



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

TÚLIO DIEGO DA SILVA

ANÁLISE DO PERFIL PROTÉICO EM RAIZ DE TOMATEIRO SUBMETIDO À
INOCULAÇÃO COM *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Recife, 2012

TÚLIO DIEGO DA SILVA

**ANÁLISE DO PERFIL PROTÉICO EM RAIZ DE TOMATEIRO SUBMETIDO À
INOCULAÇÃO COM *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

**Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências
Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.**

**Profª Drª Maria Tereza dos Santos Correia
Orientadora**

**Profª Drª Márcia Vanusa da Silva
Co-orientadora**

Recife, 2012

**Catálogo na fonte
Elaine Cristina
CRB 1728**

Silva, Túlio Diego da

Análise do perfil protéico em raiz de tomateiro submetido à inoculação com *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*/ Túlio Diego da Silva. – Recife: O Autor, 2012.

49 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadora: Márcia Vanusa da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2012.

Inclui bibliografia

- 1. Murcha de fusarium do tomate 2. Melhoramento genético**
- 3. Biotecnologia I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Silva, Márcia Vanusa da (coorientadora) III. Título**

TÚLIO DIEGO DA SILVA

**ANÁLISE DO PERFIL PROTÉICO EM RAIZ DE TOMATEIRO SUBMETIDO À
INOCULAÇÃO COM *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici***

**Dissertação de Mestrado 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 Mestre em
Ciências Biológicas, área de concentração:
Biotecnologia.**

Data da Aprovação _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA
Departamento de Bioquímica – UFPE

Profa. Dra. PATRÍCIA MARIA GUEDES PAIVA
Departamento de Bioquímica – UFPE

Dra. MARIA LUIZA RIBEIRO BASTOS DA SILVA
Laboratório de Genoma – IPA

Recife, 2012

"Nossas ações definem o nosso legado"
(Star Wars)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade da existência e por me guiar no caminho certo;

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

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 Carolina Malafaia, até então, aquela que cuida de mim, por todo carinho, amor, atenção e me manter focado no que é importante;

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 e Felipe Ferreira, por sempre estarem ao meu lado e me mostrarem o valor da amizade verdadeira;

À Kátia Perereira e Karollina Lopes, pela sua amizade sincera e por todas as conversas sobre os assuntos da vida;

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

Ao Laboratório de Genoma/IPA, por ter me recebido e proporcionado o andamento do trabalho;

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 do começo da minha carreira na pesquisa;

RESUMO

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é uma das principais hortaliças de valor econômico no mundo e é a segunda solanácea mais cultivada, sendo superada apenas pela batata. Essa espécie está sujeita a várias doenças que comprometem seu desenvolvimento, dentre elas está a murcha de fusário, causada pelo fungo de solo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). Para esta doença o controle químico não é eficiente, assim o uso de cultivares resistentes representa um dos melhores recursos para evitar o prejuízo causado pelo fungo. A proteômica é uma grande ferramenta no estudo de diversos estresses, permitindo a identificação de proteínas alvo no melhoramento genético, a fim de se obter genótipos resistentes. Neste contexto, analisou-se o perfil das proteínas secretadas pelo tomateiro frente ao Fol, para se identificar aquelas que estejam relacionadas com a defesa ao fitopatógeno. Para isso utilizou-se o genótipo BHRS, resistente a isolados da raça 2 do Fol. Coletou-se o tecido radicular da planta, nos tempos 1, 2, 4 e 6 dias após inoculação (DAI). Em seguida as proteínas totais foram extraídas, solubilizadas e separadas por eletroforese bidimensional (2-DE), para posterior identificação via espectrometria de massas. As proteínas do tomateiro apresentam um caráter ácido, não apresentando boa resolução na faixa de pH 3-10. Por isso utilizou-se tiras de pH 4-7 na primeira dimensão da 2-DE. Pode-se reconhecer aproximadamente 500 proteínas diferentes em cada gel e 34 proteínas com expressão diferenciada no experimento. Estas proteínas foram analisadas pelo espectrômetro do tipo MALDI-TOF/TOF. As proteínas identificadas foram agrupadas de acordo com os grupos funcionais, para melhor descrever seu papel no metabolismo durante a infecção. Encontraram-se proteínas relacionadas com patogenicidade e relacionadas com a reação de hipersensibilidade. Também foram encontrados proteínas de sinalização, relacionadas com outros mecanismos de defesa e de metabolismo primário. A presença de grupos protéicos relacionados com a resistência a patógenos evidencia alguns dos mecanismos que confere ao genótipo de tomateiro BHRS a qualidade de resistente a fusariose. Entretanto mais estudos são necessários, principalmente nas proteínas de membrana e parede celular, a fim de obter informações sobre a interação inicial entre a planta e o fungo.

Palavras chave: *Solanum lycopersicum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Expressão diferencial, Proteômica

ABSTRACT

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most valuable vegetables in the world and is the second most cultivated solanaceous, exceeded only by potatoes. This species is subject to several diseases that hinder its development, and among them is the Fusarium wilt, caused by the soil fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). For this disease chemical control is not efficient, so the use of resistant cultivars is one of the best resources to prevent the damage caused by the fungus. Proteomics is a major tool in the study of various stresses, allowing the identification of target proteins in plant breeding in order to obtain resistant genotypes. In this context, we analyzed the profile of proteins secreted by tomato against the Fol, to identify those that are related to defense against the pathogen. For this we used the genotype BHRS, resistant to isolates of Fol race 2. The root tissue was collected from the plant, at 1, 2, 4 and 6 days after inoculation (DAI). Then the total proteins were extracted, solubilized and separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE) for further identification by mass spectrometry. The tomato proteins have an acidic character, did not show good resolution in the pH range 3-10. Therefore we used strips pH 4-7 in the first dimension of 2-DE. About 500 different proteins could be recognized in each gel and 34 proteins with differential expression in the experiment. These proteins were analyzed by the mass spectrometer of the type MALDI-TOF/TOF. The identified proteins were grouped according to the functional groups to better describe their role in the metabolism during infection. We found proteins related to pathogenicity and related hypersensitivity reaction. Also found signaling proteins related to defense mechanisms and primary metabolism. The presence of protein groups related to resistance to pathogens shows some of the mechanisms which give to the genotype of tomato BHRS the quality resistant to Fusarium wilt. However more studies are needed, especially in membrane proteins and cell wall in order to obtain information about the initial interaction between plant and fungus.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Differential Expression, Proteomics

LISTA DE FIGURAS

	Pág
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 proteome with IEF / SDS-PAGE and pl 4-7 linear 220-10 kDa molecular mass	48
Figura 2: “Zoom in” of the areas of the 2-D gels showing spots of proteins differentially expressed. The panels show the spots of the plant healthy, B show the spots of plants inoculated with <i>F. oxysporum</i> . The spot's numbers are according to the numbers used in Table 1	48

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1: List of root proteins that are differentially regulated in the BHRS tomato genotype after challenge with <i>F. oxysporum</i> .	49

