 protein induced by high-salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 73-79.
- Tang L, Kim M., Yang KS, Kwon SY, et al.** (2008). Enhanced tolerance of transgenic potato plants overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses. *Transgenic Res.* 17: 705-715.
- Torres MA, Jones JD and Dangl JL** (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141: 373-378.
- Wang C, Zhang DW, Wang YC, Zheng L, et al.** (2012). A glycine-rich RNA-binding protein can mediate physiological responses in transgenic plants under salt stress. *Mol. Biol. Rep.* 39: 1047-1053.

Xu QF, Cheng WS, Li SS, Li W, et al. (2012). Identification of genes required for Cf-dependent hypersensitive cell death by combined proteomic and RNA interfering analyses. *J. Exp. Bot.* 63: 2421-2435.

Table 1. List of root proteins that were differentially regulated in the BHRS tomato genotype after challenge with *Fusarium oxysporum*.

Spot ^a	Identity ^b	Organism ^c	Accession ^d	Score ^e	pI ^f	Mr ^f	Regulation ^g
1	ATP synthase D chain, mitochondrial, putative	<i>Solanum demissum</i>	gi 48209968	48	6.63	19.37	down
2	glutathione S-transferase, class-phi	<i>Solanum commersonii</i>	gi 2290782	58	5.81	23.8	down
3	glutathione S-transferase, class-phi	<i>Solanum commersonii</i>	gi 2290782	58	5.81	23.8	down
4	17.8 kDa class I heat shock protein triose phosphate isomerase cytosolic isoform	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 232273	154	5.84	17.75	down
5		<i>Solanum chacoense</i>	gi 38112662	93	5.73	27.25	down
6	putative protein uncharacterized	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 3269288	97	6.3	22.35	down
7	protein At5g39570	<i>Vitis vinifera</i>	gi 225452887	67	4.71	43.01	down
8	ATP synthase subunit beta, mitochondrial; Flags: Precursor	<i>Nicotiana glauca</i>	gi 114421	62	5.95	59.93	down
9	mitochondrial malate dehydrogenase	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 350536645	83	8.87	36.35	down
10		<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 1009712	71	4.37	46.7	ò
11	calreticulin predicted protein	<i>Micromonas sp. RCC299</i>	gi 255084065	74	9.26	33.04	up
12	endochitinase pathogenesis-related protein	<i>Solanum chilense</i>	gi 767827	95	6.21	27.53	up
13	(PR-5 protein) RNA-binding	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 7414370	43	5.76	27.52	up
14	glycine-rich protein-1a	<i>Nicotiana sylvestris</i>	gi 469070	58	5.58	15.6	up
15	glycine-rich protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 19322	146	9.98	7.3	up
16		<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 2654440	77	4.83	23.27	up
17	Lemir	<i>Solanum</i>	gi 2654440	77	4.84	23.28	up

		<i>lycopersicum</i>					
18	40S ribosomal protein S12 Superoxide dismutase [Cu-Zn]	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 12229949	105	5.35	15.62	Up
19	unknown nucleoside diphosphate kinase	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 350537277	89	5.83	15.4	Up
20		<i>Glycine max</i>	gi 255638991	62	7.51	36.38	Up
21		<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 350535074	135	7.04	15.07	Up
22	Actin	<i>Solanum tuberosum</i>	gi 3219759	40.7	5.38	41.9	Up

^aNumber allocated according to the numbers used in Figure

^bIdentification of protein annotated by mass spectrometry

^cPlant species from which protein was annotated

^dAccession number to the database (nrNCBI)

^eMASCOT score

^fTheoretical molecular weight and isoelectric point computed from the calculation tool Mr/pI from ExPASy

^gNote of the regulation type suffered by the protein

Figures

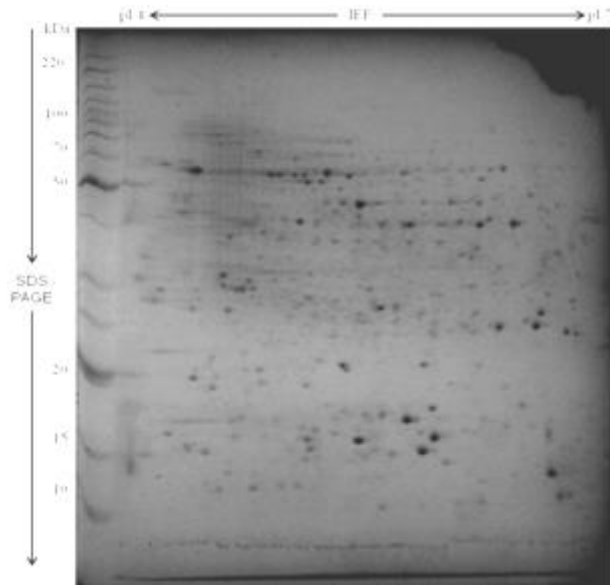


Figure 1. Overview of the proteome of tomato roots infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, separated by two-dimensional electrophoresis. The proteome was resolved through IEF/SDS-PAGE (12.5%) using a linear pI range 4-7 and molecular mass range 10-220 kDa.

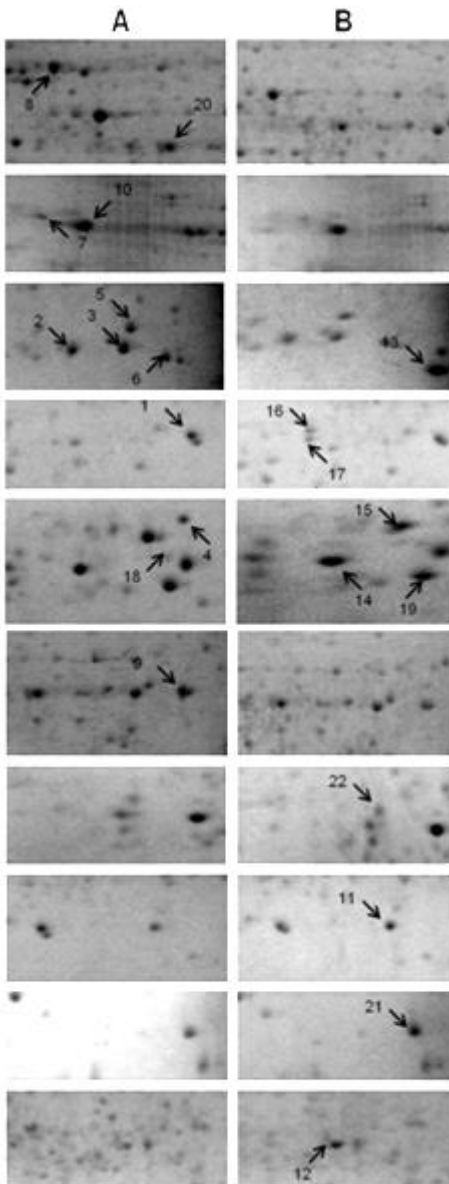


Figure 2. Expanded regions of the 2-D gels showing spots of proteins that were differentially expressed. Panel A shows the spots in the samples from the healthy plant. Panel B shows the spots in the samples from plants inoculated with *Fusarium oxysporum*. The spot numbers indicated by arrows are according to the numbers used in

4 ARTIGO 2

Manuscrito a ser enviado ao periódico Molecular Plant Pathology

Instruções para o autor:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1364-3703/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1364-3703/homepage/ForAuthors.html)

**Identificação e quantificação das diferenças no proteoma da raiz do
tomateiro, infectado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por
iTRAQ e LC-MS/MS**

Silva^a, T.D., Silva, M.V.^b, Pontes, A.H.^c, Sousa, M.V.^c, Fontes, W.^c, Ricart,
C.A.O.^c, Reis, A.^d and Correia, M.T.S.^{b,1}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas ã Centro de Ciências
Biológicas ã Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Rua Prof. Nelson
Chaves s/n, Cidade Universitária. CEP: 50670-901, Recife ã PE, Brasil.

^bDepartamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária. CEP: 50670-420, Recife - PE
Brasil.

^cLaboratório de Química e Bioquímica de Proteínas ã Departamento de
Biologia Celular ã Instituto de Ciências Biológicas ã Universidade de Brasília
(UnB). Campus Universitário Darcy Ribeiro. CEP 70910-900, Brasília ã DF,
Brasil

^dLaboratório de Fitopatologia ã Embrapa Hortaliças ã CNPH. Parque Estação
Biológica - PqEB s/nº. CEP 70770-901, Brasília, DF ã Brasil.

¹Corresponding author: M.T.S. Correia

E-mail: mtscorreia@gmail.com

Tel.: +55 81 2126 8547; fax: +55 81 2126 8576

Resumo

A murcha de fusário é uma das doenças mais importantes da cultura do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) e é causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Entender a interação entre as proteínas da planta e do patógeno é a chave para o controle da doença. A utilização das ferramentas proteômicas *isobaric tags for relative and absolut quantification* (iTRAQ) e a espectrometria via LC-MS/MS tem apresentado resultados expressivos no estudo dessas interações. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de estudar as alterações no proteoma da raiz do tomateiro infectadas com o Fol, através marcação com iTRAQ e análise por LC-MS/MS. Foram utilizadas as cultivares, BHRS 2,3 (resistente) e Viradouro (susceptível), além de um isolado da raça 3 de Fol. Após 21 dias de crescimento, as raízes foram inoculadas com o fungo e após sete dias, o tecido radicular foi coletado. As proteínas totais foram extraídas, quantificadas, digeridas com tripsina, marcadas com iTRAQ, fracionadas e dessalinizadas. A separação foi feita através de LC-MS/MS, seguida da análise de bioinformática e estatística. A cultivar Viradouro apresentou 204 proteínas com expressão diferencial, além de 41 proteínas do fungo. Não houveram proteínas reguladas com consistência estatística na cultivar BHRS 2,3. Proteínas de reconhecimento de fungos, de sinalização e relacionadas a patogenicidade apresentaram diminuição da expressão. Além de várias proteínas ribossomais, também reguladas negativamente. Entre as proteínas com aumento de expressão, destacam-se proteínas relacionadas com a explosão oxidativa. Em relação as proteínas do fungo, a maior parte está relacionada ao desenvolvimento e proteínas estruturais. Mas uma enzima relacionada a síntese do ácido jasmônico, composto produzido em resposta injúrias e patógenos, pode indicar influência do fungo na biologia da planta.

Palavras Chave: *Solanum lycopersicum*; Murcha de Fusário; Interação Planta-Patógeno; Proteômica; Espectrometria de Massas.

69 **Introdução**

70 O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é a segunda hortaliça mais
71 cultivada no mundo, perdendo apenas para a batata. Sua produção atende a
72 indústria de molhos e extratos, utilizados na culinária de todo o mundo, além do
73 consumo do produto fresco, destino da maior parte da produção, ainda mais
74 reforçada pela busca de alimentos mais saudáveis. Entretanto o tomateiro vem
75 perdendo sua produção, devido ao amplo número de patógenos, dentre eles
76 fungos, bactérias, nematoides e vírus, os quais a cultura está sujeita (Vilela et
77 al., 2012). O fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) é o agente
78 causador de uma das mais importantes doenças da cultura, a murcha de
79 fusário, que infecta tanto espécies cultivadas como selvagens de tomateiro. A
80 doença pode se manifestar em qualquer estágio de desenvolvimento da planta,
81 no entanto seus sintomas se manifestam principalmente durante a floração e
82 frutificação. Além disso, a doença está presente em todas as regiões onde o
83 tomate é cultivado (Reis and Lopes, 2012).

84 Estratégias de controle químico e culturais da murcha de fusário são
85 onerosas e pouco efetivas na maioria das situações (Jones and Woltz, 1981). A
86 utilização de híbridos resistentes tem sido a melhor e, em algumas situações, a
87 única alternativa economicamente viável para o controle desta doença, embora
88 apresente algumas dificuldades, pois induzem o surgimento de raças mais
89 virulentas do fungo, que requerem um programa contínuo de criação e a
90 introdução regular de novas cultivares resistentes, além da dificuldade na
91 obtenção de cultivares que apresentem características agronômicas desejáveis
92 e, também, o tempo necessário para sua obtenção (Nelson, 1981).

93 A primeira linha de defesa da planta está no reconhecimento dos
94 padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen associated molecular*
95 *patterns, PAMPs*). Elas são moléculas essenciais para o microrganismo, que
96 não podem ser deletadas ou mutadas e são altamente conservadas ao longo
97 das diversas espécies microbianas (Felix, et al., 1999). O reconhecimento dos
98 PAMPs pelos receptores de reconhecimento de padrão (*pattern recognition*
99 *receptors, PRRs*) inicia a resposta imune desencadeada por PAMPs (*PAMP-*
100 *triggered immunity, PTI*) caracterizada por acionar diversos eventos para
101 contenção da colonização (Monaghan and Zipfel, 2012).

Entretanto, através de moléculas conhecidas como efetores, o patógeno consegue sobrepor as defesas da planta e prosseguir com a infecção. Os mecanismos de ação dos efetores ou proteínas de virulência (Avr), ainda não estão bem elucidados, mas diferentes tipos de proteínas têm sido cada vez mais descritos (Nicaise; Roux and Zipfel, 2009). Para sobrepor as proteínas Avr, as plantas fazem uso da imunidade desencadeada por efetores (ETI), através de famílias de genes de resistência (R). O resultado final da interação genes R e proteínas Avr é o que determina se a doença continua ou é contida (Dodds et al., 2006).

