



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**PROTEÍNAS MODULADAS DURANTE A INTERAÇÃO DO
BEGOMOVÍRUS Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) E
SUAS PLANTAS HOSPEDEIRAS**

LÍLIAN SILVEIRA TRAVASSOS DO CARMO

Brasília

2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**PROTEÍNAS MODULADAS DURANTE A INTERAÇÃO DO
BEGOMOVÍRUS Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) E
SUAS PLANTAS HOSPEDEIRAS**

LÍLIAN SILVEIRA TRAVASSOS DO CARMO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular

Orientador: Renato de Oliveira Resende, PhD

Co-orientadora (s): Angela Mehta, PhD e Simone da Graça Ribeiro, PhD

Brasília

2014

Aos meus pais, meus maiores incentivadores, dedico.

"Meu caminho é feito de uma alma com pés valentes,
mesmo quando cansados arriscam mais um passo.
É essa doce valentia que me trouxe até aqui".

(Ana Jácomo)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo incentivo dado aos estudos. O apoio de vocês foi fundamental para o meu progresso e sucesso. À minha irmã, pela força dada ao longo dos anos. E aos demais familiares, pelo carinho e apoio.

Ao meu namorado, Norton Polo Benito, pelo incentivo que me deu para fazer o doutorado e pela paciência que teve ao longo desses anos. Sempre esteve disposto a me ajudar com as fórmulas 'gigantescas' do excel.

Ao meu avô Acyr Silveira (*in memoriam*) que sempre foi fonte de inspiração para os estudos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato de Oliveira Resende, que prontamente me abriu as portas para fazer o doutorado e que sempre esteve disposto a me ajudar.

À minhas Co-orientadoras, Dra Angela Mehta e Dra. Simone da Graça Ribeiro que permitiram que eu pudesse executar o meu trabalho sobre suas supervisões. Ao apoio, carinho e confiança que tiveram ao longo desses anos comigo. Tudo isso foi fundamental para meu aprendizado e assimilação do conhecimento.

Aos pesquisadores, Dr. Luciano Paulino da Silva e Dr. André Melro Murad, pelo suporte dado às análises de espectrometria de massa.

Ao Dr. Cristiano Lacorte, pelo fornecimento do vetor viral PVX-AC2 e pela ajuda com o esquema da organização genômica do vírus utilizado nesta tese. Sempre muito atencioso.

Ao suporte técnico de Pedro Henrique Souza, que sempre prestativo, cuidou das minhas plantas. Sua dedicação e ajuda foram muito importantes para a correta execução dos meus experimentos.

Aos colegas e amigos que fiz no LPPIII e que direta ou indiretamente contribuíram com o meu trabalho, incluindo Rafaela Fontenele e Thatianny Alves. Em especial, à Lígia de Almeida Moreira, por sempre estar disposta a me ajudar nos experimentos de bombardeamento.

Aos amigos do LGP, com quem trabalhei a maior parte do tempo, incluindo Gabriela Rabelo, Roberta Ferreira, Sara Guedes, Juan Carvalho e Bianca Simonassi. Sempre foram muito prestativos e atenciosos em me ajudar. Foi gratificante trabalhar com uma equipe tão harmoniosa como essa.

À Dra. Rosana Blawid que também foi essencial para o início do meu aprendizado, sempre me incentivando e colaborando com sua experiência acadêmica.

À instituição de ensino, Universidade de Brasília, pela oportunidade de estudo e ao departamento de Biologia Celular, pela oportunidade e apoio durante o doutorado.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro dado ao longo desses anos.

Ao INCTIPP, pelo apoio financeiro dado para execução do trabalho.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por permitir a execução do trabalho em suas instalações.

SUMÁRIO

RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
Importância agronômica do tomate e seus patógenos.....	3
Geminivírus: organização genômica.....	4
Begomovírus Monopartido e Bipartido.....	5
<i>Tomato chlorotic mottle virus</i> : begomovírus bipartido presente no Brasil.....	8
Genes de resistência a begomovírus em tomateiro.....	9
Proteômica baseada em gel (2-DE).....	10
Proteômica independente de gel (2D-LC-MS/MS).....	13
JUSTIFICATIVA.....	17
OBJETIVO GERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
HIPÓTESE.....	18
CAPÍTULO I - Identificação de proteínas do hospedeiro reguladas pelo fator de virulência AC2 do Tomato chlorotic mottle virus em <i>Nicotiana benthamina</i>.....	19
RESUMO.....	20
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1. Vetor viral, material vegetal e inoculação.....	24
2.2. Extração de RNA e análise por RT-PCR.....	25
2.3. Extração de proteínas.....	25
2.4. Western blot.....	26
2.5. 2-DE e análise de imagem.....	27
2.6. Identificação de proteínas por MS.....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.1. Proteínas virais expressas em plantas infectadas com PVX-AC2 e PVX.....	34

3.2. Interferência do C2 em processos fotossintéticos e na produção de energia na planta hospedeira.....	38
3.3. Proteínas relacionadas com defesa moduladas por AC2 e estresse oxidativo na planta hospedeira.....	47
3.4. Fatores transcricionais e traducionais afetados por AC2.....	49
3.5. Acúmulo de chaperona em plantas infectadas com PVX-AC2.....	50
4. CONCLUSÃO FINAL.....	51
CAPÍTULO II - Identificação de proteínas moduladas durante a interação tomateiro -ToCMoV através de 2D - nanoUPLC/MS^E.....	53
RESUMO.....	54
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1. Material vegetal.....	58
2.2. Inoculações das plantas e coleta do material.....	59
2.3. Confirmação da infecção viral por PCR.....	60
2.4. Extração de proteínas de tomateiros.....	61
2.5. Preparação das amostras para a aquisição por 2D-NanoUPLC/HDMS ^E	62
2.6. Análise dos peptídeos trípticos por 2D-NanoUPLC/HDMS ^E	63
2.7. Identificação e quantificação das proteínas.....	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.1. Avaliação fenotípica das linhagens resistente e suscetível inoculadas com o begomovírus ToCMoV.....	67
3.2. Confirmação da infecção viral por PCR.....	68
3.3. Identificação de proteínas do hospedeiro moduladas durante a infecção viral.....	70
3.3.1. Proteínas relacionadas à defesa/resistência moduladas na interação resistente.....	72
3.3.2. Proteínas relacionadas com a infectividade viral que foram moduladas em tomateiro suscetível.....	76
3.3.3. Proteínas moduladas nas linhagens de tomateiro resistente e suscetível durante a infecção com ToCMoV.....	82

4. CONCLUSÃO FINAL.....	105
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
PERSPECTIVAS.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
APÊNDICE.....	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Diagrama do vetor viral PVX-AC2.....	24
Figura 1.2. Visão das folhas infectadas em 5, 10, 15 e 17 dia após a infecção com PVX-AC2 e Potato virus X (PVX).....	32
Figura 1.3. Sintomas de plantas <i>N. benthamiana</i> infectadas com os vetores PVX-AC2 e o Potato virus X (PVX).....	33
Figura 1.4. Expressão dos genes/proteínas CP (capa proteica de Potato virus X) e AC2 em plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas com os vetores Potato virus X expressando AC2 (PVX-AC2) e Potato virus X.....	34
Figura 1.5. Géis representativos de plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas com Potato virus X (PVX) e PVX-AC2.....	35
Figura 1.6. Diagrama mostrando proteínas que foram aumentadas e diminuídas em plantas de <i>N. benthamiana</i> inoculadas com PVX-AC2.....	36
Figura 2.1. Organização genômica do begomovírus Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV).....	60
Figura 2.2. Desenho experimental utilizado para identificar as proteínas moduladas durante a infecção viral.....	66
Figura 2.3. Sintomatologia das plantas de tomateiro inoculadas com Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) 15 (dai) por bombardeamento.....	68
Figura 2.4. Amplificação do DNA viral por PCR nas plantas das linhagens resistente (LAM 157) e suscetível (Santa Clara) de uma réplica biológica.....	69
Figura 2.5. Fluxograma mostrando o número de proteínas identificadas e diferencialmente expressas por meio da técnica 2D-NanoUPLC/MS ^E	71
Figura 2.6. Análise comparativa entre plantas resistentes LAM 157 inoculadas com Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) e não inoculadas (controle).....	74
Figura 2.7. Análise comparativa entre plantas suscetíveis Santa Clara inoculadas com Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) e não inoculadas (controle).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Proteínas diferencialmente expressas e estatisticamente validadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.05.....	36
Tabela 1.2. Proteínas diferencialmente expressas identificada por espectrometria de massa.....	40
Tabela 2.1. Proteínas identificadas em tomateiro resistente infectado com Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) por 2D-nanoUPLC/HDMS ^E	87
Tabela 2.2. Proteínas identificadas em tomateiro suscetível infectado com Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) por 2D-nanoUPLC/HDMS ^E	97
Tabela 2.3. Proteínas comuns identificadas em tomateiro resistente e suscetível infectado com Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) por 2D-nanoUPLC/HDMS ^E	104