LISTA DE ABREVIATURAS

2-DE	Eletroforese bidimensional
ACN	Acetonitrila
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Bovine serum albumin/Albumina sérica bovina
CHAPS	3-[(3cholamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanesulfonato
CHCA	ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
DAI	Dias após a inoculação
DTT	Ditiotreitol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária
f. sp.	<i>Formae specialis</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
Fol	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
GRP	Glicine rich protein/Proteína rica em glicina
GST	Glutathione S transferase
HSP	Heat shock protein/Proteína relacionada a choque por calor
IBGE – SIDRA	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema de recuperação automática
IPA	Instituto Agronomico de Pernambuco
LeMir	<i>Lycopersicon esculentum</i> miraculina
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization/Dissorção e ionização a laser assistida
MCP	Morte celular programada
MS	Mass spectrometry/Espectrometria de massas
NDPK	Nucleoside diphosphate kinase/Nucleosídeo difosfato quinase
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis/Eletroforese em gel de poliacrilamida
PMF	Peptide mass fingerprint/Impressão digital da massa do peptídeo

PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
RH	Reação de hipersensibilidade
ROS	Reactive oxygen species/Espécie reativa de oxigenio
RP	Relacionadas a patogênese
SDS	Sodium dodecyl sulfate/Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TFA	Trifluoroacetic acid/Ácido trifluorácetico
TOF	Time of flight /Tempo de vôo
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UV	Ultra violeta

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Tomateiro	13
1.2 Fusariose	15
1.3 Interação planta – patógeno e resistência	17
1.4 Proteômica	19
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. Referências bibliográficas	23
CAPÍTULO I	
Analysis of protein profile of the root of tomato infected with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	32
ABSTRACT	33
INTRODUCTION	34
MATERIAL AND METHODS	35
Tomato line and <i>Fusarium oxysporum</i> isolate	35
Experiment design	35
Protein extraction	35
Two-dimensional electrophoresis (2-DE) and image analysis	36
Protein analysis by MALDI-TOF/TOF MS	37
MS data analysis	37
RESULTS	38
Protein Analysis	38
Protein regulation in the tomato root	38
DISCUSSION	39
Expression of defense mechanisms	39

Proteins associated with metabolism and regulation	41
CONCLUSION	42
ACKNOWLEDGEMENTS	42
REFERENCES	43
FIGURES	48
TABLE	49

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 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 dicotiledônia, pertencente à família Solanaceae, gênero *Solanum*. 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, suculento 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). 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 a indústria de molhos e extratos, utilizados na culinária de todo o mundo. Recentemente, a demanda por tomate foi reforçada pela busca de alimentos mais saudáveis, favorecendo também o crescimento do mercado do produto fresco. O tomate é um alimento funcional devido aos altos teores de vitaminas A, B e C, além de ser rico em licopeno, antioxidante que ajuda na prevenção de cânceres relacionados ao aparelho digestivo e próstata (MELO, 2003; CARVALHO; PAGLIUCA, 2007).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação na safra de 2009/2010 a produção mundial de tomate chegou a aproximadamente

153 milhões de toneladas numa área plantada com cerca de 4,6 milhões de hectares, dando a cultura a 11^a posição no ranking mundial dos alimentos mais produzidos. O Brasil ocupa a posição de nono lugar na lista dos maiores produtores dessa hortaliça (FAO, 2011), com uma área plantada de 700 mil hectares, produzindo mais de 4,1 milhões toneladas do fruto na safra de 2009 (IBGE – SIDRA, 2011).

A região nordeste do Brasil representou aproximadamente 15% da produção nacional de tomate em 2009/2010, Pernambuco sendo o segundo colocado desta região, ficando atrás apenas da Bahia. A nível nacional, Pernambuco encontra-se em oitavo. Sua produção representa cerca de 3,6% da produção nacional com safra de 165 mil toneladas, numa área de 4.020 hectares no ano de 2009. A maior parte do tomate é plantado nas regiões agreste e sertão, onde gerou uma receita de aproximadamente R\$100 milhões (IBGE – SIDRA, 2011).

Entretanto a produção do tomate é severamente comprometida devido aos vários patógenos que acometem a cultura, causadas por bactérias, fungo, 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).

O tomate também apresenta um grande potencial científico, devido a sua grande distribuição mundial, que tem sido limitada pelo contato com diversas espécies de patógenos. Esse grande número de organismos infectantes possibilita que o tomate seja uma planta modelo no estudo da interação planta-patógeno, onde associando-se ao fato de que o genoma do tomate já está em processo de sequenciamento 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 como ele é cultivado em todo mundo, acabou ganhando vários patógenos específicos para cada região, permitindo assim que cada país possa estudar a interação do tomate com os organismos nativos (ARIE et al., 2007).

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 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*). 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).

1.2 Fusariose

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), ou *Fusarium* 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 que necessitam ser claramente definidas e separadas de maneira adequada (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 f. sp. *lycopersici* (*Fol*) 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., muito

embora possa afetar outras solanáceas ornamentais, malváceas e gramíneas (VALE et al., 2000).

Na infecção, os clamidósporos germinam sobre as raízes da planta e o tubo germinativo resultante deste processo penetra diretamente a superfície vegetal ou ganha o interior da planta através de ferimentos. Após ocorrer a adesão de hifas nas células epidermais e corticais do hospedeiro, estas são penetradas por hifas constrictas que causam degradação local da parede celular (BECKMAN, 1987; SOUZA, 2009). A penetração ocorre mais freqüentemente através das extremidades de raízes, onde aberturas naturais na parede celular ou ferimentos provocados pelo atrito das raízes com o solo provêm uma entrada para o tecido vascular em desenvolvimento. No entanto, o que determina o sucesso ou não da penetração do hospedeiro e o desenvolvimento da murcha vascular é o balanço entre os mecanismos de resistência do hospedeiro e os mecanismos de ataque do fungo (TOYODA et al., 1988). 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).

Os sintomas da murcha de fusário do tomateiro iniciam-se pelas folhas basais que perdem a turgidez, tornam-se amareladas, apresentam crestamento do limbo e, finalmente, caem. Quando se corta transversalmente a raiz ou o caule de uma planta doente, pode-se observar o típico escurecimento de vasos, que evidencia a presença do patógeno (NELSON, 1981). O escurecimento dos tecidos vasculares infectados é mais intenso na base do caule sendo uma característica marcante, embora não exclusiva da doença. A planta quando infectada também pode apresentar crescimento retardado. Com a morte da planta, novamente, clamidósporos são produzidos e permanecem dormentes até que as condições sejam favoráveis ao seu desenvolvimento (LOPES et al., 2005).

As medidas preconizadas para o controle da murcha de fusário em tomateiro envolvem o uso de cultivares resistentes, manipulação da fertilidade do solo, impedir a drenagem de água de local infestado para novas áreas de plantio, permitir que o solo repouse antes do plantio, uso da rotação de culturas com plantas não

hospedeiras por cinco a sete anos, prevenir a disseminação do patógeno eliminando o movimento de solo infestado, bem como o trânsito de máquinas, animais e operários de lavouras doentes para áreas livres da doença, eliminar os restos culturais diminuindo, assim, o inóculo inicial para o próximo ciclo da cultura (BECKMAN, 1987; JONES, 1991; LOPES; SANTOS, 1994).

Entretanto, utilização de cultivares resistentes tem se revelado como a única alternativa viável para o controle da murcha de fusário, embora apresente algumas dificuldades. Pois induzem, o surgimento de raças mais virulentas do fungo, 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, 1981).