Ferramentas proteômicas tem sido amplamente utilizadas no estudo da interação planta patógeno gerando abundante informação sobre proteínas envolvidas nos processos biológicos (Park, 2004). A proteômica baseada em espectrometria de massas permite o estudo global do proteoma, conseguindo identificar milhares de proteínas em um único experimento (ONG; MANN, 2005). Com a adição de técnicas, utilizando *isobaric tags for relative and absolut quantification* (iTRAQ) é possível quantificar proteínas. Com essa técnica é possível marcar até 8 amostras com tags de mesma massa, não prejudicando assim, a identificação dos peptídeos analisados. Após a fragmentação dos peptídeos a tag de quantificação é liberada e detectada em MS2 (Unwin RD, 2010). O presente estudo utilizou iTRAQ associado a LC-MS/MS para comparar o proteoma de plantas de tomateiro, infectadas e não infectadas com um isolado da raça 3 do fungo *Fol*, a fim de identificar e quantificar proteínas envolvidas nesta interação.

Materiais e Métodos

Linhagens do tomateiro e isolados do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Foram utilizadas nos experimentos, as cultivares BHRS 2,3, resistente a murcha de fusário e Viradouro, sensível a doença, provenientes do banco de sementes da Embrapa Hortaliças ã CNPH. O isolado 314 da raça 3 do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, oriundo da coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças ã CNPH.

Delineamento experimental

Para produção de esporos (usados como inóculo), fragmentos de BDA contendo micélio fúngico foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer com o meio líquido batata dextrose (BD) e mantidos sob agitação constante a 12 horas de luz e temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) por sete dias. Após este período, a suspensão de conídeos foi filtrada em gaze dupla e a concentração inicial foi estimada, com o auxílio de um hemacitômetro, e em seguida ajustada para 1×10^6 conídios $\times \text{mL}^{-1}$.

Para a semeadura das cultivares foram utilizadas bandejas de isopor com 128 células contendo substrato esterilizado (Plantmax®) e mantidas em casa de vegetação. Após 21 dias do plantio (DAP) as mudas foram removidas da bandeja e as raízes lavadas para retirar o substrato aderido às mesmas. A porção apical das raízes foi cortada (aproximadamente 2 cm) e mergulhadas em suspensão de esporos por 3 minutos. Em seguida, as plantas inoculadas e plantas controles foram transplantadas para vasos de 1,5 L contendo uma mistura de argila, esterco bovino curtido, areia e palha de arroz carbonizada esterilizada. Os vasos foram irrigados 30 min. antes do plantio. Após o transplante, foram adicionados 5 mL da suspensão de conídios no colo de cada plântula. As parcelas experimentais constaram de três vasos com quatro plantas cada, em um delineamento em blocos casualizados. Após 7 dias de inoculação, as raízes foram coletadas, lavadas com água MilliQ, pesadas e estocadas em ultrafreezer -80°C .

Extração das Proteínas Totais

As proteínas totais da raiz do tomateiro, controle e infectado foram extraídas utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, as proteínas foram quantificadas com o Qubit 2.0 (Invitrogen).

Gel unidimensional - SDS-PAGE

A qualidade das proteínas extraídas foi analisada em gel desnaturante de poliacrilamida. A solução do gel separador a 12,5% continha: Tris-HCl 375mM pH 8,8 / SDS 0,1% / acrilamida-bisacrilamida 12,5% (29:1, p/v) / TEMED 0,05% (v/v) / persulfato de amônio 0,05% (p/v). A solução do gel concentrador a 4% continha: Tris-HCl 125mM, pH 6,8 / SDS 0,1% / acrilamida-

bisacrilamida 4% (29:1, p/v) / TEMED 0,05% (v/v) / persulfato de amônio 0,05% (p/v). Após a polimerização, o sistema foi montado em uma cuba apropriado e preenchido com tampão de corrida SDS 1X (Tris base 0,3% (p/v) / glicina 1,44% (p/v) / SDS 0,1% (p/v)). As amostras foram preparadas adicionando-se a 100 µg de proteínas liofilizadas, 20 µL de tampão da amostra, fervidas por 3 min. e aplicadas no gel. Após a eletroforese (20mA por 120 min.), o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R 250.

Digestão das proteínas pelo método FASP

Cerca de 100 µg de proteínas foram digeridas pelo método FASP (*Filter-aided sample preparation*) (Wiñiewski et al, 2009) modificado, utilizando filtros com cutoff de 30 kDa. As proteínas foram lavadas com solução contendo 8 M de ureia e 0,2 M do tampão TEAB (*Triethylammonium bicarbonate buffer*). Em seguida foram reduzidas com DTT e alquiladas com iodoacetoamida. Após a alquilação, foi adicionada a protease tripsina (Promega), na proporção de 1:100 µg e incubadas a 37 °C por 18h. Após esse período, os peptídeos foram eluídos e quantificados com o Qubit 2.0 (Invitrogen).

Marcação iTRAQ ã 8 plex

A marcação com iTRAQ seguiu as instruções do fabricante com pequenas modificações. Em linhas gerais, 100 µg do digesto dessalinizado e seco de cada amostra foi ressuspensionado em 30 µL de 300 mM TEAB e adicionadas a um frasco do reagente iTRAQ já ressuspensionado em 70 µL de isopropanol. Os frascos já com as amostras foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 2 horas e em seguida foram misturados na proporção de 1:1:1:1:1:1, cada frasco uma réplica biológica do experimento (113, 114, 115 ã inoculado; 116, 117, 118 ã não inoculado).

Fracionamento e Dessalinização

Cerca de 30 µg de peptídeos foram divididos em quatro frações, por cromatografia de troca catiônica, utilizando o método de *stage tip* adaptado de Rappsilber et al (2007). O fracionamento foi realizado com gradiente salino, com acetato de amônia, as concentrações variando entre 0,25 M e 3 M, em solução contendo 20% de acetonitrila (ACN) e 0,5% de ácido acético. Cada fração foi dessalinizada por cromatografia de fase reversa, utilizando *stage tip*

198 com resina C18. As amostras foram lavadas com ácido acético 0,1% e eluídas
199 com gradiente de ACN (25%-100%), em solução com ácido acético 0,1%.

200 **Espectrometria de massas ñ LC - MS/MS**

201 Após a dessalinização os peptídeos foram submetidos a espectrometria
202 de massas. A cromatografia foi realizada via cromatógrafo UPLC Dyonex 3000
203 (Thermo Fisher Scientific), utilizando uma coluna capilar feita no laboratório,
204 com 35 cm de comprimento, 7,5 µm de diâmetro, preenchida com partículas de
205 C18, de tamanho 1,8 µm. Foi estabelecido fluxo de 300 nL/min para a eluição
206 dos peptídeos, seguindo um gradiente 10 min de tampão A (0.1% ácido
207 fórmico), seguido de 200 min, em um gradiente de 2-40% Tampão B (0,1%
208 ácido fórmico em ACN). Cerca de 1 µg de peptídeos foi carregado em cada
209 corrida. Após a separação por cromatografia, os peptídeos foram ionizados por
210 eletrospray, com intensidade do spray de 2,5 Kv, seguido de análise e
211 aquisição dos picos de MS e MS/MS, no Orbitrap Elite (Thermo Fisher
212 Scientific), com aquisição dependente de dados, no modo top 15 (os 15 picos
213 mais intensos no MS1 são fragmentados e levados para o MS2) utilizando
214 resolução de 120.000, com o alcance de detecção de 300 a 1800 m/z, para
215 MS1. Para fragmentação foi utilizado a dissociação por colisão induzida de alta
216 energia (HCD), com a energia colisional normalizada de 30 e contagem
217 máxima de íons para detecção selecionada para 10⁴ íons.

218 **Análise Estatística**

219 Os espectros foram analisados pelo programa Peaks Studio 7.0
220 (Bioinformatics Solutions). Foram estabelecidos os filtros para confronto com o
221 banco de dados: taxa de falsos positivos (FDR) tolerados <1%, peptídeos com
222 carga 0 ou 1 foram retirados da análise e foram utilizados pelo menos dois
223 peptídeos únicos para identificação dos peptídeos, que foram submetidos a
224 comparação com o banco de massas do tomateiro, depositados no UniProt. A
225 estatística da quantificação foi realizada por meio do teste t moderado (teste
226 Limma) para proteômica (Schwammle et al, 2013), através do programa
227 RStudio (RStudio Team, 2015), onde, a expressão foi considerada
228 estatisticamente regulada com o valor de p<0,05.

229

Resultados

Caracterização do proteoma radicular do tomateiro após a infecção com Fol

A fim de identificar e quantificar as modificações no proteoma do tomateiro em consequência da inoculação com o Fol, foram colatados raízes 7 dias após a inoculação com o fungo. As proteínas extraídas das raízes foram quantificadas, separadas em gel de poliacrilamida para avaliação da qualidade da extração (Figura 1), em seguida reduzidas, alquiladas e digeridas. Após a digestão os peptídeos foram marcados para a quantificação da expressão proteica com o reagente iTRAQ, que permite a combinação de múltiplas amostras marcadas, reduzindo o numero de réplicas experimentais, além da alta sensibilidade e eficiência, pois a tag se liga ao N terminal do peptídeo e aos resíduos de lisina, garantindo que pelo menos uma tag será incorporada ao peptídeo.

Após a análise no espectrômetro de massas foi possível identificar peptídeos correspondentes a aproximadamente 1500 proteínas, com FDR menor que 0,05, nas cultivares sensível e resistente a doença. Depois da análise dos espectros e validação estatística, foram encontradas 204 proteínas com expressão diferencial na cultivar Viradouro. Destas, 93 proteínas tiveram sua expressão aumentada (Tabela 1) 111 proteínas tiveram sua expressão diminuída (Tabela 2). Além disso, 41 proteínas do fungo (Tabela 3) foram identificadas. Na cultivar BHRS 2,3, nenhuma proteína teve expressão diferencial estatisticamente consistente.

Modificações no proteoma da raiz do tomateiro

O banco de dados de proteínas do tomateiro possui cerca de 35000 entradas, a maior parte baseada no genoma completo (Tomato Genome Consortium, 2012). Por isso, a maior parte das proteínas ainda não foi caracterizada, sendo necessário realizar estudos de *Gene Ontology* (GO), para caracterizar e agrupar funcionalmente as proteínas com expressão diferencial. A figura 2 mostra os principais processos biológicos, funções moleculares e compartimentos celulares as quais as proteínas diferencialmente reguladas estão distribuídas, de acordo com análise feita no programa blast2GO (Conesa

et al, 2005). As proteínas reguladas do tomateiro, identificadas neste trabalho, estão agrupadas segundo o *biological process* do Blas2GO como envolvidas em: processos metabólicos, processos celulares, respostas a estímulos, regulação biológica, sinalização, desenvolvimento, imunidade, entre outros. Enquanto que as proteínas do fusário estão envolvidas em processos metabólicos, processos celulares, localização, regulação biológica, biogênese, resposta a estímulos e crescimento.

Discussão

Para que novas abordagens de manejo do Fol sejam desenvolvidas é necessário um profundo entendimento da patogenicidade do fungo. O proteoma do tomateiro susceptível sofreu mudanças em consequência a infecção. Usando uma abordagem de proteômica quantitativa por MS, foi possível identificar 204 proteínas reguladas no tomateiro e 41 proteínas do fungo. A maior parte das proteínas com diminuição da expressão estão relacionadas com metabolismo primário, entretanto, algumas proteínas de defesa e reconhecimento de patógeno também apresentaram regulação negativa. Diversas proteínas relacionadas com a reação de hipersensibilidade e explosão oxidativa estavam reguladas positivamente, bem como algumas proteínas de metabolismo de carboidratos.

Modificações nos mecanismos de defesa

Uma das principais fontes de defesa contra patógenos, são as proteínas relacionadas a patogenicidade (PR) (Vitale et al, 2014). A proteína PR-2, que age como β -1,3-glucanase, limitando o desenvolvimento do fungo degradando β -glicanos, presentes na parede celular do fungo teve a sua expressão aumentada na cultivar Viradouro. Entretanto outros trabalhos já descreveram a presença da proteína PR-2 em cultivares sensíveis a doenças, sugerindo que esta, não seja essencial para a resposta de defesa (Mazzeo et al, 2014). Outras proteínas PR (1 e 10) tiveram sua expressão diminuída. A proteína PR-1, faz parte da resistência sistêmica adquirida (SAR), induzida por patógeno, entretanto, sua atividade biológica permanece desconhecida (van Loon et al, 2006). A diminuição da expressão desta proteína está diretamente associada a diminuição da expressão da proteína *Glycine-rich rna-binding*, que está associada com imunidade da planta associada ao ácido salicílico (Hackmann et

295 al, 2014). A diminuição da sua expressão pode estar relacionada a algum
296 mecanismo do fungo para nublar sua presença no tecido radicular do
297 tomateiro. A proteína PR-10 é conhecida pela sua atividade de ribonuclease e
298 está mais caracterizada pela sua atividade direta contra vírus (van Loon et al,
299 2006).