ABREVIACOES

ToCMoV	<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
2-DE	Eletroforese Bidimensional
MS	Espectrometria de Massa
MS ^E	MS emcoliso de baixa e alta energia
2D-LC	Cromatografia líquida multidimensional
Nano-UPLC	Cromatografia líquida em nanoescala de ultraperformance
UPLC	Cromatografia líquida de ultraperformance
PLGS	ProteinLynx Global Sever
NCBI	National Center for Biotechnology Information
HD	Alta definição
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase
TGMV	Tomato golden mosaic virus
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>

RESUMO

O tomate é uma cultura de grande importância econômica em todo o mundo, mas é severamente afetada por vários geminivírus, como o begomovírus *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) que causam perdas significativas na cultura. O objetivo desse estudo foi identificar proteínas diferencialmente expressas na interação ToCMoV-planta hospedeira. Primeiramente foi verificado o efeito do gene AC2 de ToCMoV na planta modelo *Nicotiana benthamiana*. A proteína AC2 é um fator de virulência que tem um papel crucial no sucesso da interação vírus-planta, atuando como ativador transcricional e em alguns begomovírus, como supressor de silenciamento de RNA. Entretanto, a função ou funções da proteína AC2 do begomovírus ToCMoV ainda não foram determinadas. Para esta etapa do trabalho, plantas de *N. benthamiana* foram inoculadas com *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor viral Potato virus X (PVX) e com a construção PVX-AC2. Eletroforese bidimensional foi realizada e a análise por MALDI TOF-TOF revelou proteínas diferencialmente expressas envolvidas em estresse oxidativo, fotossíntese, defesa contra patógenos, entre outros. Na segunda etapa do trabalho, foi aplicada a metodologia 2D-nanoUPLC/HDMS^E para a análise de folhas de tomateiro infectadas com o begomovírus ToCMoV. Foram analisados, pela primeira vez, os perfis proteômicos dos genótipos de tomateiro suscetível (Santa Clara) e resistente (LAM 157 contendo o *locus* de resistência *tcm-1*) inoculados com ToCMoV. Proteínas diferencialmente expressas em resposta ao ToCMoV foram identificadas. Os resultados obtidos neste estudo revelaram proteínas que podem estar associadas com a suscetibilidade ao ToCMoV, como a ubiquitina e a proteína de choque térmico 70 (HSP 70). Os efeitos causados pelo fator de patogenicidade AC2 do ToCMoV e pelo vírus íntegro foram semelhantes e resultaram no recrutamento de proteínas envolvidas nas vias de ubiquitinação, tradução e processamento proteico. Por outro lado, as plantas hospedeiras também desencadearam resposta de defesa na

tentativa de combater o avanço viral aumentando a expressão de proteínas como, a histona H4. Os resultados obtidos neste estudo trazem importantes contribuições para a melhor compreensão das interações ToCMoV-planta hospedeira e poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle da infecção por este begomovírus.

ABSTRACT

Tomato is a highly important crop cultivated worldwide, which is severely affected by begomoviruses such as *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). The aim of the present study was to identify differentially expressed proteins in the ToCMoV-host plant interaction. The virulence factor AC2 is considered crucial for a successful virus-plant interaction and is known to act as a transcriptional activator and in some begomoviruses to function as an RNA silencing suppressor factor. However, the function or functions of the AC2 protein of the begomovirus ToCMoV are not yet determined. In the first part of this study, the model plant *Nicotiana benthamiana* was inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing the viral vector Potato virus X (PVX) and with the PVX-AC2 construction. Bidimensional electrophoresis was performed and MALDI TOF-TOF analysis revealed differentially expressed proteins involved in oxidative stress, photosynthesis, host defence, among others. In the second part of this study, we have applied the 2D-nanoUPLC/HDMS^E methodology to analyse tomato plants infected with the begomovirus ToCMoV. For the first time, the proteomic profiles of the susceptible tomato genotypes (Santa Clara) and resistant (LAM 157 containing the locus of resistance *tcm-1*) inoculated with ToCMoV were analyzed. Differentially expressed proteins in response to ToCMoV were identified. The results of this study revealed proteins that may be associated with the infectivity of ToCMoV, such as ubiquitin and heat shock 70 (HSP 70). The effects caused by the pathogenicity factor AC2 of ToCMoV and the intact virus were similar and resulted in the recruitment of proteins involved in ubiquitination pathways, translation and protein processing. Moreover, the host plant defense response was also triggered in an attempt to combat viral breakthrough increasing the expression of proteins such as histone H4. The results obtained provide important

contributions to the understanding of plant-ToCMoV interactions and may contribute to the development of strategies to control this infection caused by begomoviruses.

INTRODUÇÃO GERAL

O tomate (*Solanum lycopersicum*) pertence à família Solanaceae, uma das hortaliças de maior importância econômica no mundo, e o seu consumo está associado à uma dieta saudável e equilibrada, rica em nutrientes (Naika *et al.*, 2006). A cultura do tomate possui tolerância a variações ambientais como temperatura, luminosidade e fotoperíodo, mas a produção é afetada por vários problemas fitossanitários, uma vez que essa cultura é suscetível à diversas pragas, como insetos, fungos, nematóides, bactérias e vírus (Makishima, 2011).

Entre os problemas fitossanitários, destacam-se as begomoviroses que são doenças causadas por geminivírus do gênero *Begomovirus*. Esses fitovírus são transmitidos pela mosca branca (*Bemisia tabaci*), causando grandes perdas para as áreas produtoras de tomate no mundo (Morales e Anderson, 2001). No Brasil, com a entrada de um novo biótipo da mosca-branca (*B. tabaci*, biotipo B) (França, Villas Boas e Branco, 1996), foi observado um grande aumento na incidência de begomovírus em tomateiros em todas as regiões produtoras do país (Faria *et al.*, 2000) e o controle fitossanitário não tem se mostrado muito eficiente. Além disso, esse problema ainda é acompanhado pelos custos elevados no manejo do vetor levando à poluição do meio ambiente (Ribeiro, S., 2006).

Uma das alternativas mais promissoras para o manejo integrado mosca-branca-begomovírus é o desenvolvimento de cultivares de tomateiro resistentes à infecção por begomovírus (Morales e Anderson, 2001). No Brasil, já foram encontradas fontes de resistência a isolados de begomovírus bipartidos em diferentes acessos de tomate (Santana *et al.*, 2001). Entre elas, destaca-se a linhagem 'TX468-RG' derivada do híbrido 'Tyking'. Estudos genéticos mostraram que a linhagem 'TX 468-RG', resistente a begomovírus

bipartidos, apresenta resistência ampla a begomovírus monopartidos e bipartidos. Essa característica é determinada pela presença de um *locus* recessivo denominado *tcm-1* (Giordano *et al.*, 2005). Embora estudos genéticos tenham sido realizados na determinação da resistência, análises de expressão diferencial nas interações planta-begomovírus ainda são limitadas.

Uma das ferramentas que vem contribuindo na investigação da expressão global durante a interação vírus-planta é a proteômica, sendo a eletroforese bidimensional (2-DE), associada à espectrometria de massa (MS), a técnica mais aplicada em estudos de proteoma de plantas (Di Carli, Benvenuto e Donini, 2012). Diversos trabalhos relataram a utilização dessa técnica como forma de obter informações sobre as interações e os mecanismos afetados na planta hospedeira quando infectadas por vírus (Pérez-Bueno *et al.*, 2004; Ventelon-Debout *et al.*, 2004; Casado-Vela, Sellés e Martínez, 2006). Yang *et al.* (2011) mostraram a visão global das proteínas alteradas em soja infectada com Soybean mosaic virus através de 2-DE. Esses autores identificaram proteínas relacionadas com degradação proteica, defesa, metabolismo, energia, entre outros. Wu *et al.* (2013) também utilizaram a técnica de 2-DE em estudo comparativo de genótipos resistente e suscetível de milho infectado com Sugarcane mosaic virus, revelando pela primeira vez, 19 novas proteínas responsivas a vírus.

Nos últimos anos, a abordagem proteômica tem passado por mudanças. O aprimoramento de técnicas de cromatografia acoplada à espectrometria de massa (LC/MSMS) permitiu o surgimento de técnicas alternativas às técnicas convencionais de proteômica, como a 2-DE. A 2D-LC-MS/MS, por exemplo, é uma metodologia considerada rápida e sensível na identificação de proteínas em misturas complexas de proteínas (Link *et al.*, 1999), tornando-a bastante utilizada. Nessas técnicas baseadas em cromatografia, os dados gerados pela espectrometria de massa são coletados, automaticamente processados e comparados com

espectros teóricos gerados de sequências disponíveis nos bancos de dados para a identificação das proteínas (Wang e Hanash, 2003).