1.3 Interação planta – patógeno e resistência

Fitopatógenos necessitam de seus respectivos hospedeiros para ter a sobrevivência garantida. Nesse sentido a maioria dos patógenos retira seus nutrientes do hospedeiro e utilizam no seu próprio metabolismo para desempenhar atividades vegetativas e reprodutivas. Entretanto, muitos desses nutrientes encontram-se no interior do protoplasma das células vegetais e, para ter acesso aos mesmos, o patógeno necessita vencer as barreiras físicas ou químicas do hospedeiro, bem como promover a colonização interna dos tecidos a partir do sítio de infecção (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Normalmente essa infecção se caracteriza pela desagregação celular e pela utilização de nutrientes. Dessa maneira, para um patógeno infectar uma planta, é necessário que o mesmo consiga penetrar e colonizar os tecidos do hospedeiro, retirar os nutrientes necessários para sua sobrevivência, bem como neutralizar as reações de defesa da planta. Para isso, utiliza-se de compostos tais como: enzimas, toxinas e hormônios (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

O sucesso dos patógenos em atravessar a primeira barreira de defesa depende do grau de co-evolução da relação patógeno-hospedeiro (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). Os patógenos podem atravessar estas defesas de duas maneiras: pelas aberturas estomáticas presentes no caule e folhas ou mediante

estruturas de penetração, tal o caso de fungos, que introduzem uma hifa especializada em perfuração através das epidermes (HOLT et al., 2003).

A planta, ao ser invadida por um patógeno, pode desencadear uma série de mecanismos de defesa na tentativa de conter o agente agressor. As plantas possuem fatores estruturais e bioquímicos pré-existentes (passivos, constitutivos) que estão envolvidos no processo de resistência antes da infecção pelo patógeno como cutícula, tricomas, estômatos, fibras e vasos condutores, fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, fitotoxinas e inibidores protéicos. Após a infecção, pode aumentar o nível de compostos de defesa pré-existentes nas plantas ou ocorrer a ativação de outros mecanismos de resistência (pós-formados) que são sintetizados e acumulados nos tecidos do hospedeiro como as proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), fitoalexinas, calose, lignina, papilas, camadas de cortiça e tiloses (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Quanto mais rápida e mais completa for essa resposta, maior o nível de resistência da planta a esse patógeno.

Em cultivares de tomateiro tem sido identificada resistência dos tipos horizontal e vertical a *Fol*. A resistência horizontal ou poligênica é representada pela tolerância; o patógeno invade o hospedeiro, produz os sintomas clássicos, mas não impede a planta de produzir. A resistência vertical ou monogênica impede o crescimento e a reprodução do patógeno, resultando em um incisivo declínio da sua população, na ausência de fase saprofítica e de sobrevivência na rizosfera de raízes de hospedeiros assintomáticos (SHEW; SHEW, 1994).

As plantas de tomateiro resistentes ao *Fol* raça 1, apresentam resistência a doença controlada por um gene designado gene I-1. Este gene já era trabalhado por melhoristas, que permitiu o desenvolvimento de variedades de tomateiro resistentes à doença. Estudos verificaram que as plantas de tomateiro que apresentavam o gene de resistência I-1 permitiram o cultivo destas variedades 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.

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 estão cada vez mais realizados, mas ainda estão longe da elucidação desses fenômenos (REIS et al., 2005).

1.4 Proteômica

As avaliações da expressão gênica em nível do transcriptoma podem fornecer informações importantes sobre a carga genética transcrita de um organismo em um determinado momento (AMARAL et al, 2008); entretanto, ela não reflete diretamente a expressão das proteínas (GYGI et al, 1999). Após a transcrição, podem ocorrer modificações pós-transcricionais e pós-traducionais, com alteração da conformação espacial de proteínas, e que resultam em classes protéicas que bioquímica e estruturalmente podem desempenhar diferentes funções metabólicas (CHEN; HARMON, 2006).

A proteômica, estudo sistemático em larga escala das proteínas (proteoma) de um determinado tecido ou organismo, tem o objetivo de fornecer informações detalhadas sobre a estrutura e a função dessas proteínas nos diferentes sistemas biológicos, permitindo ainda verificar se existe correlação entre o nível de expressão dos mRNA e das proteínas e a ocorrência de isoformas gênicas (VAN WIJK, 2001; AEBERSOLD; MANN, 2003).

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). 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).

Uma das principais técnicas no estudo de proteômica é a eletroforese bidimensional (2-DE), que consiste na separação das proteínas sob duas etapas, a primeira separa as proteínas pelo seu ponto isoelétrico, pH onde as proteínas possuem carga nula, e a segunda etapa é uma eletroforese em géis de poliacrilamida, onde as proteínas são separadas de acordo com a massa molecular. Esta técnica foi desenvolvida em 1975 e até hoje constitui um dos melhores resultados, pois separa as proteínas com uma boa resolução que facilita as análises, além do baixo custo quando comparada com outras técnicas mais sofisticadas (GORG et al., 2000, CARRET et al, 2006).

Entretanto a eletroforese bidimensional possui suas limitações, como baixa sensibilidade de detecção de proteínas em baixa concentração, pouca representação das proteínas hidrofóbicas e problemas na resolução de spots das proteínas com massas moleculares e pontos isoelétricos parecidos. Estas dificuldades estão sendo cada vez mais superadas, com o aumento do número de repetições dos géis, análises mais minuciosas uso de faixas de pH mais estreitas e aplicação de protocolos mais específicos para recuperação das proteínas com baixa solubilidade (GORG et al., 2000, SANTONI et al., 2000, GORG et al., 2004). Além disso, o uso de compostos fluorescentes em novas tecnologias de 2-DE, que possibilitam a detecção de proteínas em baixíssima concentração e softwares de análise de imagens dos géis cada vez mais completos proporcionam resultados que permitem uma melhor abordagem na interpretação dos dados (PANDEY; MANN, 2000; PATTERSON; AEBERSOLD, 2003; TANNU; HEMBY, 2006; VISWANATHAN et al., 2006).

Posteriormente a aquisição e análise das imagens dos géis, parte-se para identificação das proteínas, que se inicia com a digestão enzimática (OLSEN et al., 2004). Os peptídeos são analisados, fragmentados e analisados em um espectrômetro de massas, gerando espectros do tipo MS/MS (espectrometria de massas em tandem), os quais são utilizados nas buscas em bancos de dados. Os

programas utilizados na busca de dados baseiam-se na comparação entre o padrão de fragmentação teórico de uma proteína e o espectro de fragmentação obtido experimentalmente. A estratégia de identificação por MS/MS, que permite a determinação experimental de aminoácidos, é mais precisa do que a identificação de proteínas baseada somente na comparação entre as massas dos fragmentos tripticos, chamada de “*peptide mass fingerprinting*” (PMF) (CHEN; HARMON, 2006). Alternativamente, os espectros do tipo MS/MS também permitem buscas por similaridade de sequências entre organismos próximos, através da reconstrução da sequência de aminoácidos manual ou automaticamente. Essa estratégia é muito interessante quando o organismo estudado possui baixa representatividade nos bancos de dados (CHEN; HARMON, 2006).

Com isso, a proteômica tem sido usada no estudo de vários organismos com diversos propósitos, como análise do perfil protéico para correlação filogenética, resposta a diversas condições fisiológicas, doenças, estudo das proteínas de membrana para resolução das interações proteína-proteína, estudo de isoformas, detecção de modificações pós-traducionais, proteoma mitocondrial e nuclear (LIEBLER, 2002).

Nas plantas ainda se tem estudado as rotas metabólicas da fotossíntese, funcionamento dos cloroplastos, a identificação das proteínas da parede celular e suas comunicações, principalmente durante infecções e outros tipos de estresses, as proteínas do xilema e floema, a seiva e seus constituintes e interações, como nódulos e micorrizas (PARK, 2004).