300 Outra linha de defesa bastante descrita é a reação de hipersensibilidade,
301 que geralmente está associada com liberação de espécies reativas de oxigênio
302 e morte celular programada (Proietti et al, 2014). Diversas proteínas
303 relacionadas com a explosão oxidativa tiveram sua expressão aumentada após
304 o contato com o Fol sendo 5 isoformas de peroxidases, que oxidam diversos
305 compostos utilizando H_2O_2 , além de serem consideradas proteínas PR (PR-9)
306 (Singh et al, 2013; van Loon et al, 2006). Outras proteínas associadas com
307 ROS são a catalase e glutathione-S-transferase, que são responsáveis por
308 manter a homeostase redox, diminuindo o efeito do estresse oxidativo sobre a
309 planta (Soydam-Aydin et al, 2015; Xu et al, 2015). As espécies reativas de
310 oxigênio também estão relacionadas com a produção e deposição de calose,
311 um polissacarídeo da planta, que é depositado na parede celular, numa
312 tentativa de impedir o avanço do patógeno (López-Cruz et al, 2016). Esses
313 compostos reativos também servem como sinalizadores, que desencadeiam
314 outras vias de defesa e proteção. Uma das principais vias secundárias de
315 defesa ativadas é a do ácido jasmônico, cuja via de síntese possui a enzima
316 *12-oxophytodienoate reductase 11* está associado com a produção de ROS
317 (López-Cruz et al, 2016). Entretanto, algumas proteínas como *TMV resistance*
318 *protein*, polifenol oxidase, *miraculin-like* e glutarredoxina tiveram sua expressão
319 diminuída. A proteína de resistência ao TMV é um produto da classe de genes
320 *R Toll-interleukin-1 receptornucleotide-binding siteyleucine-rich repeat*, família
321 já descrita por conferir resistência aos mais diversos patógenos (Dinesh-Kumar
322 et al, 2000). Já a diminuição da expressão polifenol oxidase já foi descrita por
323 diminuir a resistência a patógenos, apesar do seu papel na defesa ainda não
324 ter sido bem elucidado (Vitale et al, 2014). A *miraculin-like* é descrita como
325 inibidor de proteinase, que atua regulando a proteólise durante a morte celular
326 programada (Mondego et al, 2011). A glutarredoxina é uma oxidoreductase que
327 atua regulando o metabolismo dos ROS (Hu et al, 2015). A diminuição da

expressão de proteínas relacionadas a HR pode estar sendo manipulada pelo patógeno, que pode utilizar a sinalização dos fitohormônios em benefício próprio modificando a biologia da planta, propiciando seu desenvolvimento (Boyd et al 2012; López-Cruz et al, 2016).

Sinalização

A proteína de membrana *chitin elicitor receptor kinase 1-like* é um componente essencial para a sinalização da presença de patógenos fungicos (Shimizu et al, 2010). A diminuição da expressão dessa proteína acarreta na não ativação ou ativação tardia dos mecanismos primários de defesa (PTI), permitindo assim, que o fungo se instale e prossiga com a doença. Teper et al (2014), demonstraram que a inibição da proteína 14-3-3 por efetores suprime a imunidade mediada por efetores (ETI), segunda linha de defesa da planta, mediada por genes R. Neste trabalho, três formas da proteína 14-3-3 estão com expressão diminuída. Outras proteínas kinase associadas com sinalização de defesa, *adenosine kinase* (Liu et al, 2014) e MAPK 2 (Dahal et al, 2009) tiveram sua expressão reguladas negativamente, enquanto que duas *serine threonine-protein kinase smg1-like* tiveram suas expressões aumentadas. Estas ultimas são descritas por manter a sobrevivência do mRNA ou atuar contra estresse genotóxico.

Metabolismo primário

Vinte e cinco proteínas ribossomais apresentaram diminuição na sua expressão em consequência do contato com o fungo. 14 proteoformas da porção 60s e 11 proteínas da porção 40s. Estas proteínas são necessárias para a síntese proteica, a diminuição da sua expressão acarreta na diminuição da produção global de proteínas (Wang et al, 2003). As proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos, *fructose-bisphosphate cytoplasmic isozyme 1* (Gong et al, 2010), enolase (Macías-Sánchez et al, 2014), apresentaram redução na sua expressão, enquanto que *alpha-mannosidase* (Hossain et al, 2010) e *glucose-6-phosphate* (Wakao and Benning, 2005) apresentaram aumento na sua expressão. Dados proteômicos sobre as modificações causadas por fungos patogênicos são escassos, tornando a interpretação dos resultados difícil (Vitale et al, 2014).

Proteínas do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

A maior parte das proteínas do fungo encontradas estão relacionadas a metabolismo primário dele. Foram encontradas proteínas estruturais, *lustrin a* (Wang et al, 2005), metabolismo de carboidratos, *glycoside hydrolase family 2* (Cao et al, 2014), processos metabólicos, *glutamyl-trna amidotransferase subunit a like protein*. A enzima *4-coumarate- ligase-like 9* faz parte do canal responsável por levar o carbono absorvido no metabolismo primário, para o metabolismo secundário (Schneider et al, 2003). Uma das vias as quais essa enzima está ligada, é a do ácido jasmônico (Schneider et al, 2005), sugerindo um possível papel do fungo na regulação de uma via de defesa da planta.

Cultivar resistente

A cultivar BHRS 2,3 é descrita como resistente a todas as três raças do *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, sendo utilizada como controle na descrição de novos isolados (Reis et al, 2005). Não existem estudos de tempo de infecção, com o objetivo de descobrir em quanto tempo essa cultivar elimina o fungo e retorna a homeostase. Estudos anteriores do grupo evidenciaram diferença de expressão quatro dias após a inoculação. Possivelmente, em sete dias a planta elimina a infecção e se recupere totalmente, não sendo possível encontrar proteínas reguladas em função da interação com o fungo.

Conclusão

Os resultados da utilização da marcação com iTRAQ associado a espectrometria de massas *high throughput*, nunca antes feito no estudo da interação tomateiro/Fol evidenciaram diversas proteínas de defesa, reconhecimento e sinalização do tomateiro sensível a murcha de fusário com expressão diminuída, além de proteínas do fungo, demonstrando que o mesmo está colonizando o sistema radicular, além de um possível indício da sua influência na fisiologia da planta. Futuros estudos poderão contribuir no entendimento de como a cultivar BHRS 2,3, resistente ao patógeno, consegue resistir e se recuperar da doença.

Agradecimentos

Este trabalho teve suporte da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), da Universidade de Brasília (UnB), da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), do Banco do Nordeste (BNB) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referencias

Boyd, L.A., Ridout, C., O'Sullivan, D.M., Leach, J.E. and Leung, H. (2012) Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*. xx, 1-8.

Conesa, A., Götz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M. and Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*. 21, 3674-3676.

Dahal, D., Heintz, D., Dorselaer, A.V., Braun, H.P. and Wydra, K. (2009) Pathogenesis and stress related, as well as metabolic proteins are regulated in tomato stems infected with *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47, 838-846.

Dinesh-Kumar S.P., Wai-Hong T. and Baker B.J.(2000) Structure-function analysis of tobacco mosaic virus resistance gene N. *PNAS*. 97, 14789-14794.

Dodds, P.N., Lawrence, G.J. Catanzariti, AM., Teh, T., Wang, Cl.A., Ayliffe, M.A. Kobe, B. and Ellis, J.G (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *PNAS*. 103, 8888-8893.

Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. and Boller, T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*. 18, 265-276.

Gong, P., Zhang, J., Li, H., Yang, C., Zhang, C., Zhang, X., Khurram, Z., Zhang, Y., Wang, T., Fei, Z. and Ye, Z. (2010) Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. *Journal of Experimental Botany*. 61, 3563-3575.

- 422 **Hackmann, C., Korneli1, C., Kutyniok, M., Köster, T., WiedenlÜbbert, M.,**
 423 **Müller, C. and Staiger, D.** (2014) Salicylic acid-dependent and -independent
 424 impact of an RNA-binding protein on plant immunity. *Plant, Cell and*
 425 *Environment*. 37, 696-706.
- 426 **Hossain, Md. A., Nakano, R., Nakamura, K., Hossain, Md. T. and Kimura, Y.**
 427 (2010) Molecular characterization of plant acidic α -mannosidase, a member of
 428 glycosylhydrolase family 38, involved in the turnover of N-glycans during tomato
 429 fruit ripening. *Journal of Biochemistry*. 148, 603-616.
- 430 **Hu, Y., Wu, Q., Sprague, S.A., Park, J., Oh, M., Rajashekar, C.B., Koiwa, H.,**
 431 **Nakata, P.A., Cheng, N., Hirschi, K.D., White, F.F. and Park, P.**(2015)
 432 Tomato expressing *Arabidopsis* glutaredoxin gene AtGRXS17 confers tolerance
 433 to chilling stress via modulating cold responsive components. *Horticulture*
 434 *Research*. 2, 1-11
- 435 **Jones J.P. and Woltz S.S.** (1981) Fusarium-incited diseases of tomato and
 436 potato and their control. In: *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*
 437 (Nelson P.E.; Toussoun T.A.; Cook R.J. eds). pp.157-168. Pennsylvania State
 438 University Press.
- 439 **Liu, L., Chung, H.Y., Lacatus, G., Baliji, S., Ruan, J. and Sunter, G.**(2014)
 440 Altered expression of *Arabidopsis* genes in response to a multifunctional
 441 geminivirus pathogenicity protein. *BMC Plant Biology*. 14, 1-16.
- 442 **López-Cruz, J., Crespo-Salvador, Ó., Fernández-Crespo, E., García-**
 443 **Agustín, P. and González-Bosch, C.**(2016) Absence of Cu-Zn-superoxide
 444 dismutase BCSOD1 reduces *Botrytis cinerea* virulence in *Arabidopsis* and in
 445 tomato plants, which reveals interplay among ROS, callose and signaling
 446 pathways. *Molecular Plant Pathology*. DOI: 10.1111/mpp.12370.
- 447 **Macías-Sánchez, K.L., García-Soto, J., Roncero, M.I.G., Hernández-**
 448 **Monjaraz, W., Caudillo-Pérez, C. and Martínez-Cadena, M.G.** (2015) Isolation
 449 and Expression of Enolase Gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
 450 *Applied Biochemistry Biotechnology*. 175, 902ñ908.
- 451 **Mazzeo, M.F., Cacace, G., Ferriello, F., Puopolo, G., Zoina, A., Ercolano,**
 452 **M.R. and Siciliano, R.A.** (2014) Proteomic investigation of response to FORL
 453 infection of tomato roots. *Plant Physiology and Biochemtry*. 74, 42-49.

- 454 **Monaghan, J. and Zipfel, C.** (2012) Plant pattern recognition receptor
455 complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*. 15, 349-
456 357.
- 457 **Mondego, J.M.C., Duarte, M.P., Kiyota, E., Martínez, L., Camargo, S.R.,**
458 **Caroli, F.P., Alves, B.S.C., Guerreiro, S.M.C., Oliva, M.L.V. Guerreiro-Filho,**
459 **O. and Menossi, M.**(2011) Molecular characterization of a miraculin-like gene
460 diVerentially expressed during coVee development and coVee leaf miner
461 infestation. *Planta*. 233, 123ñ137.
- 462 **Nelson, P.E.** (1981) Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In:
463 *Fungal wilt diseases of plants* (Mace, M.E.; Bell, A.A.: Beckman, C.H. eds). pp.
464 51-80. New York: Academic Press.
- 465 **Nicaise, V., Roux, M., Zipfel, C.** (2009) Recent Advances in PAMP-Triggered
466 Immunity against Bacteria: Pattern Recognition Receptors Watch over and
467 Raise the Alarm. *Plant Physiology*. 109, 1638-1647.
- 468 **Ong, S.E., Mann, M.** (2005) Mass Spectrometry-based Proteomics Turns
469 Quantitative. *Nature*. 1, 252-262.
- 470 **Park, O.K.** (2004) Proteomic studies in plants. *Journal of Biochemistry and*
471 *Molecular Biology*. 37, 133-138.
- 472 **Proietti, S., Giangrande, C., Amoresano, A., Pucci, P., Molinaro, A., Bertini,**
473 **L., Caporale, C., Caruso, C.** (2014) *Xanthomonas campestris*
474 lipooligosaccharides trigger innate immunity and oxidative burst in Arabidopsis.
475 *Plant Physiology and Biochemistry*. 85, 51-62.
- 476 **Rappsilber, J., Mann, M. and Ishihama, Y.** (2007) Protocol for micro-
477 purification, enrichment, pre-fraction. and storage of peptides for proteomics
478 using StageTips. *Nature Protocols*. 2, 1896ñ1906.
- 479 **Reis A. and Lopes C.A.** (2012) Doenças causadas por fungos e distúrbios
480 fisiológicos. In: *Produção de tomate para processamento industrial* (Clemente,
481 F.M.V.T. and Boiteus, L.S. eds). pp. 179ñ202. Brasília, DF: Embrapa.
- 482 **Reis, A., Costa, H., Boiteux, L.S. and Lopes, C.A.** (2005) First report of
483 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. *Fitopatologia*
484 *Brasileira*. 30, 426-428.