A 2D-LC-MS/MS é aplicada com sucesso em análises do perfil proteômico global de plantas, como foi mostrado por Komatsu *et al.* (2006). Esses autores identificaram diversas proteínas reguladas por giberelina em arroz. Além disso, sua aplicação foi observada em estudos de fisiologia da planta (Schneider *et al.*, 2012), e também na caracterização de fitopatógenos (Bringans *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2010). Além disso, essa técnica permitiu a identificação de diversas proteínas de planta moduladas em resposta a estresse hídrico (Larrainzar *et al.*, 2007) e a estresse oxidativo (Kristensen *et al.*, 2004). Apesar de relatos mostrarem a aplicação dessa metodologia na detecção de proteínas em plantas, não há relatos envolvendo sua aplicação em estudos de interação planta-vírus.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Importância econômica do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicon*) pertence à família Solanaceae e é nativo das regiões das Ilhas de Galápagos (Darwin, Knapp e Peralta, 2003; Darwin, 2009), Equador, regiões andinas do Peru, norte do Chile, além do México, Bolívia e Colômbia (Rick e Holle, 1990; Peralta, Knapp e Spooner, 2005).

De acordo com a Food and Agriculture Organisation (FAO), em 2012, o tomate foi considerado o oitavo vegetal mais produzido no mundo, colocando o Brasil como o oitavo produtor dessa cultura (Fao, 2012). Essa hortaliça apresenta uma grande importância econômica para o Brasil e segundo o levantamento sistemático de produção agrícola (LSPA/IBGE),

na safra de 2011, a produção de tomate chegou a 4 milhões de toneladas, com rendimento médio de 63 toneladas/hectare. Esse aumento na produção está relacionado com o crescimento do consumo do tomate nas formas processada e fresca (Ibge, 2012) que são destinadas à indústria de alimentos e ao consumo *in natura*, respectivamente (Makishima, 2011).

O cultivo de tomate envolve diversos setores da economia, como as empresas produtoras de insumos, equipamentos agrícolas, centrais de abastecimento, atacadistas, redes de supermercados e varejões de produtos hortifrutigranjeiros gerando oportunidades de empregos e renda para toda a cadeia produtiva (<http://www.abcsem.com.br/noticia.php?cod=1986>). Além disso, o tomate se destaca por ser um alimento funcional. Estudos têm focado nas suas propriedades antioxidantes, devido a altas quantidades de licopeno, associando o seu consumo como um indicador nutricional de hábitos saudáveis (Takeoka *et al.*, 2001; George *et al.*, 2004).

Recentemente, um grande avanço foi obtido com a publicação do sequenciamento do genoma de tomate pelo "The Tomato Genome Consortium" (Consortium, 2012). As informações moleculares retiradas desse genoma poderão fornecer bases para a compreensão de problemas fitossanitários que comprometem a produção do tomate, como as infecções virais, principalmente aquelas causadas por espécies da família *Geminiviridae*.

Geminivírus: organização genômica

Os vírus da família *Geminiviridae* constituem um grupo distinto de outros vírus de planta, por serem compostos por DNA circular de fita-simples com 2,5-3,0 Kb (dependendo do vírus) empacotado dentro de partículas isométricas geminadas. A replicação viral ocorre no núcleo das células infectadas através da forma replicativa intermediária de DNA fita dupla (Faria e Zerbini, 2000). A maioria dos geminivírus é restrita ao floema, portanto, dificilmente transmitida por inoculação mecânica (Harrison B. D., 1985; Horns e Jeske, 1991). Baseado na

organização genômica, inseto vetor e planta hospedeira, os geminivírus são atualmente classificados em sete gêneros *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Eragroviruse* e *Turncurtovirus* (http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=20120333, Brown *et al.*, 2012).

A estrutura genômica dos geminivírus é composta por genes que se sobrepõem em diferentes fases de leitura orientadas nas duas direções do genoma viral, região intergênica IR ('large' LIR e/ou 'small' SIR, dependendo do vírus) e uma origem de replicação (ori) (Rosario, Duffy e Breitbart, 2012). Nos begomovírus bipartidos, os genes relacionados com replicação, regulação da transcrição e encapsidação viral estão presentes em um componente viral (DNA-A), enquanto que os genes relacionados com a movimentação viral fazem parte de um segundo componente (DNA-B). Ambos os componentes são necessários para a infecção viral (Timmermans, Das e Messing, 1994). Entretanto, alguns begomovírus, assim como todos os *mastrevirus*, *curtovirus*, *topocuvirus*, *becurtovirus*, *eragroviruse* e *turncurtovirus* apresentam um único componente contendo todos os genes necessários para a infecção, sendo denominados como geminivírus monopartidos (Varsani *et al.*, 2009; Briddon *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2012; Hernández-Zepeda, Varsani e Brown, 2013; Heydarnejad *et al.*, 2013).

Begomovírus: Monopartido/Bipartido

Entre os geminivírus, o gênero *Begomovirus* é considerado o de maior importância econômica por causar perdas devastadoras na produção de culturas comerciais em todo o mundo, com destaque aos crescentes problemas na produção de tomate causados pelo *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) que vem se disseminando rapidamente pelo mundo (Hanssen, Lapidot e Thomma, 2010; Lefeuvre *et al.*, 2010). As espécies de begomovírus infectam

dicotiledôneas e são transmitidas de modo persistente e circulativo pela mosca-branca (*Bemisia tabaci*) (Morales e Anderson, 2001; Varma e Malathi, 2003).

O genoma dos begomovírus monopartidos é composto por um único componente com tamanho aproximado de 3 Kb que codifica as proteínas virais e as fases de leitura podem ser representadas por V1, V2, V3, C1, C2, C3 e C4. Muitos begomovírus monopartidos estão associados a moléculas de DNA- β satélite (também circular de fita-simples). Essa molécula possui um tamanho aproximado de 1,4 Kb, codificando uma única proteína, a β C1, um fator de patogenicidade (Saunders *et al.*, 2004). Já foi mostrado que DNA- β requer associação com begomovírus monopartidos para sua replicação, encapsidação viral e transmissão por vetor (Briddon *et al.*, 2001; Briddon *et al.*, 2003), mas também está associado à movimentação de begomovírus bipartido para favorecer infecção sistêmica na ausência do componente B (Saeed *et al.*, 2007).

Nos begomovírus bipartidos, o genoma é composto por dois componentes, o DNA-A e DNA-B. O componente A codifica cinco ou seis proteínas e o componente B codifica duas proteínas. O tamanho de cada um destes componentes varia de 2,5 - 2,6 Kb. No componente A (DNA-A) estão os genes que codificam proteínas envolvidas na encapsidação viral (AV1/CP), ativação transcricional e em alguns casos, supressão de silenciamento gênico (AC2/TrAP) e replicação viral (AC1/Rep e AC3/REn). Enquanto a proteína AC4 atua como supressor de silenciamento gênico em begomovírus bipartidos, a C4 atua como proteína de movimento e moduladora de sintomas em begomovírus monopartidos. A proteína AV2 está presente apenas em begomovírus do Velho Mundo e no componente B (DNA-B) estão presentes dois genes, BV1 e BC1, que codificam a proteína de movimento intracelular (NSP) e a proteína de movimento intercelular (MP), respectivamente (Jeske, 2009; Fondong, 2013). Mais recentemente, foi mostrado que a proteína essencial para a replicação viral, Rep,

também possui atividade supressora de silenciamento, interferindo na maquinaria de metilação do DNA viral (Rodriguez-Negrete *et al.*, 2013). Além disso, existe uma sequência nucleotídica de cerca de 200 pb altamente conservada entre os dois componentes que está presente dentro da região intergênica (IR). Essa região comum (CR) ancora uma pequena estrutura em forma de grampo que possui a sequência (TAATATT↓AC), origem de replicação, que é reconhecida pela proteína de replicação AC1/Rep (Revington, Sunter e Bisaro, 1989; Laufs *et al.*, 1995; Jeske, 2009).

Entre as proteínas virais, podemos destacar a AC2/TrAP, que é considerada uma proteína crucial para o estabelecimento da interação vírus-planta. Diferentes trabalhos mostraram sua multifuncionalidade, revelando sua ação como ativador da transcrição de outros genes virais, como o gene da capa proteica (AV1/CP) e o gene da proteína de movimento (BV1/NSP) (Sunter e Bisaro, 1991; 1992; 1997). A proteína AC2 também pode atuar como supressora de silenciamento gênico pela ativação de genes supressores da planta hospedeira (Trinks *et al.*, 2005) e é capaz de inativar quinases importantes para o ciclo de transmetilação e para o metabolismo celular (Hao *et al.*, 2003). Além disso, foi mostrado que AC2 ao interagir com a proteína adenosina quinase altera a resposta de citoquinina, fitohormônio que atua na proliferação celular da planta hospedeira (Baliji, Lacatus e Sunter, 2010). Mais recentemente, foi estudado o perfil global de proteínas em plantas infectadas com PVX expressando AC2, mostrando que a proteína AC2 interfere na infecção viral, modulando proteínas envolvidas em estresse oxidativo, proteínas relacionadas com patogenicidade (PRs), fotossíntese, produção de energia, entre outros (Carmo *et al.*, 2013).