Apesar da importância da murcha de fusário na produção do tomate pouco se sabe sobre as proteínas envolvidas nos mecanismos moleculares de combate e prevenção a doença que possam contribuir para o melhoramento genético das variedades de importância econômica. Sendo assim são necessários estudos proteômicos da interação tomate – fusário, visando identificação de genes chave na defesa contra a doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência do tomateiro ao *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), visando confirmar a participação de genes candidatos ao melhoramento genético.

2.2 Objetivos específicos

- **Analisar o perfil de proteínas totais secretadas pelo tomateiro resistente BHRS frente à inoculação com *Fol*;**
- **Identificar proteínas envolvidas na defesa do tomateiro contra *Fol* o fitopatógeno por espectrometria de massas.**

3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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.

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

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.

AMARAL, D.O.J. et al. Differential gene expression in tomato induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 43, n. 8, p.1017-1023, 2008.

ANDRADE, D.E.G.T.; SOUZA, L.T.; ASSIS, T.C. murcha-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.

CARRETTE, O. et al. State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. Nature Protocols. v. 1, p. 812-824, 2006.

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.

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

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.

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.

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

FAO – FAOSTAT - Agricultural Statistics Database. [online]. Home: World Agricultural Information Centre, 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 14 jul. 2011.

FILGUEIRA, F.A.R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 2. ed. Viçosa: UFV, 2003. p. 193–214.

GORG, A. et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. v. 21, p.1037-1053, 2000.

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

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

GYGI, S.P. et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, v.19, p.1720–1730, 1999.

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

HOLT III, B.F.; HUBERT, D.A.; DANGL, J.L. Resistance Gene Signaling in Plants - Complex Similarities to Animal Innate Immunity. *Current Opinion in Immunology*, London, v.15, n.1, p. 20-25, 2003.

IBGE – SIDRA Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema de recuperação automática. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e

Estatística, 2009. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 14 jul. 2011.

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. 607– 626, 2005.

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

LIEBLER, D.C. *Introduction to proteomics: tool for the new biology*. 1. ed. Totowa, New Jersey: Humana Press. p. 198, 2002.

LOPES, C.A.; REIS, A.; BOITEUX, L.S. Doenças fúngicas. In: LOPES, C.A.; ÁVILA, A. C. (Eds.). *Doenças do tomateiro*. Brasília: Embrapa Hortaliças. p. 19–51, 2005.

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

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.

NELSON, P.E. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In: MACE, M.E.; BELL, A.A.; BECKMAN, C.H. (Eds.). *Fungal wilt diseases of plants*. New York: Academic Press. p. 51-80, 1981.

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

OLSEN, J.V.; ONG, S.E.; MANN, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & Cellular Proteomics*, v.3, p.608-614, 2004.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. v. 405, p. 837-845, 2000.

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

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). *Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos*. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v.1, p. 417-453, 1995.

PATTERSON, S.D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature genetics*. New York, v. 33, p. 311- 323, 2003.

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

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.

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

SANTONI, V.; MOLLOY, M.; RABILLOUD, T. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis*. v. 21, p. 1054-1070, 2000.

SASAKI, J.L.S.; SENO, 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.

SHEW, H.D.; SHEW, B.B. Host resistance. In: CAMPBELL, C.L.; BENSON, D.M. (Eds.) *Epidemiology and management of root diseases*. Heidelberg: Springer-Verlag. p.244– 275, 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.

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.

TANNU, N.S.; HEMBY, S.E. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nature Protocols*. v. 1, p 1732-1742, 2006.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. v. 6, n. 4, p.351-357, 2003.

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.

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.

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

VISWANATHAN, S.; UNLU, M.; MINDEN, J.S. Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nature Protocols*. v. 1, p 1351-1358, 2006.

CAPÍTULO I

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Plant Molecular Biology*

Fator de Impacto: 4.149

Qualis CAPES Ciências Biológicas I: A2

Plant Molecular Biology

Analysis of protein profile of the root of tomato infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	PLAN-D-12-04356
Full Title:	Analysis of protein profile of the root of tomato infected with <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>
Article Type:	Manuscript
Keywords:	<i>Solanum lycopersicum</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ; proteomics; differential expression
Corresponding Author:	Tulio Silva BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Tulio Silva
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Tulio Silva
	Clébia Almeida, Dr ^a
	Carolina Malafaia, Msc.
	Louise Oliveira, Msc.
	Márcia Silva, Dr ^a
	Maria Correia, Dr ^a

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

Túlio D. Silva^a, Clébia M. A. Almeida^a, Carolina B. Malafaia^a, Louise M. S. Oliveira^a, Márcia V. Silva^b, Maria T. dos S. Correia^b.

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Centro de Ciências Biológicas CCB – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Rua Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária. CEP 50670-901 Recife – PE, Brasil. e-mail: diegotulio1@gmail.com; clebia.almeida@gmail.com; carol08malafaia@hotmail.com; louise_oliveira89@yahoo.com.br.

^b Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Rua Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária 50670-420 Recife - PE Brasil. e-mail: marciavanusa@yahoo.com.br; mtscorreia@gmail.com.

To whom correspondence should be addressed: diegotulio1@gmail.com

Abstract

The fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) is one of the main diseases affecting tomatoes. The BHRS genotype is resistant to this disease and therefore, it was used in this study. Proteomic approach was used to understand the defense mechanisms of BHRS using the tomato root, the first tissue that interacts with the fungus, as a target. Proteins were extracted and separated by two dimensional electrophoresis followed by staining with coomassie blue. Protein identification was performed by MALDI-TOF/TOF type mass spectrometry. A total of 22 proteins were identified, 21 of which showed differential expression: 12 up regulated and nine down regulated. Plants responded to pathogen with increased expression of pathogenicity-related proteins. We noted the induction of proteins present in the hypersensitivity reaction and other defense mechanisms. There was a decreased expression of primary metabolism proteins related to energy production; however, there was also decreased expression of two proteins related to defense against abiotic stress. These results demonstrate the presence of important mechanisms in the defense of tomato genotype BHRS against Fol.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersic*;; proteomics; differential expression

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 environments where the air and soil temperature are high, as in tropical countries, during the warm seasons (Agrios 2005). The classical strategies, such as use of fungicides and crop rotation were not efficient due to the spores of resistance that remain viable for several years, and to the residues impact on human health. Breeding contribute to the emergence of more aggressive new breeds of pathogen. Therefore, it is necessary to develop new and efficient control strategies and that will not compromise the environmental safety (Mandal et al. 2009). Resistant cultivars developed by gene transfer appear as one of the most promising options to combat the disease being currently studied. However, resistance to diseases involves a complex mechanism of virulence recognition determinants by plant receptors, followed by specific pathways of signal transduction until the production and release of reactive oxygen species, phytoalexins pathogenicity-related proteins (PR), in addition to programmed cell death (Torres et al. 2006). Studies on inducers show that resistance to Fol may be related to salicylic acid and jasmonic acid (Mandal et al. 2009; Afroz et al. 2009). There are also studies that have identified candidates of rhizosphere to the control of pathogenic fungi, including *Fusarium* spp. and fungal proteins are related to the pathogenicity have been identified (Escobosa et al. 2011; Pastor et al. 2012; ados-Rosales et al. 2009; Shanmugam et al. 2011). However, little is known about molecular relationships of metabolic pathways such as recognition, signaling and plant response, in addition to components not directly related to infection.