- 485 **RStudio Team.** (2015) RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc.,
486 Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- 487 **Schneider, K., Hövel, K., Witzel, K., Hamberger, B., Schomburg, D.,**
488 **Kombrink, E. and Stuible, H-P.** (2003) The substrate specificity-determining
489 amino acid code of 4-coumarate:CoA ligase. *PNAS*. 100, 8601-8607.
- 490 **Schneider, K., Kienow, L., Schmelzer, E., Colby, T., Bartsch, M., Miersch,**
491 **O., Wasternack, C., Kombrink, E. and Stuible, H-P.** (2005) A new type of
492 peroxisomal acyl-coenzyme a synthetase from *Arabidopsis thaliana* has the
493 catalytic capacity to activate biosynthetic precursors of jasmonic acid. *The*
494 *Journal of Biological Chemistry*. 280, 13962-13972.
- 495 **Schwämmle, V., León, I.R. and Jensen, O.N.** (2013) Assessment and
496 Improvement of Statistical Tools for Comparative Proteomics Analysis of
497 Sparse Data Sets with Few Experimental Replicates. *Journal of Proteome*
498 *Research*. 12, 3874-3883.
- 499 **Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N.,**
500 **Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H.,* and Shibuya,**
501 **N.** (2010) Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively
502 regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant Journal*. 64, 204-214.
- 503 **Singh, H., Dixit, S., Verma, P.C. and Singh, P.K.** (2013) Differential
504 peroxidase activities in three different crops upon insect feeding. *Plant Signaling*
505 *& Behavior*. 8, 1-8.
- 506 **Soydam-Aydın, S., Büyük, I., Cansaran-Duman, D., and Aras, S.** (2015)
507 Roles of catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) genes in stress
508 response of eggplant (*Solanum melongena* L.) against Cu²⁺ and Zn²⁺ heavy
509 metal stresses. *Environmental Monitoring and Assessment*. 187, 1-6.
- 510 **Teper, D., Salomon, D., Sunitha, S.1, Kim,J-G., Mudgett, M.B. and Sessa,**
511 **G.** (2014) *Xanthomonas euvesicatoria* type III effector XopQ interacts with
512 tomato and pepper 14-3-3 isoforms to suppress effector-triggered immunity.
513 *The Plant Journal*. 77, 297-309.
- 514 **The Tomato Genome Consortium.** (2012) The tomato genome sequence
515 provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*. 485, 635-641.

- 516 **Unwin R.D.** (2010) Quantification of proteins by iTRAQ. In: LC-MS/MS In:
517 *Proteomics Methods and Applications* (Cutillas, P.R. and Timms, J.F. eds). pp.
518 205-16. Methods in Molecular Biology, Humana Press.
- 519 **van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J.** (2006) Significance of inducible
520 defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*.
521 44, 135-162.
- 522 **Vilela N.J., Melo P.C.T., Boiteux L.S. and Clemente F.M.V.T.** (2012). Perfil
523 socioeconômico da cadeia agroindustrial no Brasil. In: *Produção de tomate*
524 *para processamento industrial* (Clemente, F.M.V.T. and Boiteux, L.S. eds). pp.
525 17-27. Brasília, DF: Embrapa.
- 526 **Vitale, A., Rocco, M., Arena, S., Giuffrida, F., Cassaniti, C., Scaloni, A.,**
527 **Tonia Lomaglio, T., Guarnaccia, V., Polizzi, G., Marra, M., Leonardi, C.**
528 (2014) Tomato susceptibility to Fusarium crown and root rot: Effect of grafting
529 combination and proteomic analysis of tolerance expression in the rootstock.
530 *Plant Physiology and Biochemistry*. 83, 207-216.
- 531 **Wakao, S. and Benning, C.** (2005) Genome-wide analysis of glucose-6-
532 phosphate dehydrogenases in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 41, 243-256.
- 533 **Wang, C., Butt, T.M. and St Leger, R. J.** (2005) Colony sectorization of
534 *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. *Microbiology*. 151, 3223-3236.
- 535 **Wang, Z., Potter, R.H. and Jones, M.J.K** (2003) Differential display analysis of
536 gene expression in the cytoplasm of giant cells induced in tomato roots by
537 *Meloidogyne javanica*. *Molecular Plant Pathology*. 4, 361-371.
- 538 **Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N. and Mann, M.** (2009) Universal
539 sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*. 6, 359-
540 362.
- 541 **Xu J, Xing X-J, Tian Y-S, Peng R-H, Xue Y, Zhao W, Yao, Q-H.** (2015)
542 Transgenic *Arabidopsis* plants expressing tomato Glutathione S-Transferase
543 showed enhanced resistance to salt and drought stress. *PLoS ONE*. 10, 1-16.
- 544
545

Tabelas

546 **Tabela 1:** Proteínas da cultivar Viradouro, com aumento da expressão.

Acesso	Descrição da Proteína	Organismo	Log10 Tratado/Controle
sp P30264 CATA1_SOLLC	catalase isozyme 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,512
sp Q9XG54 OPR1_SOLLC	12-oxophytodienoate reductase 11	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,5
tr K4AQY8 K4AQY8_SOLLC	atp synthase f1 subunit alpha	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,586
tr K4ARZ0 K4ARZ0_SOLLC	udp-glycosyltransferase 91a1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,555
tr K4ASG2 K4ASG2_SOLLC	dead-box atp-dependent rna helicase 37-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,53
tr K4ASJ5 K4ASJ5_SOLLC	lignin-forming anionic peroxidase-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,734
tr K4ASP6 K4ASP6_SOLLC	methionine aminopeptidase 2b-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,429
tr K4AT92 K4AT92_SOLLC	protein argonaute 4-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,602
tr K4ATC4 K4ATC4_SOLLC	bri1 suppressor 1 -like 2 isoform 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,492
tr K4AWS0 K4AWS0_SOLLC	eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,517
tr K4AXC1 K4AXC1_SOLLC	callose synthase 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	1,279
tr K4B055 K4B055_SOLLC	cytochrome p450 98a2-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,543
tr K4B089 K4B089_SOLLC	poly -binding protein 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,596
tr K4B1Z2 K4B1Z2_SOLLC	ankyrin repeat domain-containing protein 2-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,712
tr K4B2I9 K4B2I9_SOLLC	heat shock 70 kda mitochondrial-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,461
tr K4B3C2 K4B3C2_SOLLC	serine threonine-protein kinase smg1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	1,255
tr K4B4Z7 K4B4Z7_SOLLC	cullin 4	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,444
tr K4B7I1 K4B7I1_SOLLC	copper-transporting atpase ran1	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,462
tr K4B7I5 K4B7I5_SOLLC	udp-n-acetylglucosamine diphosphorylase 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,448
tr K4B7W2 K4B7W2_SOLLC	probable carboxylesterase 15	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,469
tr K4B948 K4B948_SOLLC	callose synthase 11-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,624
tr K4BA00 K4BA00_SOLLC	sucrose synthase 7-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,411
tr K4BBN6 K4BBN6_SOLLC	alpha-mannosidase 2x	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,588
tr K4BFP3 K4BFP3_SOLLC	peroxidase 72-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,796
tr K4BIF5 K4BIF5_SOLLC	serine threonine-protein phosphatase 7 long form homolog	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,806

Continuação da Tabela 1

tr K4BIL3 K4BIL3_SOLLC	lipoxygenase homology domain-containing protein 1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,483
tr K4BLI1 K4BLI1_SOLLC	dnaj homolog mitochondrial	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,639
tr K4BLQ0 K4BLQ0_SOLLC	pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,709
tr K4BLW8 K4BLW8_SOLLC	glycine--trna ligase mitochondrial-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,619
tr K4BM69 K4BM69_SOLLC	l-ala-d l-amino acid epimerase	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,425
tr K4BMH6 K4BMH6_SOLLC	coatomer subunit beta -2-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,651
tr K4BMN7 K4BMN7_SOLLC	nucleoporin nup53	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,543
tr K4BN29 K4BN29_SOLLC	aldehyde dehydrogenase family 7 member b4	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,393
tr K4BPZ0 K4BPZ0_SOLLC	rna-dependent rna polymerase 6	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,941
tr K4BRL8 K4BRL8_SOLLC	calreticulin-3-like isoform x1	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,597
tr K4BSK2 K4BSK2_SOLLC	micos complex subunit mic60	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,447
tr K4BSP6 K4BSP6_SOLLC	lipoxygenase homology domain-containing protein 1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,642
tr K4BTH6 K4BTH6_SOLLC	peroxidase 12-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,751
tr K4BVW7 K4BVW7_SOLLC	starch branching enzyme i	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,529
tr K4BWN1 K4BWN1_SOLLC	probable receptor-like protein kinase at5g15080	<i>Solanum lycopersicum</i>	1,069
tr K4C0T4 K4C0T4_SOLLC	peroxidase 3-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,756
tr K4C2V9 K4C2V9_SOLLC	cleft lip and palate transmembrane protein 1 homolog	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,613
tr K4C3T2 K4C3T2_SOLLC	glutathione s-transferase-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,573
tr K4C4E2 K4C4E2_SOLLC	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,39
tr K4C4Z6 K4C4Z6_SOLLC	heat shock protein 83	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,692
tr K4C5S4 K4C5S4_SOLLC	clathrin heavy chain 1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,484
tr K4C5X0 K4C5X0_SOLLC	golgin candidate 4	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,628
tr K4C6M0 K4C6M0_SOLLC	60s ribosomal protein l15-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,996
tr K4C726 K4C726_SOLLC	subtilisin-like protease	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,637
tr K4C740 K4C740_SOLLC	alanine aminotransferase 2-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,404
tr K4C744 K4C744_SOLLC	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101249930	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,785
tr K4C7G1 K4C7G1_SOLLC	protein disulfide isomerase-like 5-2	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,725
tr K4C9B4 K4C9B4_SOLLC	serine threonine-protein phosphatase bsl2	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,492

Continuação da Tabela 1

tr K4CAH3 K4CAH3_SOLLC	40s ribosomal protein s8-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,501
tr K4CB64 K4CB64_SOLLC	dna-directed rna polymerase chloroplastic	<i>Solanum lycopersicum</i>	1,601
tr K4CB67 K4CB67_SOLLC	serine carboxypeptidase ii-2	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,618
tr K4CBN0 K4CBN0_SOLLC	pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,709
tr K4CBX5 K4CBX5_SOLLC	probable inactive purple acid phosphatase 27	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,5
tr K4CCX1 K4CCX1_SOLLC	cst complex subunit ctc1 isoform x1	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,535
tr K4CDF4 K4CDF4_SOLLC	coatomer subunit alpha-1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,583
tr K4CE81 K4CE81_SOLLC	oligouridylate-binding protein 1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,368
tr K4CEW0 K4CEW0_SOLLC	glucose-6-phosphate 1- chloroplastic	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,459
tr K4CF67 K4CF67_SOLLC	benzyl alcohol o-benzoyltransferase	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,447
tr K4CFU2 K4CFU2_SOLLC	two-pore channel 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,503
tr K4CGU4 K4CGU4_SOLLC	protein dj-1 homolog b-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,632
tr K4CIM4 K4CIM4_SOLLC	flowering time control protein fca	<i>Solanum lycopersicum</i>	1,203
tr K4CMU3 K4CMU3_SOLLC	CYCLOPS	<i>Solanum lycopersicum</i>	1,078
tr K4CRL4 K4CRL4_SOLLC	protein ssuh2 homolog isoform x2	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,39
tr K4CSH2 K4CSH2_SOLLC	ribonuclease 2-like isoform x2	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,699
tr K4CSN4 K4CSN4_SOLLC	protein chloroplastic	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,472
tr K4CV09 K4CV09_SOLLC	serine threonine-protein phosphatase bsl1	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,492
tr K4CV23 K4CV23_SOLLC	e3 ubiquitin-protein ligase cip8	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,368
tr K4CV84 K4CV84_SOLLC	beta-glucosidase 11-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,378
tr K4CVM9 K4CVM9_SOLLC	40s ribosomal protein s3a	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,54
tr K4CW74 K4CW74_SOLLC	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101259883	<i>Solanum lycopersicum</i>	1,484
tr K4CWC6 K4CWC6_SOLLC	pathogenesis-related protein sth-2-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	1,687
tr K4CWL9 K4CWL9_SOLLC	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,409
tr K4CYE7 K4CYE7_SOLLC	protein suppressor of phyA-105 1-like isoform x1	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,673
tr K4D2Y1 K4D2Y1_SOLLC	tubulin beta-5 chain	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,401
tr K4D3G9 K4D3G9_SOLLC	protein flug	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,653
tr K4D3L0 K4D3L0_SOLLC	peroxidase 21	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,537

Continuação da Tabela 1

tr K4D3L8 K4D3L8_SOLLC	subtilisin-like protease	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,549
tr K4D5R6 K4D5R6_SOLLC	tmv resistance protein n-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,514
tr K4D9I3 K4D9I3_SOLLC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein h2	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,411
tr K4D9R6 K4D9R6_SOLLC	lysosomal pro-x carboxypeptidase-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,614
tr K4DCT0 K4DCT0_SOLLC	sec1 family domain-containing protein mip3	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,599
tr K4DF31 K4DF31_SOLLC	19-like isoform 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,795
tr K4DG74 K4DG74_SOLLC	cst complex subunit ctc1 isoform x1	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,535
tr K4DH10 K4DH10_SOLLC	thioredoxin superfamily protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,463
tr K4DHT7 K4DHT7_SOLLC	serine carboxypeptidase-like 33	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,618
tr Q38JD4 Q38JD4_SOLLC	temperature-induced lipocalin	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,647
tr U4LJV1 U4LJV1_PYROM	12-oxophytodienoate reductase 11	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,457
tr U4LN75 U4LN75_PYROM	12-oxophytodienoate reductase 11	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,463

547

548

549

Tabela 2: Proteínas da cultivar Viradouro, com diminuição da expressão.