***Tomato chlorotic mottle virus*: begomovírus bipartido presente no Brasil**

Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) é um begomovírus bipartido amplamente distribuído pelo Brasil, afetando as regiões produtoras de tomate e já reportado em Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (Ambrozevicius *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2003). Trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de caracterizar isolados de ToCMoV presentes no Brasil (Galvão *et al.*, 2003), mas somente em 2007, Ribeiro *et al.* (2007) reportaram pela primeira vez a sequência completa do genoma de um ToCMoV, isolado de folhas de tomate infectadas na região nordeste do Brasil (ToCMoV-[Ba-Se1]). Posteriormente, esse isolado foi alvo de estudos envolvendo silenciamento de RNA, mostrando que a infecção causada por ToCMoV induziu a geração de RNA interferente, com redução no acúmulo de DNA viral (Ribeiro, Lohuis, *et al.*, 2007). Fontenelle *et al.* (2007) também caracterizaram um isolado de ToCMoV, o ToCMoV- [MG-Bt], no qual o DNA-A apresenta uma propriedade biológica peculiar de causar infecção sistêmica em *Nicotiana benthamiana* na ausência do DNA-B. Foi verificado que o DNA-A também infectou tomate e outras plantas hospedeiras, como também demonstrou que a capa proteica é requerida para a movimentação sistêmica do ToCMoV- [MG-Bt].

O begomovírus ToCMoV que é amplamente disseminado pelo país, vem sendo utilizado como alvo de estudos na tentativa de responder questões relacionadas com o mecanismo de ação do vírus sobre fatores da planta hospedeira. Até o momento, pouca informação sobre a visão global das vias metabólicas envolvidas durante o processo de infecção foi relatada. Por isso, é importante a busca por novas tecnologias que possam esclarecer esses mecanismos de interação planta-vírus.

Genes de resistência a begomovírus presente em tomate

Segundo a teoria gene-a-gene, uma planta pode ser resistente a um determinado patógeno através de uma herança monogênica, sendo que essa resistência é resultante da interação entre um gene de avirulência dominante (Avr) do patógeno e um gene de resistência dominante (R) no hospedeiro (Flor, 1971). No processo de interação patógeno-hospedeiro, moléculas proteicas receptoras são sintetizadas por genes de resistência (R) do hospedeiro e interagem de forma específica com moléculas elicitoras específicas do patógeno (Quirino e Bent, 2003). Quando o hospedeiro reconhece a molécula elicitora do patógeno, é desencadeada uma resposta de defesa (Gachomo, Shonukan e Kotchoni, 2003).

Doenças causadas por begomovírus são muito difíceis de serem controladas e medidas preventivas, como o uso frequente de inseticidas são adotadas na tentativa de combater o inseto vetor (mosca-branca). Porém, o uso desses produtos químicos é oneroso, além de poluir o meio ambiente e induzir o desenvolvimento de resistência (Horowitz *et al.*, 2002). Com base nesse cenário, a melhor opção no controle desses vírus vem sendo a busca por cultivares resistentes.

Os danos causados por geminivírus à cultura de tomate têm levado a uma crescente busca por fontes de resistência para serem utilizadas em programas de melhoramento e no desenvolvimento de cultivares de tomate resistentes. Trabalhos foram realizados visando a introgressão de genes de resistência de espécies selvagens (Solanáceas) para a obtenção de linhagens de tomateiro mais resistentes. Zamir *et al.* (1994) desenvolveram linhagens de tomate tolerantes ao Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) pela introgressão do gene *Ty-1* da espécie selvagem *S. chilense*. Esse gene apresenta dominância parcial e confere resistência a begomovírus monopartidos e bipartidos. Assim como o gene *Ty-1*, o locus *Ty-2* também foi

introgridido da espécie selvagem, *S. hirsutum*, conferindo resistência ao TYLCV (Hanson *et al.*, 2000; Hanson, Green e Kuo, 2006). Além disso, outros genes de resistência a TYLCV foram identificados, *Ty-3*, *Ty4* e *Ty-5* (Ji, Schuster e Scott, 2007; Anbinder *et al.*, 2009; Ji, Scott e Schuster, 2009). Mais recentemente, Verlann *et al.* (2013) caracterizaram os genes de resistência *Ty-1* e o *Ty-3* do begomovírus TYLCV e mostraram que, na verdade, eles são alelos que codificam uma RNA polimerase dependente de RNA. Outros trabalhos buscaram identificar genes de resistência associados a outros begomovírus. Bian *et al.* (2007) identificaram o gene recessivo, *tgr-1*, que confere alta resistência ao begomovírus monopartido Tomato leaf curl virus (TLCV).

No Brasil foram detectadas fontes de resistência a isolados de begomovírus bipartidos em diversos acessos de espécies selvagens de tomate (Santana *et al.*, 2001). A linhagem TX-468-RG de *S. lycopersicum* foi alvo de estudo genético que revelou a presença de um *locus* recessivo, nomeado como *tcm-1*. Esse *locus* apresenta resistência ampla a diferentes begomovírus bipartidos (Giordano *et al.*, 2005) e a monopartidos (Garcia-Cano *et al.*, 2008). Entretanto, nenhuma informação sobre os possíveis mecanismos associados ao gene de resistência *tcm-1* foi relatada. Recentemente, foi desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, uma linhagem de tomateiro contendo esse gene. Estudos são necessários para tentar esclarecer como essa resistência atua sobre as vias metabólicas da planta hospedeira durante a infecção viral por begomovírus. Para isso, uma das ferramentas que vem sendo muito aplicada em estudos de interação patógeno-hospedeiro é a proteômica.

Proteômica baseada em gel (2-DE)

A proteômica é o conceito dado à análise sistemática, em larga escala, que visa caracterizar proteínas expressas em um determinado período biológico, funcionando como uma ferramenta complementar em estudos associados à biologia molecular.. Trata-se de uma ferramenta que busca estudar as proteínas totais expressas em um determinado sistema, seja pela abundância, atividade, modificações pós-traducionais ou pela interação entre elas (Wright *et al.*, 2012). A proteômica pode ser dividida em duas abordagens: proteômica *top-down* e proteômica *bottom-up*. A proteômica *top-down* investiga proteínas intactas, preservando suas características bioquímicas e modificações. Nesta abordagem, é possível deduzir a estrutura primária da proteína e grande parte das modificações pós-traducionais (Salvato e Carvalho, 2010). Já a proteômica *bottom-up* é focada na análise de peptídeos digeridos, a partir da clivagem de proteínas, por espectrometria de massa (MS). Além disso, essa abordagem utiliza ferramentas de cromatografia e estratégias eletroforéticas para auxiliar na separação das proteínas que estão sendo analisadas (Bogdanov e Smith, 2005; Gevaert *et al.*, 2007). A eletroforese bidimensional (2-DE) é uma técnica já bem estabelecida e rotineiramente utilizada para análises proteômicas (Görg, Weiss e Dunn, 2004; López, 2007). Essa técnica surgiu em meados dos anos 70 (Klose, 1975; O'farrell, 1975), mas foi nos anos 90, com o surgimento do termo “proteômica” (Wilkins *et al.*, 1997) que a eletroforese 2-DE passou a ter uma maior aplicação em estudos de larga escala de proteínas expressas. A técnica consiste na focalização isoeletrica e separação pela massa molecular da proteína. Na focalização isoeletrica (primeira dimensão), as proteínas são separadas até atingirem o ponto isoeletrico, no qual a carga líquida da proteína é zero. Essas proteínas são submetidas à eletroforese em gel desnaturante e são separadas de acordo com sua massa molecular. A

visualização dessas proteínas pode ser feita por diferentes métodos como marcação por moléculas fluorescentes ou radioativas, nitrato de prata e azul de 'coomasie colloidal'. Todos esses métodos apresentam vantagens e desvantagens, sendo geralmente o azul de 'coomasie colloidal', o mais utilizado (Monteoliva e Albar, 2004; Santos, Teixeira e Sá-Correia, 2004; Bezerra J. *et al.*, 2013). A identificação e quantificação de proteínas podem ser feitas pela associação da técnica de 2-DE à espectrometria de massa (MS). Já a quantificação das proteínas é realizada utilizando programas específicos que permitem alinhar as proteínas (*spots*) de cada gel e permite medir suas intensidades. O cálculo para quantificar uma determinada proteína é baseado no volume desse *spot* e uma análise estatística valida as proteínas diferencialmente expressas. Essas proteínas são excisadas do gel, digeridas com tripsina e identificadas por MS .

A técnica de 2-DE é muito aplicada em proteômica vegetal, podendo ser utilizada na detecção de proteínas expressas em resposta a estresses abióticos e bióticos e bastante empregada na investigação de proteínas envolvidas na interação planta-patógeno. Franco *et al.* (2010) identificaram proteínas diferencialmente expressas em raízes infectadas com o nematóide *Meloidogyne paranaensis* e *M. incognita* por 2-DE. Villeth *et al.* (2009) também identificaram proteínas exclusivas envolvidas na interação entre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e uma cultivar resistente de *Brassica oleracea*. Além disso, a aplicação desta técnica se estende a estudos envolvendo interação vírus-planta. Casado-Vela *et al.* (2006) identificaram em fruto de tomate, proteínas virais do tobamovirus Tobacco mosaic virus (TMV) e proteínas potencialmente envolvidas na defesa contra a infecção viral. Kundi *et al.* (2011) avaliaram a resistência de *Vigna mungo* infectada com o begomovírus Mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) após tratamento com ácido salicílico (SA) e revelaram proteínas diferencialmente expressas em resposta ao SA. Mais recentemente, Carmo *et al.*

(2013) mostraram que a proteína viral AC2 do begomovírus Tomato chlorotic mottle virus interfere na infecção viral, modulando proteínas envolvidas no processo de defesa, pelo aumento de expressão de proteínas relacionadas com estresse oxidativo e proteínas relacionadas com a patogenicidade (Capítulo I desta tese).