The root is the first site to detect and fight soil fungi infections such as Fol. Consequently, understanding the molecular mechanisms happening in this tissue is necessary to improve the resistance to the pathogen. Differential proteomics, whose essence is to find 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 been significantly increased over the study of various stresses, either biotic or abiotic origin (Faurobert et al. 2007).

This study aims to analyze the profile of proteins secreted by BHRS tomato cultivar, known by its resistance to Fol, in order to identify those with differential expression using the 2-DE proteomic technologies associated with MALDI-TOF-TOF/MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, tandem Time of Flight Mass Spectrometer), which are associated with the defense to the fungus.

Materials and methods

Tomato line and *Fusarium oxysporum* isolate

The tomato genotype BHRS (resistant to fusarium wilt), from vegetable improvement program of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA) was employed in the experiment. The race 2 isolate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* was obtained from the mycology collection of the department of phytopathology from Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brazil.

Experiment design

Seeds were sown in Styrofoam trays with 128 cells, filled with sterile substrate. When the plants had the first two pairs of true leaves fully open (about 21 days after planting), they were removed from the cells with a gentle water jet to preserve root integrity. The root system apical sector (about 2 cm) was removed and then dipped for 20 minutes in a spore suspension adjusted to approximately 2×10^6 conidia/ml, produced in potato dextrose broth for seven days at 28°C, under continue 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 the same greenhouse. The experimental plots were made of three pots with four plants each, in a randomized block design. Plants were collected in 1, 2, 4 and 6 days after inoculation and stored at -80°C.

Protein extraction

Roots (1000 mg) were grounded with ice-cold extraction buffer [8 M urea, 4% CHAPS, 10 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 7 mM dithiothreitol (DTT)] in

ice. Supernatant was collected by centrifugation at 20,000g at 4 °C for 20 min. The pellet was resuspended in the extraction buffer for repeated extraction, and then centrifuged at 20,000g at 4 °C for 20 min for collection of supernatant. Proteins in the combined supernatant were precipitated with five volumes of ice-cold trichloroacetic acid–acetone (10% trichloroacetic acid in 100% acetone) at -20 °C for 6 h and then collected by centrifugation at 20,000g for 20 min. The pelleted proteins were washed first with 80% cold acetone containing 0.2% DTT, then with cold acetone containing 0.2% DTT and finally vacuum dried as described in Dai et al., 2007. The obtained proteins were dissolved in a lysis buffer (8 M urea, 4% CHAPS, 7 mM DTT, and 2% pharmalyte 4–7) at room temperature. After the removal of debris by centrifugation at 20,000g for 20 min, proteins were quantified according to the Bradford method (Bradford 1976) by UV-2000 UV-visible spectrophotometry (UNICO). Bovine serum albumin (BSA) was used as a protein concentration standard in this study. The final proteins underwent two-dimensional gel electrophoresis immediately or were stored in aliquots at -80 °C.

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

We mixed 600 µg protein samples in 250 µL of rehydration buffer that contained 8 M urea, 2% w/v CHAPS, 20 mM DTT, 0.5% IPG buffer (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), and 0.002% bromphenol blue and loaded the samples onto IPG strips (13 cm with a linear range of IPG pH 4–7, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) after a brief sonication and centrifugation. Isoelectric focusing was performed in the Ettan IPGphor isoelectric focusing system following the manufacturer protocol. Before running the second dimensional electrophoresis, the IPG strips were equilibrated for 15 min first in fresh buffer [6 M urea, 30% (w/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 100 mM Tris–HCl, pH 8.8] with the addition of 100 mM DTT and subsequently for 15 min in fresh buffer supplemented with 0.25 M iodoacetamide. The equilibrated IPG strips were transferred onto 12.5% SDS acrylamide gels by use of an Ettan SE 600 Ruby Electrophoresis Unit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). The proteins on gels were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue dye (CBBR250) (Candiano et al. 2004). Images of CBB-stained gels were acquired at 300 dpi scanning resolution and 16-bit pixel depth, then analyzed with ImageMaster 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) software according to protocols provided by the manufacturer. The amount 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 different stages.

Protein analysis by MALDI-TOF/TOF MS

In-gel digestion of proteins was performed as described by Shevchenko et al (2007), with minor modifications. Trypsin was used at a concentration of 25 ng/ μ L and the In-gel reduction and alkylation step was omitted.

Peptides were dissolved in 10 μ L of 0.1% TFA. A saturated solution of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA (4 mg/mL) in 50% ACN and 0.3% TFA was mixed with equal amount of sample and spotted in Anchor Chip 800/384 target plate (Bruker Daltonic GmbH) and dried in laminar airflow for recrystallization. For MS calibration 0.5 μ L of peptide calibration standard (Bruker Daltonik GmbH) were spotted on the target with 0.8 μ L of CHCA matrix and recrystallized too. Samples were analyzed in a MALDI time of flight/time of flight (TOF/TOF) mass spectrometer (Ultraflex, Bruker Daltonics) in reflectron mode. Peptides with a signal-to-noise ratio above 100 were MS/MS analyzed by using the LIFT technology that is embedded in the Ultraflex MS; on average, ten MS/MS spectra were measured for each protein digest leading to 2–10 identified peptides. Data processing was realized using the flex analysis and biotools software packages (Bruker Daltonik).

MS data analysis

Data analysis was performed using BioTools 3.0 software and MASCOT search engine (Matrix Sciences, UK). Searches were performed using the following parameters: mass tolerance was set to 0.7 Da for fragment ions. Trypsin was set as proteolytic enzyme with 2 allowed missed cleavages. Charge state 1+, was used. Carbamidomethylation of cysteine residues was used as fixed modification and oxidation of methionine residues was set as variable modification.

MSDB, swissprot and NCBI nr databases were used to identify tomato proteins either with an in house MASCOT server or online available MASCOT server (Matrix Science, UK). Proteins were both identified and denominated if at least two peptides were identified with a MASCOT peptide ion score higher than 25. The threshold of 25 for the peptide ion score was obtained searching a reverse data base (MSDB) with all generated MS/MS spectra. All hits obtained from this reverse database

search showed peptide ion scores significantly below 25. Additionally, if high peptide ion scores (>46) were obtained for single peptides and a y-ion series of nearly all ions was obtained, the corresponding proteins were termed identified even if only one peptide was found for the protein. The databases used in house were released in August 2006 (MSDB), in October 2007 (NCBI nr) and May 2009 (Uniprot/Swissprot, release 15.2). The same database releases were used at Matrix Science.

Results

Protein Analysis

Collection times were chosen based on previous experiments (unpublished data). About 1400-1800 µg of protein were obtained from 1 g root tissue of treatments. The resolution of approximately 600 µg of protein loaded on each gel showed an average of 450-550 with pI ranging between 4 and 7 and the molecular mass ranging between 90 and 10 kDa (Figure 1). The 2-DE comparative analysis was carried out among treatments. The differentially expressed proteins were identified via MALDI TOF/TOF (MS/MS) tandem mass spectrometry, which achieved 65% (22 of 34 spots) of successful identifications.

Protein regulation in the tomato root

The plant protein reactions to the pathogen invasion were evaluated comparing gels in triplicate both before and after inoculation with the pathogen, revealing 21 differentially expressed spots (Figure 2). Of the proteins identified 11 had their expression increased. Ten proteins had their expression decreased. Calreticulin was identified as with no differential expression, but high concentration (Table 1).