Acesso	Descrição da Proteína	Organismo	Log10 Tratado/Controle
sp P21568 CYPH_SOLLC	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1,044
sp P35057 H4_SOLLC	histone h4	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,542
sp P42652 14334_SOLLC	14-3-3-like protein a	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,818
sp P46291 RL38_SOLLC	60s ribosomal protein l38	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,549
sp P46301 RS25_SOLLC	40s ribosomal protein s25	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,402
sp P49215 RS17_SOLLC	40s ribosomal protein s17	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,748
sp P93212 14337_SOLLC	14-3-3-like partial	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,858
sp Q9XGI9 AGUB_SOLLC	n-carbamoylputrescine amidase	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,556
sp Q9ZR41 GLRX_SOLLC	Glutaredoxin	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,425
tr B2LW68 B2LW68_SOLLC	basic form of pathogenesis-related protein 1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,43
tr E2FYC4 E2FYC4_SOLLC	chitin elicitor receptor kinase 1-like isoform x1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,627

Continuação da Tabela 2

tr K4AS65 K4AS65_SOLLC	kirola-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,873
tr K4ASQ6 K4ASQ6_SOLLC	phosphatidylglycerol phosphatidylinositol transfer protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,5
tr K4ASY4 K4ASY4_SOLLC	ubiquitin-conjugating enzyme e2 variant 1d	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,554
tr K4AT29 K4AT29_SOLLC	probable phenylalanine--trna ligase beta subunit	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,535
tr K4AT91 K4AT91_SOLLC	Calmodulin	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,624
tr K4AXJ5 K4AXJ5_SOLLC	dna replication licensing factor mcm7	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,486
tr K4B0G3 K4B0G3_SOLLC	60s ribosomal protein l7a-2-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,83
tr K4B0H4 K4B0H4_SOLLC	40s ribosomal protein s24-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,461
tr K4B0Y8 K4B0Y8_SOLLC	rapid alkalization factor	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,816
tr K4B2L1 K4B2L1_SOLLC	soluble inorganic pyrophosphatase chloroplastic-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-447
tr K4B438 K4B438_SOLLC	v-type proton atpase subunit b 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,594
tr K4B4A8 K4B4A8_SOLLC	tmv resistance protein n-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,566
tr K4B4D7 K4B4D7_SOLLC	succinyl- ligase	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,667
tr K4B7W7 K4B7W7_SOLLC	40s ribosomal protein s25-2	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,402
tr K4B989 K4B989_SOLLC	polyphenol oxidase	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,43
tr K4BBL4 K4BBL4_SOLLC	alpha-dioxygenase 1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,491
tr K4BCI5 K4BCI5_SOLLC	l-ascorbate oxidase homolog	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,941
tr K4BDU6 K4BDU6_SOLLC	histone h2ax	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,607
tr K4BDY4 K4BDY4_SOLLC	probable methyltransferase pmt3	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,403
tr K4BFU0 K4BFU0_SOLLC	14-3-3-like protein a	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,573
tr K4BIC8 K4BIC8_SOLLC	probable calcium-binding protein cml13	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,5997
tr K4BIG2 K4BIG2_SOLLC	pectinesterase 2-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,503
tr K4BJ57 K4BJ57_SOLLC	60s ribosomal protein l35a-3-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,689
tr K4BK90 K4BK90_SOLLC	60s ribosomal protein l27a-3-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,416
tr K4BKE0 K4BKE0_SOLLC	triose phosphate phosphate non-green chloroplastic-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,675
tr K4BKK9 K4BKK9_SOLLC	germin-like protein subfamily t member 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,544

Continuação da Tabela 2

tr K4BKV2 K4BKV2_SOLLC	enolase chloroplastic	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,538
tr K4BL13 K4BL13_SOLLC	atp synthase subunit mitochondrial	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,558
tr K4BL38 K4BL38_SOLLC	40s ribosomal protein s19-3	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,539
tr K4BM85 K4BM85_SOLLC	40s ribosomal protein s7	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,814
tr K4BPH8 K4BPH8_SOLLC	60s ribosomal protein l35-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,847
tr K4BSR4 K4BSR4_SOLLC	annexin d2-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,457
tr K4BU07 K4BU07_SOLLC	39s ribosomal protein l41- mitochondrial	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,928
tr K4BVU7 K4BVU7_SOLLC	Partial	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,567
tr K4BVY4 K4BVY4_SOLLC	u-box domain-containing protein 44	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,874
tr K4BW98 K4BW98_SOLLC	aldehyde dehydrogenase family 2 member mitochondrial-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,437
tr K4C239 K4C239_SOLLC	pleiotropic drug resistance protein 1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,477
tr K4C2C7 K4C2C7_SOLLC	very-long-chain enoyl- reductase	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,547
tr K4C2F8 K4C2F8_SOLLC	60s ribosomal protein l35-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,847
tr K4C2I6 K4C2I6_SOLLC	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,715
tr K4C310 K4C310_SOLLC	Glutaredoxin	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,425
tr K4C3Y3 K4C3Y3_SOLLC	nodal modulator 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,496
tr K4C5F9 K4C5F9_SOLLC	60s ribosomal protein l7a-2-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,83
tr K4C778 K4C778_SOLLC	60s ribosomal protein l7a-2-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,83
tr K4C779 K4C779_SOLLC	60s ribosomal protein l7a-2-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,83
tr K4C7C1 K4C7C1_SOLLC	t-complex protein 11	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,569
tr K4C7T0 K4C7T0_SOLLC	letm1 and ef-hand domain-containing protein anon-60da isoform 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,727
tr K4C882 K4C882_SOLLC	40s ribosomal protein s7-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,602
tr K4C8U3 K4C8U3_SOLLC	miraculin-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,495
tr K4C950 K4C950_SOLLC	60s ribosomal protein l9-1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,543
tr K4CAA1 K4CAA1_SOLLC	cationic peroxidase 1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,604
tr K4CAS8 K4CAS8_SOLLC	40s ribosomal protein s24-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,461

Continuação da Tabela 2

tr K4CB25 K4CB25_SOLLC	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 23	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,374
tr K4CB31 K4CB31_SOLLC	transmembrane 9 superfamily member 4-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,533
tr K4CBV6 K4CBV6_SOLLC	60s ribosomal protein l7-4	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1,138
tr K4CEU2 K4CEU2_SOLLC	acetyl- cytosolic 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,535
tr K4CFM5 K4CFM5_SOLLC	ketol-acid chloroplastic	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,513
tr K4CFW5 K4CFW5_SOLLC	protein stabilized1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,783
tr K4CGU3 K4CGU3_SOLLC	increased dna methylation 1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1,015
tr K4CGZ3 K4CGZ3_SOLLC	proton pump-interactor 1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,535
tr K4CH48 K4CH48_SOLLC	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14-like isoform x1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,469
tr K4CHH2 K4CHH2_SOLLC	grpe protein mitochondrial-like isoform x1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,453
tr K4CHR6 K4CHR6_SOLLC	fructose-bisphosphate cytoplasmic isozyme 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1,255
tr K4CHY3 K4CHY3_SOLLC	phosphoglycerate cytosolic	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,698
tr K4CMM7 K4CMM7_SOLLC	60s ribosomal protein l7-4	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,635
tr K4CPI7 K4CPI7_SOLLC	v-type proton atpase subunit e-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,505
tr K4CR67 K4CR67_SOLLC	histone h2a	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1,023
tr K4CUX6 K4CUX6_SOLLC	elongation factor mitochondrial	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,532
tr K4CV13 K4CV13_SOLLC	cugbp elav-like family member 5	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,787
tr K4D0U1 K4D0U1_SOLLC	glycine-rich rna-binding	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,434
tr K4D1F7 K4D1F7_SOLLC	v-type proton atpase subunit b2	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,546
tr K4D399 K4D399_SOLLC	ubiquitin-conjugating enzyme e2 variant 1d	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,554
tr K4D3B5 K4D3B5_SOLLC	40s ribosomal protein s14-2	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,613
tr K4D426 K4D426_SOLLC	udp-glucuronate decarboxylase protein 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,453
tr K4D452 K4D452_SOLLC	adenosine kinase 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,477
tr K4D4T0 K4D4T0_SOLLC	40s ribosomal protein s17	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,748
tr K4D5B4 K4D5B4_SOLLC	endoribonuclease dicer homolog 2-like isoform x1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,425
tr K4D7N0 K4D7N0_SOLLC	glucuronoxylan 4-o-methyltransferase 3-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,551
tr K4DA09 K4DA09_SOLLC	copper ion binding isoform 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,499

Continuação da Tabela 2

tr K4DA71 K4DA71_SOLLC	proteasome subunit beta type-4-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,527
tr K4DA99 K4DA99_SOLLC	major intrinsic protein 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,612
tr K4DAC6 K4DAC6_SOLLC	elongation factor 1-alpha-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,651
tr K4DB31 K4DB31_SOLLC	histone h2a	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,814
tr K4DB32 K4DB32_SOLLC	histone h2a	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,814
tr K4DB46 K4DB46_SOLLC	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex mitochondrial-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,56
tr K4DED5 K4DED5_SOLLC	kinesin-4-like isoform x1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,491
tr K4DFE6 K4DFE6_SOLLC	nadp-dependent malic chloroplastic-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,527
tr K4DH95 K4DH95_SOLLC	rop guanine nucleotide exchange factor 14	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,429
tr K4DHE3 K4DHE3_SOLLC	60s ribosomal protein l9-1-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,787
tr K4DHK7 K4DHK7_SOLLC	60s ribosomal protein l13a-4-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,459
tr K4DHW9 K4DHW9_SOLLC	udp-glucuronic acid decarboxylase 4-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,453
tr K4DI20 K4DI20_SOLLC	Calmodulin	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,624
tr O48616 O48616_SOLLC	mitogen-activated protein kinase kinase 2-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,507
tr Q152U7 Q152U7_SOLLC	multi-protein-bridging factor 1b-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1,459
tr Q152U8 Q152U8_SOLLC	multi-protein-bridging factor 1b-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1,459
tr Q152U9 Q152U9_SOLLC	multi-protein-bridging factor 1b-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1,459
tr Q4W5U7 Q4W5U7_SOLLC	calnexin homolog	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,495
tr Q8RXB7 Q8RXB7_SOLLC	tyramine n-feruloyltransferase 4 11-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,684
tr Q9LEG3 Q9LEG3_SOLLC	short-chain dehydrogenase reductase 3b-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,416

550

551

Tabela 3: Proteínas do Fol identificadas.