Por décadas, a técnica 2D-PAGE (2-DE) foi considerada uma ferramenta poderosa na detecção de proteínas presentes em uma amostra biológica complexa (O'farrell, 1975). Entretanto, esta abordagem apresenta limitações que envolvem desde a dificuldade na separação de proteínas presentes em ponto isoelétricos extremos, e necessidade de grandes quantidades de proteínas, como também o fato de não permitir a integração, de forma 'on-line', a um sistema de espectrometria de massa (Wang e Hanash, 2003; Tang *et al.*, 2008). Apesar destas limitações, a abordagem de 2-DE ainda é uma técnica proteômica muito utilizada em estudos de interação planta-vírus.

Proteômica independente de gel (2D-LC-MS/MS)

Para superar as limitações apresentadas pela técnica de 2-DE, novas tecnologias que utilizam a abordagem proteômica independente de gel foram desenvolvidas. Nesta abordagem, a identificação de proteínas em misturas complexas é feita pela combinação de diferentes estratégias de fracionamento associado à espectrometria de massa (Abdallah *et al.*, 2012). Entre elas, destaca-se a MudPIT (*multidimensional proteins identification technology*). Essa tecnologia é considerada rápida e sensível na identificação de proteínas de misturas complexas, utilizando cromatografia líquida multidimensional acoplada à espectrometria de massa para separar e fragmentar peptídeos (Link *et al.*, 1999; Wolters, Washburn e Yates, 2001). As proteínas são posteriormente identificadas a partir dos espectros gerados por MS que são

comparados com espectros teóricos de sequências disponíveis em bancos de dados (Wang e Hanash, 2003).

A tecnologia MudPIT (2D-LC-MS/MS) também vem sendo aplicada em análises proteômica de plantas. Schneider *et al.* (2012) buscaram compreender o comportamento fisiológico de plantas submetidas a excesso de zinco (Zn) através da identificação de proteínas em *Noccaea caerulea*. Komatsu *et al.* (2006) também utilizaram esta metodologia e identificaram proteínas moduladas por giberelina em arroz. Essa abordagem também vem sendo utilizada em estudos de fitopatógenos, causadores de doenças de grande impacto para a agricultura, como o cancro cítrico. Por 2D-LC-MS/MS, foi possível obter o primeiro mapa proteômico da mais agressiva linhagem de *Xanthomonas* patogênica para a laranja (Soares *et al.*, 2010). Bringans *et al.* (2009) estudaram outro fitopatógeno de importância econômica, o fungo *Stagonospora nodorum*. Esses autores validaram mais de 2000 genes desse fungo por análise comparativa de peptídeos gerados por 2D-LC-MS/MS.

Entretanto, ainda são poucos os trabalhos que aplicaram a técnica 2D-LC-MS/MS na identificação de proteínas de plantas submetidas a estresses (Kristensen *et al.*, 2004; Larrainzar *et al.*, 2007). Recentemente, Rodrigues *et al.* (2012) utilizou a 1D-LC-MS/MS para identificar proteínas diferencialmente expressas em mamão infectado com Papaya mealeira virus, mas não há outros relatos envolvendo a utilização da técnica de 2D-LC-MS/MS em estudos de interação planta-vírus. Há uma crescente necessidade de compreender melhor os processos moleculares envolvidos em estresses bióticos e abióticos que afetam culturas de importância econômica, e a utilização dessa ferramenta poderá esclarecer os mecanismos envolvidos na resposta da planta a esses estresses.

É importante ressaltar que somente a identificação de proteínas expressas em um sistema biológico não é suficiente para responder às questões biológicas. Para permitir uma me-

lhor interpretação dessas interações é necessária uma abordagem quantitativa das proteínas identificadas (Panchaud *et al.*, 2008). Para isso, diferentes métodos têm sido aplicados para quantificar proteínas de misturas complexas, mas a aplicação de cada um desses métodos irá depender da forma como será abordada a análise quantitativa e o analisador de massa a ser utilizado (Bantscheff *et al.*, 2007). Essa análise quantitativa pode ser determinada de duas formas: absoluta ou relativa. Na primeira, a quantidade absoluta de cada proteína presente em uma mistura pode ser determinada. Enquanto que na segunda abordagem, avalia-se a mudança nos níveis de expressão das proteínas identificadas entre duas condições biológicas diferentes (Panchaud *et al.*, 2008; Cox e Mann, 2011). Uma variedade de estratégias pode ser aplicada nessa forma de quantificação, podendo ser categorizadas em "stable-isotope-labeling" e "label-free" (Thelen e Peck, 2007; Schulze e Usadel, 2010). Entretanto, cada uma dessas estratégias apresentam vantagens e limitações que devem ser avaliadas durante a definição do desenho experimental. A abordagem quantitativa "label-free" vem se tornando muito popular por ser uma estratégia mais simples e barata quando comparada às outras técnicas (Thelen e Miernyk, 2012). Nos últimos anos, uma nova abordagem quantitativa denominada MS^E vem sendo utilizada, que consiste em um método de quantificação *label-free* baseada na aquisição independente de dados (DIA). Neste método, há alternância de duas condições de energia de colisão, no qual os peptídeos intactos são detectados em baixa energia e os fragmentos iônicos são gerados em alta energia de colisão. Essa abordagem permite que a fragmentação dos peptídeos ocorra sem isolamento prévio do peptídeo precursor. Para correlacionar os fragmentos iônicos com seus correspondentes peptídeos precursores, são levados em consideração o tempo de retenção, a acurácia de massa e outras propriedades físico-químicas dos peptídeos (Levin, Hradetzky e Bahn, 2011; Murad *et al.*, 2011).

No geral, a análise proteômica baseada em técnicas independente de gel tem mostrado ser uma ferramenta poderosa na identificação de potenciais alvos com aplicação biotecnológica, mas possui limitações quando envolve misturas complexas. Segundo Baggerman *et al.* (2005), durante a análise MudPIT, apenas parte dos peptídeos obtidos da digestão de uma amostra complexa é selecionada aleatoriamente para fragmentação. Isso significa que a reprodutibilidade da análise é baixa, uma vez que, a repetição da análise dessa amostra pode gerar diferenças na lista de proteínas identificadas. Além disso, técnicas independentes de géis também não discriminam isoformas de uma proteína baseadas em um único peptídeo tríptico. Assim, como na técnica de 2-DE, a presença de uma grande quantidade de determinadas proteínas pode ocasionar um mascaramento de outras proteínas menos abundantes e levar a identificação de um número menor de proteínas (Morel *et al.*, 2006). Apesar dessas limitações, essa abordagem tem provado ser mais rápida que métodos que utilizam análise em géis. Avanços tecnológicos dessa metodologia tem permitido uma melhora na eficiência de identificação e análise comparativa de proteínas presentes em misturas complexas, possibilitando até a detecção de modificações pós-traducionais na proteína. (Delahunty e Yates, 2005).

JUSTIFICATIVA

Devido à diversidade de pragas que atinge a cultura do tomate, em especial os begomovírus, tornou-se necessária a busca por linhagens de tomateiros resistentes a esses patógenos. No Brasil, programas de melhoramento têm visado à seleção de genótipos resistentes a esses fitovírus. Recentemente, foi possível identificar o gene de resistência denominado *tcm-1* (Garcia-Cano *et al.*, 2008). Entretanto, informações sobre os mecanismos de resistência envolvidos na interação begomovírus–hospedeiro tanto em plantas modelo, como em tomateiro são limitadas. Como forma de obter e gerar mais dados sobre esses mecanismos, foram utilizadas duas abordagens proteômicas nesse estudo: a eletroforese bidimensional (2-DE), amplamente aplicada em estudos na área vegetal e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (MudPIT) que vem sendo utilizada como alternativa à técnicas proteômicas baseadas em gel. A interação ToCMoV-planta hospedeira foi analisada utilizando essas abordagens como tentativa de obter uma ampla cobertura proteômica sobre as vias metabólicas afetadas durante à infecção viral.

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi investigar a interação planta hospedeira-*Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), visando compreender os mecanismos de virulência do patógeno e resistência da planta.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar proteínas moduladas pelo fator de virulência AC2 do begomovírus ToCMoV em planta hospedeira modelo utilizando as ferramentas de eletroforese bidimensional.
- Identificar proteínas de tomateiro contendo o *locus tcm-1* envolvidas na defesa e/ou resistência ao begomovírus ToCMoV, utilizando cromatografia multidimensional acoplada à espectrometria de massa.