Of the proteins identified with increased expression, two have unknown function. Of those with known function, one is related to primary metabolism, seven to defense to stresses and one to signaling. Regarding proteins with decreased expression, five are related to primary metabolism, one to abiotic stress, one to recovery on oxidative stress and two have no known function. The protein with no differential expression is associated with both primary metabolism and defense.

Discussion

Several strategies are developed 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*, unlike other genotypes of economic importance. Therefore, studies on defense mechanisms that confer characteristic resistance to this genotype are important when aiming at breeding. The root is the first tissue to interact with the *Fusarium*; therefore, it was used in this study in order to identify proteins involved in the defense against this phytopathogen. The tomato root's proteome has already been discussed in previous studies (Keeler et al. 2007, Li et al. 2008), but not under the influence of fungal infection.

Expression of defense mechanisms

There was increase of plant defense related proteins after infection with the pathogen. There was increased expression of chitinase (PR-3), PR-5 protein, LeMir (*Lycopersicon esculentum* miraculin), nucleoside diphosphate kinase (NDPK), RNA binding protein rich in glycine (GRP), superoxide dismutase [Cu-Zn] and actin. When plants are challenged by pathogens, usually there is increase in the expression of pathogenesis-related proteins (PR), in addition to plant fortification, among other responses.

The PR proteins (spots 12 and 13) are normally present in plants constitution at low concentration, but their expression is increased under pathogens attack or abiotic stress (Dahal et al. 2009). Plant chitinases, whose are mostly endochitinases, are described as participating in protection, due to their degradation potential of fungal cell wall, thus limiting the invasion and growth of pathogen into the host (Ahmed et al. 2011). The PR-5 proteins, also known as Thaumatin-like protein due to the similarity with this protein, have been described as participating in the defense against many pathogens and other abiotic stress (Ren et al. 2011). Although the action mechanisms of this protein group has not yet been elucidated, its performance has been described in fighting fungal infections, for example, inhibition of spore germination and mycelium growth (Tachi et al. 2009). The induction of PR proteins is considered an activation marker of plant's basal defense (Dahal et al. 2009).

The hypersensitive reaction (HR) is one of the most efficient forms of plant defense against pathogens (Karrer et al. 1998). Miraculins (spots 16 and 17) are proteins known to alter the taste perception in humans and, due to similarity, the protein was named LeMir (Brenner et al. 1998). However, according to the databases, LeMir has a greater similarity to tumor inducing proteins from the tobacco plant. In addition, LeMir and its two homologous present in soybeans are related to the family of protease inhibitors based on the sequences, although this activity has yet to be confirmed (Brenner et al. 1998). This protein is secreted and concentrated in the root in response to infestation by nematodes, suggesting its involvement in plant defense against these organisms (Brenner et al. 1998). Moreover, overexpression of this protein was observed in lesions caused by hypersensitive response in tobacco and tomato plants, demonstrating that LeMir plays an important role in regulating a variety of RH types (Karrer et al. 1998, Xu et al. 2012).

Another RH mechanism is releasing 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 those responsible for the antioxidative response, transforming superoxide into hydrogen peroxide (Madanala et al. 2011). The use of SOD to control the ROS concentration in the cell is a strategy to activate signaling of defense pathways such as those of mitogen-activated kinases proteins (MAPKs), which seems to be central in cellular response to multiple stresses (Apel 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; Gourelay 2008). In plants, the actin cytoskeleton is also used as a sensor for stress monitoring and is involved with part of the mechanisms that trigger the HR and programmed cell death (PCD). The actin filaments are reorganized, adding up and lining up near the infection site, thus allowing isolation of the area where there is MCP (Franklin-Tong, 2008 Gourelay, Chang et al. 2011). There is still evidence of the actin-ROS interaction during the HR; however, that fact has not been proven yet (Franklin-Tong, Gourelay, 2008). Thus, increased expression of two LeMir isoforms against the Fol infection and increased expression of an enzyme related to ROS and actin, all these related to RH and MCP, are indicative of the BHRS genotype resistance to this disease.

NDPK (spot 21) is a protein responsible for cellular organization, regulating the nucleotides groups in the cells (Kihara et al. 2011). However, it has been described as involved in signal transduction in plants. In potatoes, NDPK was associated with increased tolerance to multiple stresses (Tang et al. 2008). In rice, there as 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 defense role of NDPK against microorganisms (Cho et al. 2004).

GRP (spots 14 and 15) are involved in various pathways, having structural function, providing elasticity to the cell wall, but also involved in post-transcriptional regulation of genes being found in response to stress (Mousavi; Hotta 2005, Wang et al. 2012). The increased GRP expression has been reported in response to salt stress, cold, heat, injury, and viral and fungal infections (Sachetto-Martins et al. 2000; 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 GRP acting as a plant defense.

Proteins associated with metabolism and regulation

There was decrease in some proteins associated with the primary metabolism in response to the fungus (spots 1, 5, 8 and 9). ATP synthase is a key protein responsible for energy production (Rexroth et al. 2012). The ROS production resulting from infection directly affects this enzyme efficiency due to oxidation of tryptophan residues, resulting in degradation of these enzymes oxidized by specific proteases (Rexroth et al. 2012). The decreased expression of proteins as matalo dehydrogenase and triose phosphate isomerase, both linked to energy cycles (Buono et al. 2009; Sukalovic et al. 2011) is related to resource reduction for the fungus in order to limit 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). It was described as participant in the regulation of root regeneration in *Brassica* (Jin et al. 2005). It was also induced by water stresses in tobacco (Jia et al. 2008), saline stress in *Arabidopsis* (Persson et al. 2003) and related to cold in rice (Li et al. 2003). With respect to biotic stresses, Calreticulines were found to play a defense role

against viruses (Chen et al. In 2005, Shen et al. 2010). Thus, the presence of this protein in BHRS genotype, even without increased expression, shows its role in different routes, in which it can interact.

However, some proteins related to stress defense had their expression decreased (spots 2, 3 and 4). Glutathione S-transferase (GST) protein is responsible for maintaining the plant's redox state; it combines electrophilic xenobiotics with glutathione thus reducing the toxicity (Sytykiewicz 2011). Another defense-related protein that also had decreased expression facing Fol was the protein by heat shock resistance class I (HSP). This group acts as chaperones, linking other proteins, stabilizing unstable structures and facilitating the modeling of inactive proteins. They are expressed rapidly and abundantly in face of various stresses (Bondino et al 2009). 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 being a need for some ROS being present in the tissue, but this fact needs proof.

Conclusion

The results of this study showed some proteome modifications of genotype BHRS upon the challenge by the fungus Fol, contributing to the understanding of plant-pathogen interaction. The differential expression of proteins related to defense or stress and primary metabolism in response to pathogen supports its fundamental role in the composition of the plant defense mechanism. However, further studies are needed to find other mechanisms and identify the beginning of routes, such as perception and signaling.

Acknowledgements

The authors thank the Agronomic Institute of Pernambuco - IPA for the availability of physical infrastructure to carry out the work, FACEPE for granting the graduation scholarship, the Banco do Nordeste and CNPq for funding the project.