Acesso	Descrição da Proteína	Organismo
tr A0A0D2XXP2 A0A0D2XXP2_FUSO4	ecm29 protein	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XWK9 A0A0D2XWK9_FUSO4	g protein coupled receptor like protein	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XQZ0 A0A0D2XQZ0_FUSO4	fatty acid synthase subunit alpha	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>

Continuação da Tabela 3

tr A0A0D2X807 A0A0D2X807_FUSO4	voltage gated ca2+ channel	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XCF6 A0A0D2XCF6_FUSO4	Atpase	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XIL5 A0A0D2XIL5_FUSO4	nitrate reductase	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2Y976 A0A0D2Y976_FUSO4	iron-sulfur clusters transporter mitochondrial	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2Y032 A0A0D2Y032_FUSO4	interferon-regulated resistance gtp-binding protein	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
lcl HE956757.1_prot_CCJ06152.1_701	glucan biosynthesis protein d	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XH96 A0A0D2XH96_FUSO4	myosin-like protein	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2Y5G8 A0A0D2Y5G8_FUSO4	Mitofusin	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2X8J5 A0A0D2X8J5_FUSO4	nuclear gtp-binding protein nug1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2Y2A4 A0A0D2Y2A4_FUSO4	glycoside hydrolase family 2	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XT00 A0A0D2XT00_FUSO4	phosphatidylinositol phospholipase gamma-1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2Y7D6 A0A0D2Y7D6_FUSO4	haloacid type ii	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2YE50 A0A0D2YE50_FUSO4	polyketide synthase	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XB12 A0A0D2XB12_FUSO4	nuclear transport factor	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XUE6 A0A0D2XUE6_FUSO4	rbtmx2 protein	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XAN4 A0A0D2XAN4_FUSO4	e3 ubiquitin-protein ligase huwe1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XZP3 A0A0D2XZP3_FUSO4	nuclear matrix protein p84	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2Y2R5 A0A0D2Y2R5_FUSO4	pre-mrna-splicing factor spp42	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XUU4 A0A0D2XUU4_FUSO4	26s proteasome regulatory subunit n3	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XH38 A0A0D2XH38_FUSO4	mediator of rna polymerase ii transcription subunit 13	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XVM3 A0A0D2XVM3_FUSO4	related to lustrin a	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
g16522.t1	calcineurin subunit b-like	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
augustus-Contig101-abinit-gene-0.9-mRNA-1	bsd domain-containing protein	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XCR4 A0A0D2XCR4_FUSO4	cation exchanger	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
P20278	50s ribosomal protein l36	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
g19818.t1	4-coumarate-- ligase-like 9	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2X8I6 A0A0D2X8I6_FUSO4	e3 ubiquitin-protein ligase ubr1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2Y2S1 A0A0D2Y2S1_FUSO4	40s ribosomal protein s14	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>

Continuação da Tabela 3

tr A0A0D2XUU8 A0A0D2XUU8_FUSO4	exosome complex exonuclease rrp6	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
Phatr2 45889_estExt_fgenes1_pg.C_chr_80234	clathrin heavy chain	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
augustus-Contig94-abinit-gene-0.12-mRNA-1	phosphatidylserine decarboxylase	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
MCOS_0001000901-mRNA-1	atp synthase subunit mitochondrial	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
augustus-Contig95-abinit-gene-0.45-mRNA-1	regulator of chromosome condensation repeat-containing protein	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
MCOS_0000830201-mRNA-1	ribosomal protein l17	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2Y3J5 A0A0D2Y3J5_FUSO4	glutamyl-trna amidotransferase subunit a like protein	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2YF37 A0A0D2YF37_FUSO4	nitrate assimilation regulatory protein nira	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2XN76 A0A0D2XN76_FUSO4	zinc finger protein zas1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
tr A0A0D2Y2R2 A0A0D2Y2R2_FUSO4	cop9 signalosome complex subunit 1	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>

Figuras

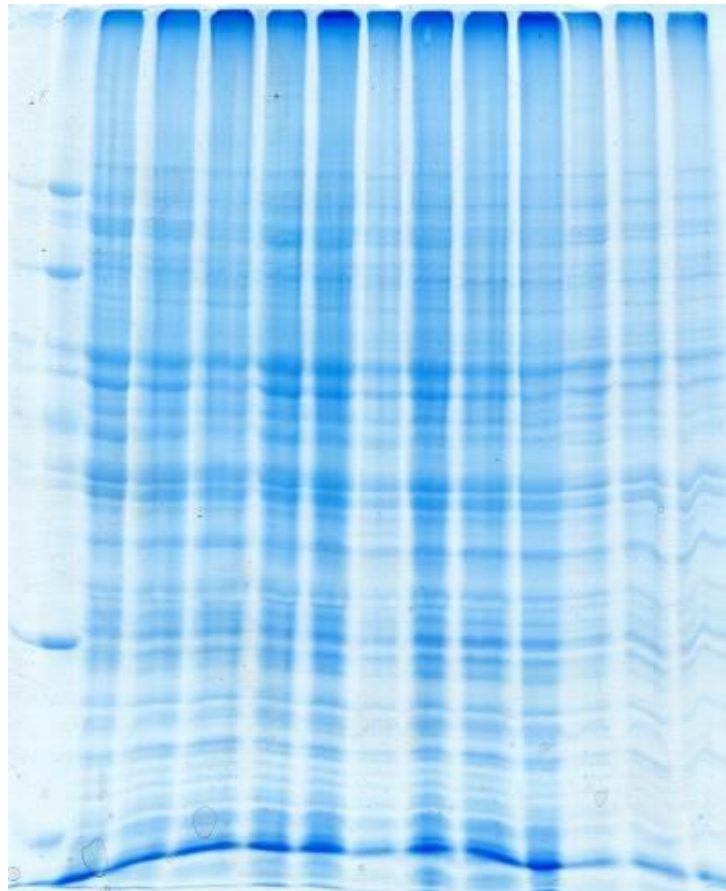


Figura 1: Gel SDS-PAGE unidimensional representativo de 100µg das proteínas totais extraídas da raiz do tomateiro coradas com Coomassie Blue R-250. **M** ã Marcador de massa molecular; **T1-T3** - Réplicas biológicas da cultivar BHRS 2,3, não inoculado; **T4-T6** ã Réplicas biológicas da cultivar Viradouro, não inoculado; **T7-T9** - Réplicas biológicas da cultivar BHRS 2,3, inoculado; **T10-T12** ã Réplicas biológicas da cultivar Viradouro, inoculado.

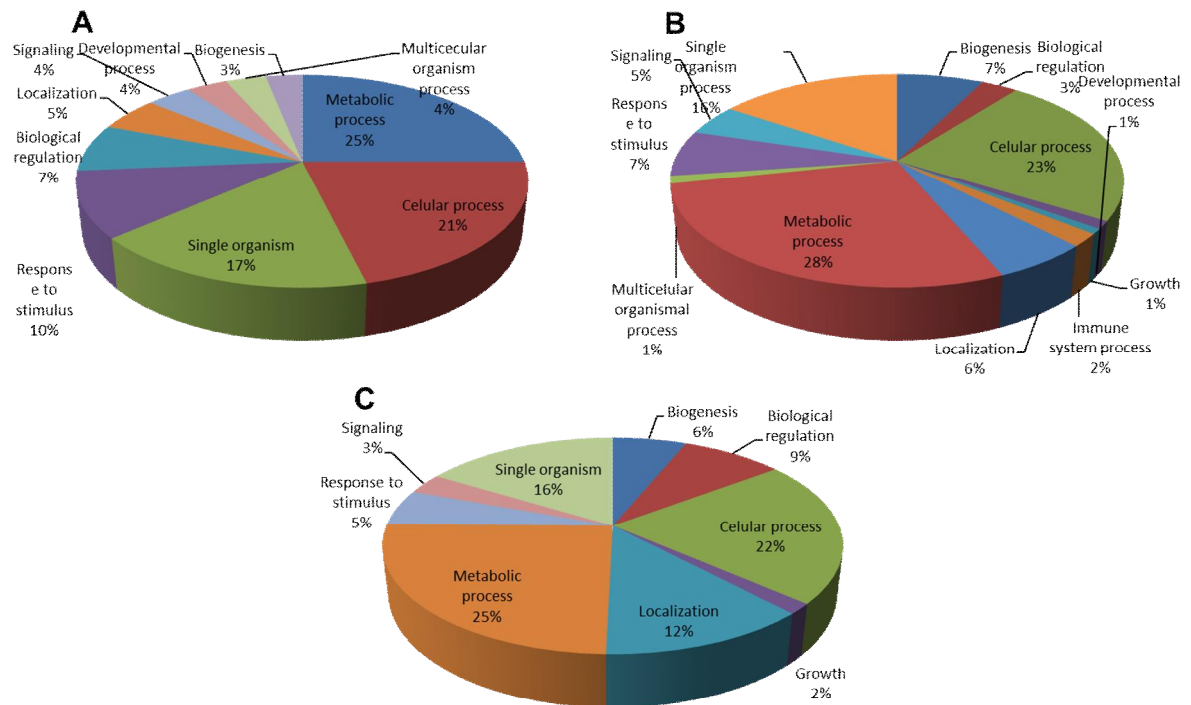


Figura 2: Distribuição da categoria processos biológicos do programa de ontologia gênica BlastGO das proteínas da cultivar de tomateiro Viradouro reguladas após a infecção com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **A** ã proteínas com expressão aumentada; **B** ã proteínas com expressão diminuída; **C** ã proteínas do fungo.

5 ARTIGO 3

Manuscrito a ser enviado ao periódico Molecular Plant-Microbe Interactions

Instrução para os autores:

http://apsjournals.apsnet.org/userimages/ContentEditor/1173402237082/mpmi_author_instructions.pdf

Estudo de proteínas de superfície do tomateiro, inoculado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* via iTRAQ e LC-MS/MS

Silva^a, T.D., Silva, M.V.^b, Pontes, A.H.^c, Sousa, M.V.^c, Fontes, W.^c, Ricart, C.A.O.^c, Reis, A.^d and Correia, M.T.S.^{b,2}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas ã Centro de Ciências Biológicas ã Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Rua Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária. CEP: 50670-901, Recife ã PE, Brasil.

^bDepartamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária. CEP: 50670-420, Recife - PE Brasil.

^cLaboratório de Química e Bioquímica de Proteínas ã Departamento de Biologia Celular ã Instituto de Ciências Biológicas ã Universidade de Brasília (UnB). Campus Universitário Darcy Ribeiro. CEP 70910-900, Brasília ã DF, Brsil

^dLaboratório de Fitopatologia ã Embrapa Hortaliças ã CNPH. Parque Estação Biológica - PqEB s/nº. CEP 70770-901, Brasília, DF ã Brasil.

²Corresponding author: M.T.S. Correia

E-mail:mtscorreia@gmail.com

Tel.: +55 81 2126 8547; fax: +55 81 2126 8576

Resumo

Com o objetivo de identificar proteínas envolvidas com o reconhecimento e sinalização da murcha de fusário, o proteoma da raiz de duas cultivares de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), BHRS 2,3 (resistente) e Viradouro (sensível), foi analisado. Plantas com 21 dias de crescimento foram inoculadas com a raça 3 do fungo, por ser a mais agressiva, e 24 horas após a inoculação, as raízes foram coletadas. As proteínas foram então extraídas, quantificadas, digeridas com tripsina, marcadas com o reagente iTRAQ, fracionadas e dessalinizadas. A separação dos peptídeos foi feita por meio do cromatógrafo Dionex 3000 e a análise das massas com o espectrômetro Orbitrap Elite. Seis proteínas foram identificadas com expressão diferencial na cultivar resistente, dentre elas a proteína de membrana remorina, conhecida como uma proteína de reconhecimento de patógenos, mas nunca antes descrita na interação tomateiro/fusário. A cultivar Viradouro não apresentou proteínas com regulação da expressão. Os resultados mostraram que a cultivar BHRS 2,3 conseguiu reconhecer o patógeno após 24 horas de contato com o Fol e proteínas envolvidas na sinalização de defesa da planta evidenciaram uma possível rede de comunicação após interação com o fungo.

Palavras chave: Tomateiro, defesa, fusário, fitopatógenos, Proteômica, iTRAQ,

58 **Introdução**

59 Doenças causadas por microrganismos são dos maiores desafios da
60 agricultura moderna. Devido a natureza agressiva da maior parte das doenças,
61 danos severos são causados as lavouras em todo mundo. Para combater
62 esses patógenos, diversas estratégias são abordadas, sendo o uso de
63 defensivos agrícolas a mais utilizada. Entretanto, agrotóxicos causam dano ao
64 meio ambiente e saúde do ser humano, além dos custos no desenvolvimento,
65 manipulação e controle, que acabam aumentando o valor do produto final.
66 Assim, a melhor alternativa para o controle de doenças é a utilização de
67 genótipos resistentes.

68 Patógenos podem ser reconhecidos pelas células vegetais através de
69 receptores de reconhecimento de padrões da membrana plasmática e
70 receptores intracelulares que reconhecem os padrões moleculares associados
71 a patógenos, *PAMPs*, em um processo chamado sistema imune inato (Souza
72 et al, 2016). Após o reconhecimento é acionada a resposta imune
73 desencadeada pelos *PAMPs* (PTI), onde são ativadas vias de defesas não
74 específicas (Monaghan and Zipfel, 2012). Entretanto, patógenos podem
75 sobrepor as defesas basais da planta, através de efetores ou proteínas e
76 virulência (*Avr*), que inativam proteínas de reconhecimento e sinalização,
77 interferem em vias de defesa ou impedem que as plantas reconheçam os
78 padrões. As plantas por sua vez, possuem receptores específicos para os
79 efetores, que quando reconhecidos, ativam a imunidade desencadeada por
80 efetores (ETI), através dos genes *R*, que é segunda linha de defesa, mais
81 específica e eficiente contra o patógeno (Dodds et al, 2006). Plantas que não
82 conseguem reconhecer os efetores são susceptíveis ao patógeno, resultando
83 em susceptibilidade desencadeada por efetores (Jones and Dangl, 2006).

84 O estudo das proteínas de reconhecimento, bem como as presentes nas
85 cascatas de sinalização é a chave para o entendimento dos mecanismos que
86 desencadeiam a PTI e a ETI. Apesar dos avanços nas redes de sinalização
87 obtidos nos últimos anos, ainda existem diversas lacunas dentro e entre as vias
88 que precisam ser preenchidos. Essas respostas podem ajudar a compreender
89 o que faz as cultivares seres sensíveis ou resistentes as doenças (Bigeard et
90 al, 2015).

Isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ) é atualmente uma das ferramentas proteômicas mais robustas, que permite a quantificação de proteínas por meio da adição de tags ao N-terminal dos peptídeos, bem como a identificação de estas proteínas oriundas de múltiplas amostras em um mesmo experimento (Chen et al, 2016). iTRAQ tem sido utilizado para quantificar proteínas envolvidas na sinalização após contato com patógenos em diversas plantas, como pinheiro (Lippert et al, 2009), batata (Lim et al, 2013), tomate (Parker, et al, 2013), pepino (Liu et al, 2015), e *Arabidopsis* (Smith et al, 2015).