HIPÓTESE

As interações begomovírus / hospedeiros (suscetíveis ou resistentes) apresentam um padrão diferenciado de expressão proteica proveniente da interação entre proteínas virais e proteínas envolvidas na resistência da planta hospedeira.

CAPÍTULO I

Identificação de proteínas do hospedeiro reguladas pelo fator de virulência AC2 de Tomato chlorotic mottle virus em *Nicotiana benthamiana* (Identification of host proteins regulated by the virulence factor AC2 of Tomato chlorotic mottle virus in *Nicotiana benthamiana*)

Este capítulo foi publicado com pequenas modificações como:

Lilian Silveira Travassos Carmo, Renato Oliveira Resende, Luciano Paulino Silva, Simone Graça Ribeiro and Angela Mehta. (2013). Identification of host proteins modulated by the virulence factor AC2 of Tomato chlorotic mottle virus in *Nicotiana benthamiana*. **Proteomics 13:1947–1960.**

RESUMO

O tomate, uma das culturas mais importantes no mundo, é severamente afetado por begomovírus bipartidos como o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). Para os begomovírus, durante o processo de infecção, o fator de virulência AC2 é considerado crucial para o sucesso da interação vírus-planta e é conhecido por atuar como fator transcricional nas células infectadas. Em alguns begomovírus, AC2/ TrAp pode também atuar como uma proteína supressora de silenciamento. Entretanto, as funções da proteína AC2 do ToCMoV ainda não foram determinadas. O objetivo deste trabalho foi identificar as proteínas diferencialmente expressas na planta modelo *Nicotiana benthamiana* em resposta à expressão do gene AC2, isolado de ToCMoV. Plantas de *N. benthamiana* foram inoculadas com *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor viral Potato virus X (PVX) e com a construção PVX-AC2. Eletroforese bidimensional foi realizada e as proteínas foram identificadas por espectrometria de massa. Os resultados mostraram que a expressão da proteína AC2 de ToCMoV alterou diversas proteínas importantes para o desenvolvimento normal da planta, causando um desequilíbrio na homeostase celular. Os resultados obtidos revelaram o efeito de AC2 na modulação dos processos de defesa da planta pelo aumento da expressão de várias proteínas relacionadas com estresse oxidativo e patogenicidade, bem como, seu papel na modulação do proteoma do hospedeiro envolvido na fotossíntese e na produção de energia.

Palavras-Chave: interação planta-vírus, expressão diferencial, ToCMoV

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicon*) é uma das principais hortaliças cultivadas em todo o mundo sendo severamente afetado por vários patógenos como, nematóides, fungos, bactérias e vírus. Entre os vírus, destacam-se os geminivírus, pertencentes ao gênero *Begomovirus* (família *Geminiviridae*), que são transmitidos por mosca branca e afetam a produção de tomate em vários países (Varma e Malathi, 2003), incluindo o Brasil, onde as perdas podem variar de 40% a 100% (Faria *et al.*, 2000). Na tentativa de minimizar os prejuízos causados por esses vírus, uma caracterização dos begomovírus presentes nas regiões de cultivo de tomate no Brasil foi realizada. Os resultados revelaram um grupo altamente diversificado e filogeneticamente distante de begomovírus reportados em outros países (Castillo-Urquiza *et al.*, 2008; Albuquerque *et al.*, 2012). *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) é uma das cinco espécies de begomovírus predominante em várias áreas de cultivo de tomateiro no Brasil. O controle de begomovírus é feito através da aplicação de pesticidas contra a mosca branca, mas são métodos onerosos e pouco eficientes. O desenvolvimento de tomateiros resistentes parece ser a melhor alternativa a ser usada, juntamente com o manejo de mosca branca/begomovírus. Entretanto, a compreensão da interação entre ToCMoV e a planta hospedeira suscetível e/ou resistente é essencial para estabelecer com maior eficiência as estratégias de manejo da doença.

O fator de virulência AC2, isolado de diferentes geminivírus, é considerado crucial para o sucesso da interação entre o vírus e a planta hospedeira. O gene AC2 codifica a proteína multifuncional AC2 (também chamada C2, AL2 e TrAp), que está presente em todos os membros do gênero *Begomovirus*. A proteína AC2 pode ser encontrada no núcleo e no citoplasma das células infectadas do hospedeiro (Wang *et al.*, 2003; Yang, X. *et al.*, 2007) e é

conhecida por ativar a transcrição de outros genes virais, como a capa proteica e a proteína de movimentação intracelular (nuclear shuttle protein-NSP) (Sunter e Bisaro, 1991; 1992). Além disso, a proteína AC2 de alguns begomovírus pode atuar como supressor de silenciamento gênico pela ativação da transcrição de genes supressores de silenciamento (Trinks *et al.*, 2005) ou pela inativação da adenosina quinase, que é importante para vários processos como o ciclo de transmetilação, na expressão gênica de resposta primária à citocinina (Baliji, Lacatus e Sunter, 2010) e inativação da quinase não fermentadora de sacarose (*sucrose non-fermenting 1 kinase*) (Hao *et al.*, 2003).

A proteína viral AC2 pode desempenhar um papel na inibição do processo de metilação, um importante mecanismo de defesa de plantas hospedeiras contra infecção viral (Raja *et al.*, 2008; Lozano-Duran e Bejarano, 2011). AC2 também pode interferir na expressão de reguladores de vários processos celulares, como as SCFs (Skp1/Cullin1/F-box) que são proteínas associadas à ubiquitinação (Lozano-Duran e Bejarano, 2011). Foi relatado também que AC2 pode aumentar a suscetibilidade de plantas hospedeiras infectadas por vírus (Sunter, Sunter e Bisaro, 2001).

Apesar das várias informações a respeito da multifuncionalidade de AC2, ainda é limitado o conhecimento sobre a função da proteína AC2 do begomovírus ToCMoV ou seu efeito sobre a expressão global de proteínas da planta hospedeira. Além disso, a função de AC2 do ToCMoV como supressor de silenciamento ainda não foi demonstrada.

Uma das estratégias frequentemente usada para analisar o efeito de uma determinada proteína em planta é através de expressão heteróloga usando vetores virais, como o *Potato virus X* (PVX) e o *Tobacco mosaicvirus* (TMV) (Chapman, Kavanagh e Baulcombe, 1992). Lacorte *et al.* (Lacorte *et al.*, 2010) construíram versões desses dois vetores virais compatíveis com a tecnologia Gateway, mostrando que genes de interesse são eficientemente clonados por

recombinação e expressos com sucesso. Essa abordagem foi utilizada em vários estudos e mudanças no perfil de transcrição foram relatadas. Amin *et al.* (2011) mostraram que a expressão transiente de genes de diferentes begomovírus, incluindo o gene C2, alteraram o fenótipo das plantas de *N. benthamiana*, como também modularam os níveis de miRNA. De forma semelhante, Hong *et al.* (1997) usaram o vetor viral PVX para avaliar o efeito do gene AC2 isolado de African cassava mosaic virus (ACMV) em plantas modelo transgênicas de *N. benthamiana*, mostrando o potencial desse sistema para investigação funcional de AC2 em plantas.

Embora culturas como *Phaseolus vulgaris* e tomate (Luna *et al.*, 2012) e plantas modelo de *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana spp.* terem sido usadas em estudos funcionais de genes virais (Baliji, Lacatus e Sunter, 2010), *N. benthamiana* é considerada a melhor escolha para investigações de interação planta-patógeno, uma vez que apresenta regiões genômicas homólogas a outras solanáceas de importância econômica, como tomate, batata e pimenta. Além disso, *N. benthamiana* é suscetível a diversos patógenos, incluindo bactéria e vírus, entre outros (Goodin *et al.*, 2008). Foi demonstrado que *N. benthamiana* é uma eficiente hospedeira para estudos envolvendo indução de silenciamento gênico por vírus e expressão transiente de proteína (Voinnet *et al.*, 2003; Senthil-Kumar e Mysore, 2011).

Neste presente estudo, a planta modelo *N. benthamiana* e o vetor viral PVX foram utilizados para a análise do efeito da proteína AC2 do begomovírus ToCMoV no perfil global de proteínas da planta hospedeira, na tentativa de compreender melhor as mudanças moduladas por esse fator de patogenicidade. Foi observado que a proteína AC2 interfere em vários processos celulares, com maior efeito sobre a homeostase celular da planta hospedeira, causando estresse oxidativo e o aumento na expressão de proteínas relacionadas com defesa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Vetor viral, material vegetal e inoculação

A construção do vetor PVX-AC2, usada neste estudo, foi previamente obtida (Ribeiro, S. G., 2006). Resumidamente, o gene AC2 foi amplificado por PCR a partir de um clone infeccioso de ToCMoV (Ribeiro, Martin, *et al.*, 2007) com oligonucleotídeos específicos contendo sequências que flanqueiam os sítios de attB para permitir a clonagem pelo sistema Gateway® (Invitrogen). O fragmento de PCR foi introduzido por recombinação BP no plasmídeo pDonr 207 usando o mix de enzima BP-clonase II (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, a reação de recombinação LR foi feita no vetor de destinação compatível com a tecnologia Gateway, PVX-GW (Lacorte *et al.*, 2010), originando o PVX-AC2 (Figura 1.1).