References

Afroz A, Khan MR, Ahsan N, Komatsu S (2009) Comparative proteomic analysis of bacterial wilt susceptible and resistant tomato cultivars. *Peptides* 30:1600-1607

Agrios, G.N.(2005) Plant pathology. Academic Press, San Diego

Ahmed NU, Park JI, MS, Kumar TS, Lee IH, Park BS, Nou IIS (2011) Identification and expression analysis of chitinase genes related to biotic stress resistance in Brassica. *Molecular Biology Reports* doi: 10.1007/s11033-011-1139-x

An YQ, Lin RM, Wang FT, Feng J, Xu YF, Xu SC (2011) Molecular cloning of a new wheat calreticulin gene TaCRT1 and expression analysis in plant defense responses and abiotic stress resistance. *Genetics and Molecular Research* doi: 10.4238/2011.November.10.1

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373–399

Bondino HG, Valle EM, Have AT (2011) Evolution and functional diversification of the small heat shock protein/ α -crystallin family in higher plants. *Planta* doi: 10.1007/s00425-011-1575-9

Bradford, M. M (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248–254

Brenner ED, Lambert KN, Kaloshian I, Williamson VM (1998) Characterization of LeMir, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. *Plant Physiology* 118:237–247.

Buono DD, Prinsi B, Espen L, Scarponi L (2009) Triosephosphate Isomerases in Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*): Characterization and Susceptibility to Herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:7924-7930

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25:1327–1333

Chang X, Heene E, Qiao F, Nick P (2011) The Phytoalexin Resveratrol Regulates the Initiation of Hypersensitive Cell Death in Vitis Cell. *PLoS One* 6(10):e26405

Chen MH, Tian GW, Gafni Y and Citovsky V (2005). Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. *Plant Physiology*. 138: 1866-1876.

Cho SM, Shin SH, Kim KS, Kim YC, Cho BH (2004) Enhanced Expression of a Gene Encoding a Nucleoside Diphosphate Kinase 1 (OsNDPK1) in Rice Plants upon Infection with Bacterial Pathogens. *Molecules and Cells* 18:390-395

Dahal D, Heintz D, Dorsselaer AV, Braun HP, 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

Dai S, Chen T, Chong K, Xue Y, Liu S, Wang T (2007) Proteomics identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *Oryza sativa* pollen. *Molecular and Cellular Proteomics* 6:207-230

Escobosa ARC, Porras RAR, Carmen VM, Hernandez GAG, Guzman JCT, Wrobel K, Wrobel K, Roncero MIG, Corona JFG (2011) *Fusarium oxysporum* Adh1 has dual fermentative and oxidative functions and is involved in fungal virulence in tomato plants. *Fungal Genetics and Biology* 48:886-895

Faurobert M, Mihr C, Bertin N, Pawlowski T, Negroni L, Sommerer N, Causse M. (2007) Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiology* 143:1327–1346.

Franklin-Tong VE, Gourlay CW (2008) A role for actin in regulating apoptosis/programmed cell death: evidence spanning yeast, plants and animals. *Biochemical Journal* 413:389–404

Jia XY, Xu CY, Jing RL, Li RZ, et al. (2008). Molecular cloning and characterization of wheat calreticulin (CRT) gene involved in drought-stressed responses. *Journal of Experimental Botany* 59:739-751.

Jin ZL, Hong JK, Yang KA, Koo JC, et al. (2005). Over-expression of Chinese cabbage calreticulin 1, BrCRT1, enhances shoot and root regeneration, but retards plant growth in transgenic tobacco. *Transgenic Research*. 14:619-626

Karrer EE, Beachy RN, Holt CA (1998) Cloning of tobacco genes that elicit the hypersensitive response. *Plant Molecular Biology* 36:681–690.

Keeler M, Letarte J, Hattrup E, Hickman F, Haynes PA (2007) Two-Dimensional Differential In-Gel Electrophoresis (DIGE) of Leaf and Roots of *Lycopersicon esculentum*. *Methods in Molecular Biology* 355:157-174

Kihara A, Saburi W, Wakuta S, Kim MH, Hamada S, Ito H, Imai R, Matsui H (2011) Physiological and Biochemical Characterization of Three Nucleoside Diphosphate Kinase Isozymes from Rice (*Oryza sativa* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75:1740–1745

Kim MS, Kim HS, Kim HN, Kim YS, Baek KH, Park YI, Joung H, Jeon JH (2007) Growth and tuberization of transgenic potato plants expressing sense and antisense sequences of Cu/Zn superoxide dismutase from lily chloroplasts. *Journal of Plant Biology* 4:490-495

Kundu S, Chakraborty D, Pala A (2011) Proteomic analysis of salicylic acid induced resistance to Mungbean Yellow Mosaic India Virus in *Vigna mungo*. *Journal of Proteomics* 74:337-349

Kwak KJ, Kim YO, Kang H (2005) Characterization of transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing GR-RBP4 under high salinity, dehydration, or cold stress. *Journal of Experimental Botany* 56:3007-3016

Li J, Wu XD, Hao ST, Wang XJ, Ling HQ (2008) Proteomic response to iron deficiency in tomato root. *Proteomics* 8:2299-2311

Li Z, Onodera H, Ugaki M, Tanaka H, et al. (2003). Characterization of calreticulin as a phosphoprotein interacting with cold-induced protein kinase in rice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26: 256-261.

Madanala R, Gupta V, Deeba F, Upadhyay SK, Pandey V, Singh PK, Tuli R (2011) A highly stable Cu/Zn superoxide dismutase from *Withania somnifera* plant: gene cloning, expression and characterization of the recombinant protein. *Biotechnology Letters* 33:2057–2063

Manaa A, Ahmed HB, Valot B, Bouchet JP, Aschi-Smiti S, Causse M, Faurobert M (2011) Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. *Journal of Experimental Botany* 62:2797-2813

Mandal S, Mallick N, Mitra A (2009) Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* 47:642-649

Mousavi A, Hotta Y (2005) Glycine-rich proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 120:169-174

Pastor N, Carlier E, Andrés J, Rosas SB, Rovera M (2012) Characterization of rhizosphere bacteria for control of phytopathogenic fungi of tomato. *Journal of Environmental Management* 95:s332-s337

Persson S, Rosenquist M, Svensson K, Galvao R, et al. (2003). Phylogenetic analyses and expression studies reveal two distinct groups of calreticulin isoforms in higher plants. *Plant Physiology*. 133: 1385-1396.

Prados-Rosales R, Luque-Garcia JL, Martínez-López R, Gil C, Di Pietro A (2009) The *Fusarium oxysporum* cell wall proteome under adhesion-inducing conditions. *Proteomics* 9:4755-4769

Que Y, Xu L, Lin J, Ruan M, Zhang M, Chen R (2011) Differential Protein Expression in Sugarcane during Sugarcane-*Sporisorium scitamineum* Interaction Revealed by 2-DE andMALDI-TOF-TOF/MS. *Comparative and Functional Genomics* 2011:989016

Ren X, Kong Q, Wang P, Jiang F, Wang H, Yu T, Zheng X (2011) Molecular cloning of a PR-5 like protein gene from cherry tomato and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. *Molecular Biology Reports* 38:801–807

Rexroth S,Poetsch A, Rögner M, Hamann A, Werner A, Osiewacz HD, Schäfer ER, Seelert H, Dencher NA (2012) Reactive oxygen species target specific tryptophan site in the mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817:381-387

Sachetto-Martins G, Franco LO, Oliveira DE (2000) Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochimica et Biophysica Acta* 1492:1-14

Shanmugam V, Atri K, Gupta S, Kanoujia N, Naruka (2011) DS Selection and differentiation of *Bacillus* spp. Antagonistic to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and *Alternaria solani* infecting tomato. *Folia Microbiologica* 56:170–177

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. *Molecular. Plant Pathology*. 11: 335-346.

Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M (2007) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols* 1:2856-2860

Souza WR, Vessicchi R, Dorta DJ, Uyemura SA, Curti C, Vargas-Rechia CG (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. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 43:237–246

Sukalovic VHT, Vuletic M, Markovic K, Vucinic Z (2011) Cell wall-associated malate dehydrogenase activity from maize roots. *Plant Science* 181:465-470

Sytykiewicz H (2011) Expression Patterns of Glutathione Transferase Gene (GstI) in Maize Seedlings Under Juglone-Induced Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 12:7982-7995

Tachi H, Fukuda-Yamada K, Kojima T, Shiraiwa M, Takahara H (2009) Molecular characterization of a novel soybean gene encoding a neutral PR-5 protein induced by high-salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 47:73-79

Tang L, Kim MD, Yang KS, Kwon SY, Kim SH, Kim JS, Yun DJ, Kwak SS, Lee HS (2008) Enhanced tolerance of transgenic potato plants overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses. *Transgenic Research* 17:705–715

Torres MA, Jones JDG, Dangl JL (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology* 141:373-378

Wang C, Zhang DW, Wang YC, Zheng L, Yang CP (2012) A glycine-rich RNA-binding protein can mediate physiological responses in transgenic plants under salt stress. *Molecular Biology Reports* 39:1047–1053

Xu QF, Cheng WS, Li SS, Li W, Zhan ZX, Xu YP, Zhou XP, Cai XZ (2012) Identification of genes required for Cf-dependent hypersensitive cell death by combined proteomic and RNA interfering analyses. *Journal of Experimental Botany* doi: 10.1093/jxb/err397

FIGURES

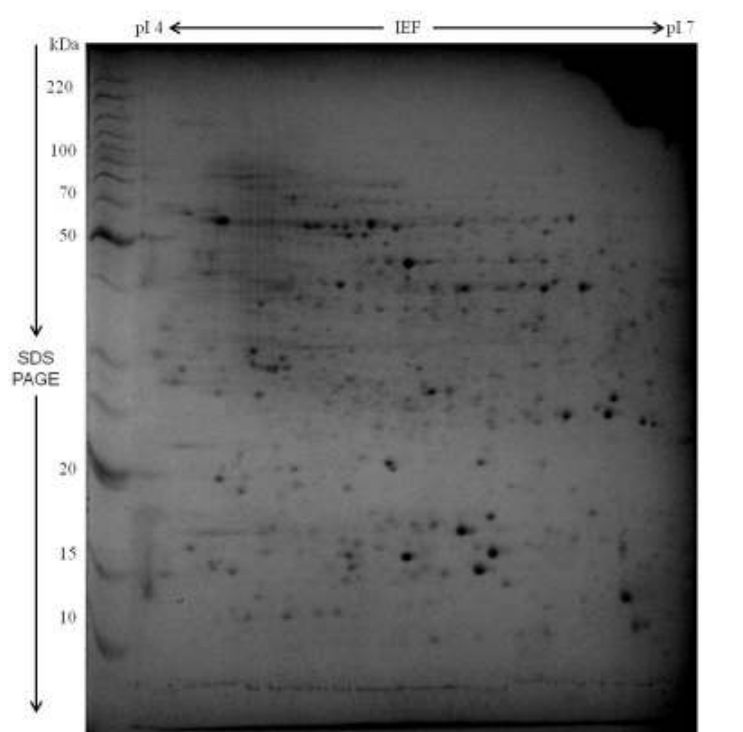


Fig. 1 Overview of the proteome of tomato roots infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* separated by two-dimensional electrophoresis. The resolution of 2-D proteome with IEF / SDS-PAGE and pI 4-7 linear 220-10 kDa molecular mass

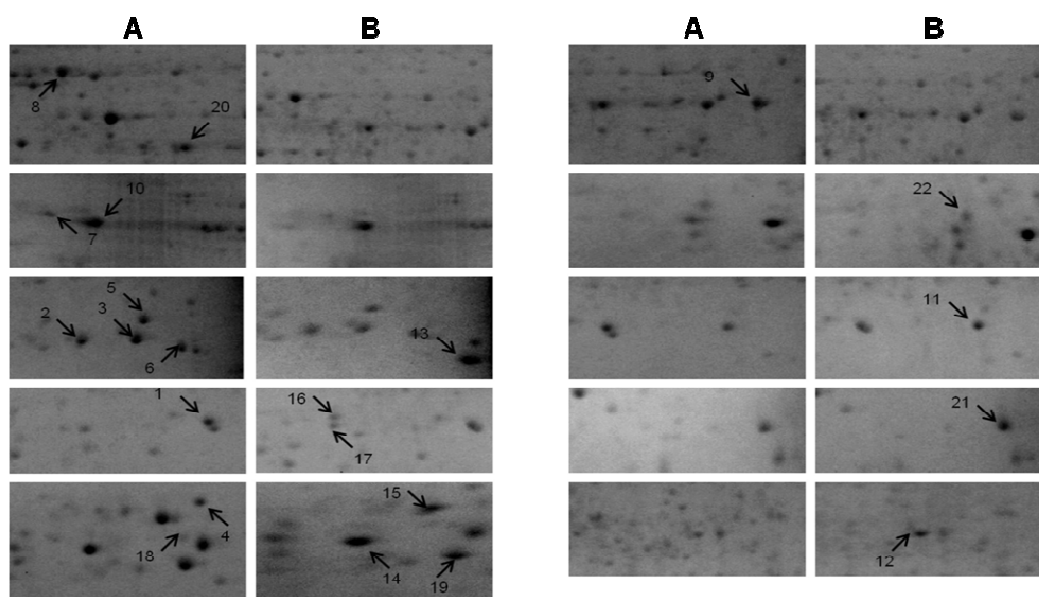


Fig. 2 "Zoom in" of the areas of the 2-D gels showing spots of proteins differentially expressed. The panels show the spots of the plant healthy, B show the spots of plants inoculated with *F. oxysporum*. The spot's numbers are according to the numbers used in Table 1

TABLE

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

Spot	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	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 232273	154	5.84	17.75	down
5	triose phosphate isomerase cytosolic isoform	<i>Solanum chacoense</i>	gi 38112662	93	5.73	27.25	down
6	putative protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 3269288	97	6.3	22.35	down
7	uncharacterized 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	calreticulin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 1009712	71	4.37	46.7	—
11	predicted protein	<i>Micromonas sp. RCC299</i>	gi 255084065	74	9.26	33.04	up
12	endochitinase	<i>Solanum chilense</i>	gi 767827	95	6.21	27.53	up
13	pathogenesis-related protein (PR-5 protein)	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 7414370	43	5.76	27.52	up
14	RNA-binding glycine-rich protein-1a	<i>Nicotiana glauca</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	Lemir	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 2654440	77	4.83	23.27	up
17	Lemir	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 2654440	77	4.84	23.28	up
18	40S ribosomal protein S12	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 12229949	105	5.35	15.62	up
19	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	<i>Solanum lycopersicum</i>	gi 350537277	89	5.83	15.4	up
20	unknown	<i>Glycine max</i>	gi 255638991	62	7.51	36.38	up
21	nucleoside diphosphate kinase	<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

a Number allocated according to the numbers used in Figure

b Identification of protein annotated by mass spectrometry

c Plant species from which protein was annotated

d Access number to the database (nrNCBI)

e MASCOT score

f Theoretical Molecular weight and isoelectric point computed from the calculation tool Mr/pI from ExPASy

g Note of the regulation type suffered by the protein