O tomateiro, *Solanum lycopersicum* L. é uma das hortaliças mais cultivadas no mundo. Entretanto, um dos maiores limitantes da sua produção é o ataque de diversos patógenos (Vilela et al., 2012), em especial do fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Esta doença pode causar 100% de perda a lavoura e o fungo consegue sobreviver no solo por vários anos, através de esporos de resistência. Por isso o uso de cultivares resistentes constitui a melhor forma para sobrepor a doença (Reis and Lopes, 2012). Assim, este trabalho teve o objetivo de analisar o proteoma da raiz do tomateiro, após inoculação com o Fol, a fim de identificar proteínas de reconhecimento e sinalização reguladas, utilizando iTRAQ e LC-MS/MS, por meio do espectrômetro de massas Orbitrap Elite.

Resultados

Com o objetivo de identificar proteínas do tomateiro que estejam relacionadas com o reconhecimento e resposta inicial a infecção com o fungo Fol, raízes das cultivares sensível e resistente a doença foram coletadas 24 horas após a inoculação. Foram extraídas proteínas da parede celular e após a quantificação as proteínas foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina. Os peptídeos gerados foram marcados com o reagente iTRAQ, fracionadas, dessalinizadas e analisadas via LC-MS/MS.

Cerca de 1200 proteínas apresentaram compatibilidade com o banco de proteínas do tomateiro após a análise dos espectros. A cultivar BHRS 2,3, apresentou seis proteínas com expressão diferencial estatisticamente significativa. Destas, cinco apresentaram aumento na expressão e uma diminuição (Tabela 1). Em relação as proteínas com aumento na expressão,

destaca-se a proteína remorina, uma proteína de membrana relacionada com o reconhecimento de patógenos, que se apresentou mais de 2,5 vezes expressa. Não houve expressão diferencial de proteínas na cultivar sensível a doença.

Discussão

A parede celular é o primeiro tecido a entrar em contato com o fungo. Devido a isso, as proteínas que nela se encontram são as responsáveis por reconhecer e iniciar a sinalização para resposta e sequente controle da doença (Delteil et al. 2016). Ao se estudar o proteoma da parede celular do tomateiro, após a inoculação com o *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, pode-se identificar proteínas de superfície reguladas, 24 horas após o início da infecção.

Reconhecimento de patógeno

Remorinas são proteínas presentes em todas as plantas, fazendo parte de uma família multi gene, sendo dividida em 6 subgrupos com um C-terminal altamente conservado e um N-terminal altamente variável ao longo dos grupos. Primeiramente uma remorina foi descrita pela localização na membrana plasmática e sendo fosforilada, onde foi sugerido o desempenho na sinalização célula a célula e ligação com a defesa de plantas (Raffael et al. 2009; Jarsch and Ott. 2011; Tapken and Murphy. 2015).

Essa proteína de superfície está associada ao reconhecimento elicitores de diversos patógenos. Ela interage com flg22, elicitor bacteriano bastante conhecido (Felix, et al. 1999), também é ativada por moléculas fúngicas de quitina (Jarsch and Ott. 2011) e por xilanase fúngica (Benschop et al. 2007), sendo fosforilada e desencadeando a MAMP. Widjaja et al (2009) também relataram atuação de uma isoforma da remorina na *Effector Triggered Immunity* (ETI), após a indução dessa resposta por um efetor bacteriano. Entretanto não há relatos da sua associação com a interação tomateiro e o fungo Fol, sendo este o primeiro relato de um possível papel da remorina com o reconhecimento do fungo pela cultivar resistente a doença.

Proteínas de desenvolvimento

Proteínas de desenvolvimento como histonas H2A (Koning et al. 1991) e fator de alongação 1- U (Suhandono, Apriyanto and Ihsani. 2014) apresentaram aumento na sua expressão. Estas proteínas estão relacionadas com a divisão

celular e síntese de proteínas, e tem sua expressão aumentada em tecidos com alta taxa de desenvolvimento. Entretanto, apesar do seu papel regular na biossíntese de proteínas, já foi descrita a relação do fator de alongação 1- U , com transdução de sinal, em consequência de influencia ambiental e modificações na parede celular (Yang et al. 1993).

Transportadores de prótons

A enzima ATP sintase subunidade U é a responsável pela síntese da principal molécula de energia das células, o ATP (Allegretti et al. 2015). Esta enzima aciona diversos mecanismos de resistência a estresses bióticos e abióticos em plantas, através do transporte de prótons ou fornecendo moléculas de sinalização (Mouekouba et al. 2014). Foi observado o aumento da expressão dessa enzima na resistência das folhas de tomateiro ao mofo cinzento (Mouekouba et al. 2014).

Proteínas de resistência a estresses

A proteína *Heat shock cognate 70 kDa protein 2* é uma chaperona, e contribui para a homeostase celular, tendo sua expressão aumentada sob condições de estresse (Lee et al. 2009). O aumento da sua expressão está ligado a diversos fatores como, estresse hídrico e de temperatura, além de conferir termo tolerância e contribuir no desenvolvimento de sementes (Rao et al. 2010). O procedimento de inoculação causa grande estresse a planta, devido a retirada da planta do solo, corte de raízes, replantio, o que pode aumentar a expressão dessa proteína. Após o reestabelecimento da planta no solo a homeostase tende a ser reestabelecida e a necessidade da proteína diminui.

Nesse estudo, foi possível identificar proteínas relacionadas com o início da interação entre o tomateiro e o fusário. A proteína de remorina, descrita pela primeira vez nesse trabalho e relacionada ao reconhecimento de patógenos, na interação tomateiro-Fol, teve sua expressão aumentada. Esses resultados pederão contribuir para futuros estudos sobre a interação entre a planta e o fungo, pois indica uma possível porta de entrada para o desencadeamento dos mecanismos de defesa do tomateiro.

Materiais e Métodos

Linhagens do tomateiro e isolados do *Fusarium*

Foram utilizadas nos experimentos, as cultivares BHRS 2,3 e Viradouro resistente e sensível à murcha de fusário, respectivamente. As linhagens foram provenientes do banco de sementes da Embrapa Hortaliças ã CNPH. O isolado 314 da raça 3 do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, foi fornecido pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Hortaliças ã CNPH.

Delineamento experimental

Para produção de esporos (usados como inóculo), blocos de BDA contendo micélio fúngico foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer com o meio líquido batata dextrose (BD) e mantidos sob agitação constante a 12 horas de luz e temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) por sete dias. Após este período, a suspensão foi filtrada em gaze dupla e a concentração inicial foi estimada, com o auxílio de um hemacitômetro, e em seguida ajustada para 1×10^6 conídios $\times \text{mL}^{-1}$.

Para a semeadura das cultivares foram utilizadas bandejas de 128 células contendo substrato esterilizado (Plantmax®) e mantidas em condições de casa de vegetação em condições ambiente e com duas irrigações diárias (uma pela manhã e outra pela tarde). Após 21 dias do plantio (DAP) as mudas foram removidas da bandeja e as raízes lavadas para retirar o substrato aderido às mesmas. A porção apical das raízes foi cortada (aproximadamente 2 cm) e mergulhadas em suspensão de esporos por 3 minutos. Em seguida, as plantas inoculadas e plantas controles foram transplantadas para vasos de 1,5 L contendo uma mistura de argila, esterco bovino, areia e palha de arroz carbonizada esterilizada, após a irrigação. Após o transplante, foram adicionados 5 mL da suspensão de conídios no colo de cada plântula. As parcelas experimentais foram compostas de três vasos com quatro plantas cada, em um delineamento em blocos casualizados. Após 24 horas de inoculação, as raízes foram coletadas, lavadas com água MilliQ, pesadas e estocadas em ultrafreezer -80°C .

Extração das Proteínas

As proteínas foram extraídas segundo Feiz et al (2006), com modificações. Cinco gramas de raiz foram macerados com N₂ líquido com o auxílio de almofariz e pistilo. Ao pó foi adicionado 15% de PVPP (w/w), em seguida homogeneizado com o tampão de sacarose [0,7M Sacarose; 0,5M Tris-HCL pH8; 10mM EDTA; 4mM ácido ascórbico; 1mM PMSF; 0,4% + mercaptoetanol] e centrifugado a 13.000g por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado três vezes com solução 6% de PVP, seguida de centrifugação 13.000 por 10 min. Em seguida houveram duas extrações com tampão CaCl₂ [200mM CaCl₂; 50mM acetato de sódio] e duas extrações com solução de LiCl [3M LiCl; 50mM acetato de sódio]. Os sobrenadantes foram misturados e precipitados com Acetona 80% (v/v) +0,2% de DTT (v/w), seguida de duas lavagens com acetona 80% (v/v). As proteínas foram então quantificadas com o Qubit 2.0 (invitrogen).

Digestão das proteínas pelo método FASP

Cerca de 100 µg de proteínas foram digeridas pelo método FASP (Filter-aided sample preparation) (Wiñiewski et al. 2009) modificado, utilizando filtros com cutoff de 30 kDa. As proteínas foram lavadas com solução contendo 8 M de ureia e 0,2 M de do tampão TEAB. Em seguidas foram reduzidas com DTT e alquiladas com iodoacetoamida. Após a alquilação, foi adicionada a protease tripsina (Promega), na proporção de 1:100 µg e encubadas a 37 °C por 18h. Após esse período, os peptídeos foram eluídos e quantificados com o Qubit 2.0 (Invitrogen).

Marcação iTRAQ ã 8 plex

A marcação com iTRAQ seguiu as instruções do fabricante com pequenas modificações. Brevemente, 100 µg do digesto dessalinizado e seco de cada amostra foi ressuspenso em 30 µL de 300 mM TEAB e adicionadas a um frasco do reagente iTRAQ já ressuspenso em 70 µL de isopropanol. Os frascos já com as amostras foram agitados e incubados a temperatura ambiente por 2 horas e em seguida foram misturados na proporção de 1:1:1:1:1:1, cada frasco uma réplica biológica do experimento (113, 114, 115 ã inoculado; 116, 119, 121 ã não inoculado).

Fracionamento e Dessalinização

Foram fracionados, 30 >g de peptídeos por cromatografia de troca catiônica, utilizando o método de stage tip adaptado de Rappsilber et al (2007). O fracionamento foi realizado com gradiente salino, com acetato de amônia, as concentrações variando entre 0,25 M e 3 M, em solução contendo 20% de acetonitrila (ACN) e 0,5% de ácido acético. Cada fração foi dessalinizada por cromatografia de fase reversa, utilizando stage tip com resina C18. As amostras foram lavadas com ácido acético 0,1% e eluídas com gradiente de ACN (25%-100%), em solução com ácido acético 0,1%.

Espectrometria de massas ã LC - MS/MS

Após a dessalinização os peptídeos foram submetidos a espectrometria de massas. A cromatografia foi realizada via cromatógrafo UPLC Dyonex 3000 (Thermo Fisher Scientific), utilizando uma coluna capilar feita no laboratório, com 35 cm de comprimento, 7,5 >m de diâmetro, preenchida com partículas de C18, de tamanho 1,8 >m. Foi estabelecido fluxo de 300 >L/min para a eluição dos peptídeos, seguindo um gradiente 10 min de tampão A (0.1% ácido fórmico), seguido de 200 min, em um gradiente de 2-40% Tampão B (0,1% ácido fórmico em ACN). Cerca de 1 >g de peptídeos foi carregado em cada corrida. Após a separação por cromatografia, os peptídeos foram ionizados por electrospray, com intensidade do spray de 2,5 Kv, seguido de análise e aquisição dos picos de MS e MS/MS, no Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific), com aquisição dependente de dados, no modo top 15 (os 15 picos mais intensos no MS1 são fragmentados e levados para o MS2) utilizando resolução de 120.000, com o alcance de detecção de 300 a 1800 m/z, para MS1. Para fragmentação foi utilizado a dissociação por colisão induzida de alta energia (HCD), com a energia colisional normalizada de 30 e contagem máxima de íons para detecção selecionada para 10⁴ íons.

Análise Estatística

Os espectros foram analisados pelo programa Peaks Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions). Foram estabelecidos os filtros para confronto com o banco de dados: taxa de falsos positivos (FDR) tolerados <1%, peptídeos com carga 0 ou 1 foram retirados da análise e foram utilizados pelo menos dois peptídeos únicos para identificação dos peptídeos, que foram submetidos a comparação com o banco de peptídeos, depositados no UniPro. A estatística

da quantificação foi realizada por meio do teste t moderado (teste Limma) para proteômica (Schwammle et al. 2013), através do programa RStudio (RStudio Team. 2015), onde foi a expressão foi considerada estatisticamente regulada com o valor de $p < 0,05$.

Agradecimentos

Este trabalho teve suporte da Universidade de Brasília (UnB), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), do Banco do Nordeste (BNB), da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referencias

Allegretti M., Klusch N., Mills D. J., Vonck J., Kühlbrandt W. and Davies K M. 2015. Horizontal membrane-intrinsic α -helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase. *Nat.* 521:237-240.