Figura 1.1. Diagrama do vetor PVX-AC2. CaMV35S: promotor *Cauliflower mosaic virus* 35S (CaMV35S); Replicase: RNA - dependente de PVX RNA polimerase; TGB:PVX triplo bloco gênico; AC2: gene AC2 do Tomato chlorotic mottle virus; CP: capa proteica de PVX; T-nos: sequência terminadora nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens*; attB1 e attB2: sítios de recombinação Gateway; LB e RB: bordas esquerda e direita do T-DNA.

Plantas de *N. benthamiana*, apresentando 3-4 folhas verdadeiras, foram usadas para inoculação com *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 contendo PVX-AC2 e o vetor PVX vazio como controle. Duas folhas foram perfuradas ao redor da nervura central com palito de dente mergulhado em cultura bacteriana (Bucher *et al.*, 2004). Folhas da região apical foram

coletadas 5,10,15 e 17 dias após a inoculação (dai) para extração de proteína e RNA e os sintomas foram monitorados durante este período (Figura 1.2 e 1.3).

2.2. Extração de RNA e análise por RT-PCR

Folhas de *N. benthamiana* inoculadas com PVX-AC2 e PVX coletadas 5,10,15 e 17 dai foram maceradas em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído usando RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acordo com o manual do fabricante. Para a síntese de cDNA, aproximadamente 2µg de RNA total foram misturados com 500 ng de oligo d(T)primer e 0.5 mM dNTP, com incubação por 5 min. a 65°C. Um microlitro de Superscript Reverse Transcriptase II (200 U/µL), 1X First strand buffer (Invitrogen) e 10 mM DTT foram adicionados e a reação foi incubada por 60 min. a 42°C, seguida por mais 15 min. de incubação a 70 °C. Para as reações de PCR foram utilizados primers específicos para capa proteica de PVX (CP) (forward: ATGTCAGCACCAGCTAGCAC e reverse: GTTATGGTGGTGGTAGAGTG) e para o gene AC2 de ToCMoV (forward: 5'-GGTACCGCGCGGCCGCATGCGCAATTCATCTT-3' e reverse: 5'-GTCGACGCGGCCGCCTATTTAAATATGTCATCCC-3'). Um total de 0.5 µL de cDNA sintetizado, 0.15µM de cada primer, 150 µM dNTP, 1 U Taq DNA polimerase e 1X de tampão correspondente (Invitrogen) foram usados para as reações de PCR nas seguintes condições: 4 min. a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, com extensão final de 4 min. a 72°C. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose a 1% e depois visualizados por coloração com brometo de etídio sob luz UV.

2.3. Extração de proteínas

Proteínas totais foram extraídas de aproximadamente 2 mg de tecido vegetal macerado. Somente plantas infectadas foram usadas para extração de proteínas. Dois experimentos

biológicos foram realizados e pelo menos cinco géis de cada amostra foram obtidos. Proteínas foram extraídas de acordo com Mot & Vanderleyden (1989) pela adição de 750 µL de tampão de extração (0,7 M sacarose, 0,5 M Tris-HCl, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl, e 40 mM DTT) ao material vegetal macerado e o mesmo volume de fenol. As amostras foram agitadas por 15 min. e centrifugadas por 3 min a 12 000 rpm. A fase superior foi transferida para um novo tubo e duas novas extrações foram feitas com o tampão de extração. As proteínas foram precipitadas em 0,1 M de acetato de amônio (em metanol), lavadas com acetona 80% e ressuspendidas em tampão de solubilização (7 M uréia; 1 M tiouréia; 4% m/v CHAPS; 2% IPG tampão pH 3–10 NL; 40mM DTT). Para a quantificação, foi utilizado o reagente Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad), de acordo como manual do fabricante.

2.4. Western blot

Para a análise de Western Blot, proteínas foram extraídas de aproximadamente 1 mg de tecido macerado das amostras coletadas em 5, 10, 15 e 17 dai. Aproximadamente 40µg de proteínas totais foram submetidas à SDS-PAGE usando gel de poliacrilamida a 12%. As amostras foram transferidas para membranas de PVDF (Hybond-P/GE Healthcare Life Sciences), a qual foi bloqueada com leite a 5% em PBS-T (68 mM NaCl, 58 mM Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄ pH 7.4 e 0,1% v/v Tween-20) por 24 h a 4°C e lavadas duas vezes com leite a 0,5% em PBS-T por 10 min. As membranas foram incubadas por 2 h a temperatura ambiente com anticorpo primário anti-capa proteica de PVX (diluído 1:2500 com leite a 0,5% em PBS-T) e anti-Tomato golden mosaic virus (TGMV) AC2 (diluído 1:2000 em leite a 0,5% em PBS-T). Após duas lavagens com leite a 0,5% em PBS-T, foi adicionado o anticorpo secundário anti-RabbitIgG (Sigma) conjugado com a fosfatase alcalina, diluído 1:10000 em leite a

0,5% em PBS-T, e as membranas foram incubadas por 1h a temperatura ambiente. Novamente, as membranas foram lavadas com leite a 0,5% em PBS-T e a imunodeteção foi realizada utilizando as pastilhas SIGMAFAST™ BCIP® (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium/ Sigma) dissolvida em 10 mL de água.

2.5. Técnica 2-DE e análise de imagem

Tiras de gel de poliacrilamida (Immobiline DryStrips, 13 cm, pH 3–10 NL) foram hidratadas com 280µL de tampão de rehidratação (com traços de azul de bromofenol) contendo aproximadamente 600µg de proteínas por 16 h. A primeira dimensão foi realizada em um sistema de eletroforese MultiphorII (GE Healthcare), de acordo com o manual do fabricante (fase 1: 300 V, 2 mA, 5 W, 0:01 h; fase 2: 3500 V, 2 mA, 5 W, 1:30 h; fase 3: 3500 V, 2 mA, 5 W, 4:00 h). As tiras foram deixadas em tampão de equilíbrio (1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 6 M Uréia; 30% Glicerol; 2% SDS; 1% azul de bromofenol) com 1 M DTT por 15 min, seguido por mais 15 min no mesmo tampão contendo 2,5% de iodoacetamida. A segunda dimensão foi realizada em SDS-PAGE usando géis de poliacrilamida a 13% e marcador de massa molecular “Benchmark Protein Ladder” (Invitrogen).

As proteínas foram coradas com Coomassie Blue G-250 e os géis, em replicatas, foram digitalizados com o ImageScanner III (GEHealthcare). Três géis de cada condição que mostraram alta resolução e homogeneidade no padrão eletroforético foram selecionados e usados para a análise de dados e imagem no programa Image Master 2D Platinum version 7.05 (GE Healthcare). As proteínas foram automaticamente detectadas, seguido por edição manual para melhorar a detecção e eliminar possíveis artefatos da técnica. O alinhamento e a detecção de proteínas foram checados manualmente. As proteínas foram aceitas como sendo diferencialmente expressas, quando apresentaram alteração na expressão de 1,5 vezes e as

diferenças foram significativas por teste *t*-Student com um nível de significância de 95%. A análise de imagem foi realizada levando em consideração a reprodutibilidade e somente proteínas presentes em duas das três replicatas foram consideradas para análise de expressão diferencial.

2.6. Identificação de proteínas por MS

Os fragmentos do gel, contendo as proteínas diferencialmente expressas, foram lavados por 15 min em acetonitrila a 50% e 25 mM bicarbonato de amônio e então desidratadas com acetonitrila a 100% por 10 min (Shevchenko *et al.*, 1996). Esses fragmentos foram reidratados em 15 µL de 0,1 µg/µL de solução de tripsina (trypsin Sequencing Grade, Promega) preparada em 50 mM NH₄HCO₃ e incubada a 37° C por 22 h. Após a digestão, 1 µL desta solução foi misturada com 1 µL de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL em acetonitrila a 50% e ácido trifluoracético a 0,1%) e aplicada manualmente na placa de MALDI. Os peptídeos foram analisados em espectrometro de massa UltraFlex III ou Auto-Flex Speed MALDI TOF-TOF (Bruker Daltonics) operado em modos refletor positivo (MS) e LIFTTM (MS/MS).

As listas dos picos representativos dos peptídeos trípticos foram geradas pelo programa FlexAnalysis 3.3 (BrukerDaltonics). Todas as listas de picos correspondentes a MS e MS/MS foram individualmente confrontadas com o sistema de buscas MASCOT (Matrix Science, UK) através do banco de dados de proteínas do NCBI^{Inr} e taxonomia Viridiplantae. A tolerância de massa usada nas buscas foi de 150 ppm e apenas a perda de uma clivagem foi permitida. Modificações fixa e variável foram definidas como carbamidometilação de resíduos de cisteína e oxidação de resíduos de metionina, respectivamente.