Benschop J. J., Mohammed S., O'Flaherty M., Heck A. J., Slijper M. and Menke F. L. 2007. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Cel. Proteomics.* 6:1198-1214.

Bigeard, J., Colcombet, J. and Hirt, H. 2015. Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Mol. Plant* 8:521-539.

Chen, T., Zhang, L., Shang, H., Liu, S., Peng, J., Gong, W., Shi, Y., Zhang, S., Li, J., Gong, J., Ge, Q., Liu, A., Ma, H., Zhao, X. and Yuan, Y. 2016. iTRAQ-Based Quantitative Proteomic Analysis of Cotton Roots and Leaves Reveals Pathways Associated with Salt Stress. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0148487.

Delteil, A., Gobbato, E., Cayrol, B., Estevan, J., Michel-Romiti, C., Dievart, A., Kroj, T. and Morel, JB. 2016. Several wall-associated kinases participate positively and negatively in basal defense against rice blast fungus. *BMC Plant Biol.* 16:17.

Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, AM., Teh, T., Wang, CI. A. Ayliffe, M. A., Kobe, B., Ellis, J. G. 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-

- 314 gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust
315 avirulence genes. PNAS 103:8888-8893.
- 316 Feiz, L., Irshad, M., Pont-Lezica, R. F., Canut, H. and Jamet, E. 2006.
317 Evaluation of cell wall preparations for proteomics: a new procedure for
318 purifying cell walls from *Arabidopsis* hypocotyls. Plant Method. 2:1-13.
- 319 Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. and Boller, T. 1999. Plants have a sensitive
320 perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. Plant J.
321 18:265-276.
- 322 Jarsch, I. K. and Ott, T. 2011. Perspectives on Remorin Proteins, Membrane
323 Rafts, and Their Role During Plant-Microbe Interactions. Mol. Plant-Microbe
324 Interact. 24:7-12.
- 325 Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. Nature
326 444:323-329.
- 327 Koning, A. J., Tanimoto, E. Y., Kiehne, K., Rost, T. and Comai, L. 1991. Cell-
328 Specific Expression of Plant Histone H2A Genes. Plant Cell. 3:657-665.
- 329 Lee, S., Lee, D. W., Lee, Y., Mayer, U., Stierhof, YD., Lee, S., Jürgens, G. and
330 Hwanga, I. 2009. Heat Shock Protein Cognate 70-4 and an E3 Ubiquitin Ligase,
331 CHIP, Mediate Plastid-Destined Precursor Degradation through the Ubiquitin-
332 26S Proteasome System in *Arabidopsis*. Plant Cell. 21:3984-4001.
- 333 Lim S., Borza T., Peters R. D., Coffin R. H., Al-Mughrabi K. I., Pinto D. M. and
334 Wang-Pruski G. 2013. Proteomics analysis suggests broad functional changes
335 in potato leaves triggered by phosphites and a complex indirect mode of action
336 against *Phytophthora infestans*. J. Proteomics 93:207-223.
- 337 Lippert, D. N., Ralph, S. G., Phillips, M., White, R., Smith, D., Hardie, D.,
338 Gershenzon, J., Ritland, K., Borchers, C. H. and Bohlmann, J. 2009.
339 Quantitative iTRAQ proteome and comparative transcriptome analysis of
340 elicitor-induced Norway spruce (*Picea abies*) cells reveals elements of calcium
341 signaling in the early conifer defense response. Proteomics 9:350-367.
- 342 Liu, HW., Liang, CQ., Liu, PF. Luo, LX. and Li, JQ. 2015. Quantitative
343 proteomics identifies 38 proteins that are differentially expressed in cucumber in
344 response to cucumber green mottle mosaic virus infection. Virol. J. 12:216.

- 345 Monaghan, J. and Zipfel, C. 2012. Plant pattern recognition receptor complexes
346 at the plasma membrane. *curr. opin. plant. biol.* 15:349-357.
- 347 Mouekouba, L. D. O., Zhang, L., Guan, X., Chen, X., Chen, H., Zhang, J.,
348 Zhang, J., Li, J., Yang, Y. and Wang, A. 2014. Analysis of *Clonostachys rosea*-
349 Induced Resistance to Tomato Gray Mold Disease in Tomato Leaves. *PLoS*
350 *ONE.* 9:e102690.
- 351 Parker, J., Koh, J., Yoo, MJ., Zhu, N., Feole, M., Yi, S. and Chen, S. 2013
352 Quantitative proteomics of tomato defense against *Pseudomonas syringae*
353 infection. *Proteomics* doi:10.1002/pmic.201200402.
- 354 Raffaele S., Bayer, E., Lafarge, D., Cluzet, S., Retana, S. G., Boubekour, T.,
355 Leborgne-Castel, N., Carde, JP., Lherminier, J., Noirot, E., Satiat-Jeunema, B.,
356 Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Ott, T., Maule, A. J. Reymond, P., Simon-
357 Plas, F., Farmer, E. E., Bessoule, JJ. and Mongrand, S. 2009. Remorin, a
358 Solanaceae Protein Resident in Membrane Rafts and Plasmodesmata, Impairs
359 Potato virus X Movement. *The Plant Cell* 21:1541-1555.
- 360 Rao, J. L. U. M., Reddy, P. S., Mishra, R. N., Gupta, D., Sahal, D., Tuteja, N.,
361 Sopory, S. K. and Reddy, M. K. 2010. Thermo and pH stable ATP-independent
362 chaperone activity of heat-inducible Hsp70 from *Pennisetum glaucum*. *Plant*
363 *Signal. Behav.* 5:110-121.
- 364 Rappsilber, J., Mann, M. and Ishihama, Y. 2007. Protocol for micro-purification,
365 enrichment, pre-fraction. and storage of peptides for proteomics using
366 StageTips. *Nat. Protoc.* 2:1896ñ1906.
- 367 Reis A. and Lopes C.A. 2012. Doenças causadas por fungos e distúrbios
368 fisiológicos. In: *Produção de tomate para processamento industrial* (Clemente,
369 F.M.V.T. and Boiteus, L.S. eds). pp. 179ñ202. Brasília, DF: Embrapa.
- 370 RStudio Team. 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc.,
371 Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- 372 Schwämmle, V., León, I. R. and Jensen, O. N. 2013. Assessment and
373 Improvement of Statistical Tools for Comparative Proteomics Analysis of
374 Sparse Data Sets with Few Experimental Replicates. *J. Proteome Res.*
375 12:3874-3883.

- 376 Smith S. J., Kroon J. T., Simon W. J., Slabas A. R. and Chivasa S. 2015. A
 377 Novel Function for *Arabidopsis* CYCLASE1 in Programmed Cell Death
 378 Revealed by Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ)
 379 Analysis of Extracellular Matrix Proteins. Mol. Cell. Proteomics 14:1556-1568
- 380 Souza, E. M., Granada, C. E. and Sperotto, R. A. 2015. Plant Pathogens
 381 Affecting the Establishment of Plant-Symbiont Interaction. Front. Plant Sci. 7:15.
- 382 Stotz, H. U., Mitrousis, G. K., Wit, P.J. G. M. and Fitt, B. D. L. 2014. Effector-
 383 triggered defence against apoplastic fungal pathogens. Trends Plant Sci.
 384 19:491-500.
- 385 Suhandono, S., Apriyanto, A. and Ihsani, N. 2014. Isolation and
 386 Characterization of Three Cassava Elongation Factor 1 Alpha (MeEF1A)
 387 Promoters. PLoS ONE 9:e84692.
- 388 Tapken, W. and Murphy, A. S. 2015. Membrane nanodomains in plants:
 389 capturing form, function, and movement. J. Exp. Bot. 66:1573-1586.
- 390 Vilela N. J., Melo P. C. T., Boiteux L.S. and Clemente F. M. V. T. (2012). Perfil
 391 socioeconômico da cadeia agroindustrial no Brasil. In: Produção de tomate
 392 para processamento industrial (Clemente, F.M.V.T. and Boiteux, L.S. eds). pp.
 393 17-27. Brasília, DF: Embrapa.
- 394 Widjaja, I., Naumann, K., Roth, U., Wolf, N., Mackey, D., Dangl, J. L., Scheel,
 395 D. and Lee, J. 2009. Combining subproteome enrichment and Rubisco
 396 depletion enables identification of low abundance proteins differentially
 397 regulated during plant defense. Proteomics 9:138-147
- 398 Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N. and Mann, M. 2009. Universal
 399 sample preparation method for proteome analysis. Nat. Method. 6:359-362.
- 400 Yang, W., Burkhardt, W., Cavallius, J., Merrick, W. C. and Boss, W. F. 1993.
 401 Purification and Characterization of a Phosphatidylinositol 4-Kinase Activator in
 402 Carrot Cells. J. Biol. Chem. 268:392-398.
- 403

404 **Tabelas**

405

406 **Tabela 1:** Proteínas da cultivar BHRS 2,3, reguladas após 24 horas de infecção

407 com o Fol.

Acesso	Descrição da Proteína	Organismo	log10 Controle/Infectado
tr Q9XEX8 Q9XEX8_SOLLC	Remorin 1	<i>Solanum lycopersicum</i>	1,293970428
tr K4DAC6 K4DAC6_SOLLC	Elongation factor 1-alpha	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,899020563
tr K4CAR4 K4CAR4_SOLLC	Histone H2A	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,806427568
tr K4DBM0 K4DBM0_SOLLC	Histone H2A	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,806427568
tr K4D7X4 K4D7X4_SOLLC	ATP synthase subunit alpha	<i>Solanum lycopersicum</i>	0,603860536
tr K4D473 K4D473_SOLLC	Heat shock cognate 70 kDa protein 2	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0,783017322

408

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que diversos mecanismos estão envolvidos na defesa do tomateiro contra o fungo *Fusarium Oxysporum* f. sp. *lycopersici*, entretanto esses mecanismos são padrão de defesa contra patógenos, logo outras características conferem a cultivar BHRS 2,3 a característica de resistente a doença;

O fusário parece estar influenciando biologia da cultivar Viradouro, impedindo que a planta reconheça sua presença e induzindo a diminuição das proteínas relacionadas a defesa. Mas ainda assim, alguns mecanismos, como a reação de hipersensibilidade puderam ser observadas, indicando resposta da planta, ainda que não seja suficiente para debelar a infecção.

A proteína de reconhecimento de patógenos remorina, encontrada mais de duas vezes e meia expressa na cultivar BHRS 2,3, nunca antes havia sido descrita na interação do tomateiro com o fusário, embora já seja bem descrita em estudos de resistência de outras cultivares a patógenos. Esta proteína pode ser a chave para a rápida resposta do genótipo resistente a doença e seu eficiente controle do fungo.

7 ANEXO I

Artigos publicados durante o doutorado

ALMEIDA. C. M. A., SILVA T. D., MALAFAIA, C. B., AMARAL, D. O. J., ARRUDA, I. R. S., BRITO, G. G., DONATO, V. M. T. S., SILVA, M.V., CORREIA, M. T. S. Proteomic and physiological analysis of response to water deficit in sugarcane. Wudpecker **Journal of Agricultural Research**. v.2, p.1-7, 2013.

CARVALHO, A. S., SILVA, M. V., GOMES, F. S., PAIVA, P. M. G., MALAFAIA, C. B., SILVA, T. D., VAZ, A. F. M., SILVA, A. G., ARRUDA, I. R. S., NAPOLEÃO, T. H., CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G., CORREIA, M. T. S. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.75, p.402 - 408, 2015.

CAVALCANTI, D. R., MALAFAIA, C. B., SILVA T. D., SANTOS, B. S., CALAZANS, G. M. T., SILVA, M.V. Protein extraction method for the proteomic study of *Zymomonas mobilis* during production of ethanol and levan. **Genetics and Molecular Research**. v.14, p.14406 - 14421, 2015.

GUERRA, M. L., MALAFAIA, C. B., SILVA T. D., MARIANO, R. L. R., SILVA, M.V., SOUZA, E. B. Two-dimensional profiling of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* proteins extracted by four different methods. **African Journal of Biotechnology**. v.13, p.3531 - 3537, 2014.

MALAFAIA, C. B., SILVA T. D., AMARAL, D.O.J., ALMEIDA. C. M. A., Silva, M.L.R.B., CORREIA, M. T. S., SILVA, M.V. Evaluation of the Resistance and Differential Induction of Chitinases in Tomato in Response to Inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of Plant Physiology & Pathology** v.1, p.1 - 6, 2013.

SILVA, N. A. ALBUQUERQUE, C. M. R.; MARINHO, A. D.; JORGE, R. J. B. ; SILVA NETO, A. G.; MONTEIRO, H. S. A.; SILVA, T. D.; SILVA, M. V. ; CORREIA, M. T. S.; PRACIANO, T. P.; MARTINS, A. M. C.; MENESES, D. B.; XIMENES, R. M.; MARTINS, R. D. Renal Effects of *Tityus stigmurus* (Thorell 1876) (Scorpiones: Buthidae) Venom in Isolated Perfused Rat Kidneys. **Anais da Academia Brasileira de Ciências (Impresso)**, 2015.