O valor de corte para a probabilidade baseada em pontuação MOWSE, calculada pelo MASCOT (com $p < 0.05$), foi usado para aceitar a identificação. Para os dados de MS/MS, a tolerância peptídica foi de 150 ppm e a tolerância de massa de íons igual a 0.6 Da, apenas uma perda de clivagem foi permitida e fragmentos ionizados com carga igual a +1 foram considerados. Quando o pI e a massa molecular das proteínas correspondentes não estavam disponíveis, esses valores foram calculados através da ferramenta 'Compute pI/Mw' do portal ExPASy (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas AC2 de vários begomovírus já foram estudadas e algumas descritas como supressoras de silenciamento gênico (Selth, Randles e Rezaian, 2004; Vanitharani *et al.*, 2004; Trinks *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2012). Embora a função supressora de silenciamento da proteína AC2 de ToCMoV ainda não tenha sido estabelecida, foi demonstrado que PVX expressando AC2 de ToCMoV provoca sintomas acentuados em tomateiros, assim como em plantas de *N. benthamiana* e *Datura stramonium* (Ribeiro, S. G., 2006). Estes resultados indicam que AC2 de ToCMoV é um determinante de patogenicidade, uma característica comum a várias proteínas virais supressoras de silenciamento (Voinnet, 2005). Sintomas similares foram relatados quando o gene C2 do Tomato leaf curl virus (TLCV) foi expresso em plantas de *N. benthamiana* (Selth, Randles e Rezaian, 2004), mostrando que esse gene tem um papel importante na patogenicidade.

Neste estudo, foi analisado o perfil proteômico de plantas de *N. benthamiana* inoculadas com o vetor viral PVX expressando a proteína AC2 do begomovírus ToCMoV visando entender melhor o efeito deste fator de patogenicidade na expressão global de

proteínas da planta hospedeira. Os sintomas de *N. benthamiana* inoculadas com *A. tumefaciens* contendo os vetores PVX-AC2 e PVX (controle) foram comparados aos 5, 10, 15 e 17 dai (Figura 1.2). Plantas inoculadas com PVX mostraram sintomas leves, enquanto que plantas inoculadas com PVX-AC2 apresentaram clorose e lesões necróticas, encrespamento e necrose sistêmica (Figura 1.3), como observado anteriormente (Ribeiro, S. G., 2006). A confirmação da infecção e expressão de AC2 foi também realizada por RT-PCR usando ‘primers’ específicos para CP de PVX e AC2 de ToCMoV (Figura 1.4). A análise de RT-PCR mostrou que os mRNAs de CP e AC2 foram observados aos 5 dai com aumento de intensidade aos 10, 15 e 17 dai. Embora os níveis de mRNA de AC2 tenham sido mais baixos em 17 dai, quando comparado a 15 dai, os resultados mostram que AC2 é expressa nos estágios iniciais da infecção e seus níveis aumentam durante o desenvolvimento da doença.

A expressão da proteína AC2 foi também analisada por Western Blot (Figura 1.4). Os resultados mostram que a proteína AC2 pôde ser observada em 15 dai, o que está de acordo com os resultados de RT-PCR, que mostram a detecção de mRNAs de AC2 em 5 dai. Embora a proteína AC2 tenha sido observada apenas aos 15 dai, é provável que esta proteína esteja presente numa fase anterior em baixas concentrações e que a capacidade de detecção por Western blot não tenha sido suficiente para permitir a sua visualização. Além disso, o anticorpo utilizado foi desenvolvido contra a proteína AC2 de outro vírus (TGMV), o qual possui, 70% de identidade com a sequência da proteína AC2 de ToCMoV (Figura 1.4). É possível que os níveis baixos de detecção também possam ser devido à menor especificidade do anticorpo.

Em relação à resposta da planta, é provável que, mesmo uma baixa concentração da proteína AC2 desencadeie respostas do hospedeiro e cause alterações na expressão proteica. Este fato levanta a questão sobre o ponto de amostragem ideal para a análise de expressão na

planta hospedeira. A decisão sobre o estágio de infecção da planta a ser analisado é controverso e ainda representa um desafio, uma vez que o momento exato em que a planta começa a responder ao patógeno não é conhecido. Além disso, é preciso observar as limitações na detecção dessas mudanças. Em fases iniciais, por exemplo, a quantidade de tecido infectado ainda é limitada e provavelmente, poucas células são afetadas. Como também, tempo para que a planta possa responder e produzir sintomas visíveis. Uma maneira de superar esse dilema é combinar amostras de diferentes pontos de coleta. Esta estratégia foi relatada em outros estudos de expressão diferencial (Guimarães *et al.*, 2012; Rawat *et al.*, 2012) e embora uma visão mais ampla do processo biológico pode ser obtida, alguma perda de informação é inevitável. Neste estudo, a estratégia de agrupar amostras de diferentes dai foi utilizada na tentativa de observar as mudanças nos estágios iniciais e finais da infecção. As proteínas totais foram extraídas e analisadas por 2-DE.

A análise dos géis revelou aproximadamente 500 proteínas por gel e como esperado, a maioria das proteínas foram observadas na faixa de pH de 4 a 7 e variaram em massa de 15-100 kDa (Figura 1.5). As réplicas dos géis da condição controle (plantas inoculadas com vetor PVX) revelou um coeficiente de correlação (r^2) $\geq 0,96$, indicando uma alta reprodutibilidade entre as repetições. Da mesma forma, a análise de 2-DE das replicatas das plantas inoculadas com PVX-AC2 mostrou um $r^2 \geq 0,98$ (Figura 3). Quando a análise de 2-DE de ambas as amostras (PVX e PVX-AC2) foram comparadas, foi obtido um r^2 de 0,84, o que sugere que a proteína AC2 interferiu no perfil proteômico da planta hospedeira.

Quando o perfil proteico das plantas inoculadas PVX-AC2 foi comparado com a condição controle, um total de 42 proteínas mostraram variação estatisticamente significativa acima da razão de 1,5, incluindo 24 aumentadas e 13 diminuídas, bem como, 3 proteínas exclusivas das plantas inoculadas com PVX-AC2. Somente 2 proteínas foram observadas

como exclusivas nas plantas inoculadas com PVX (Figuras 1.5 e 1.6; Tabela 1.1). Um total de 36 proteínas diferenciais foram identificadas com sucesso por MS e são mostradas nas Tabelas 1.2. Foi interessante observar que, a maioria destas proteínas foi regulada positivamente na presença do gene AC2 (Figura 1.6) e suas identidades indicam que diferentes processos biológicos foram afetados. Uma tentativa de classificar as proteínas identificadas foi realizada com base na literatura e seus papéis biológicos são discutidos a seguir.

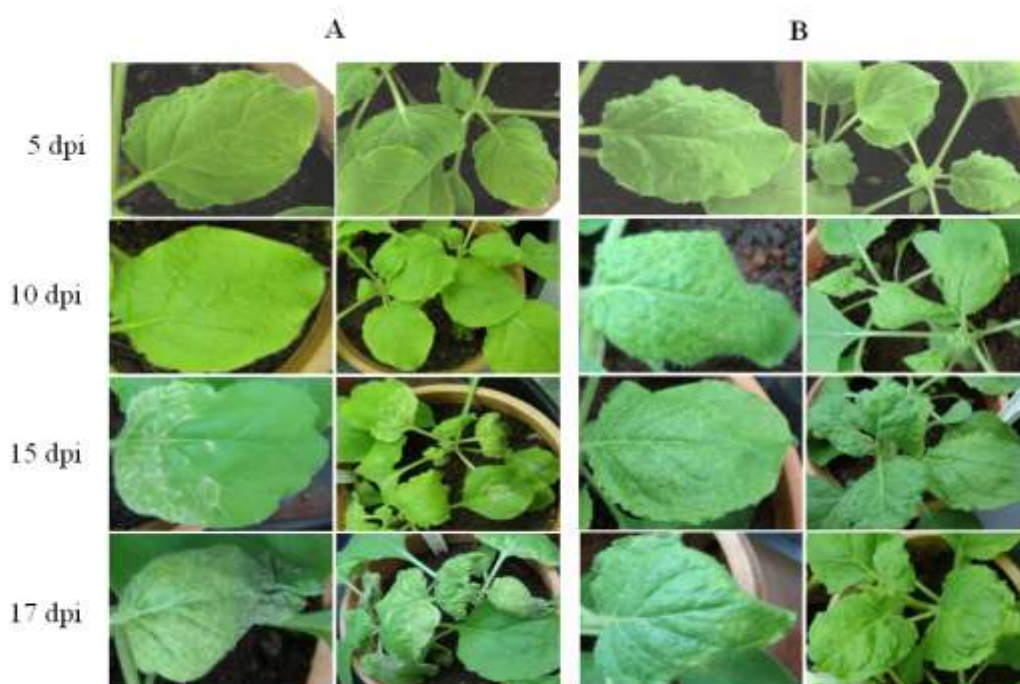


Figura 1.2. Visão das folhas infectadas em 5, 10, 15 e 17 dia após a infecção. (A) Sintomas de plantas *N. benthamiana* infectadas com PVX-AC2 e (B) Sintomas de plantas *N. benthamiana* infectadas com Potato vírus X (PVX), como indicado.

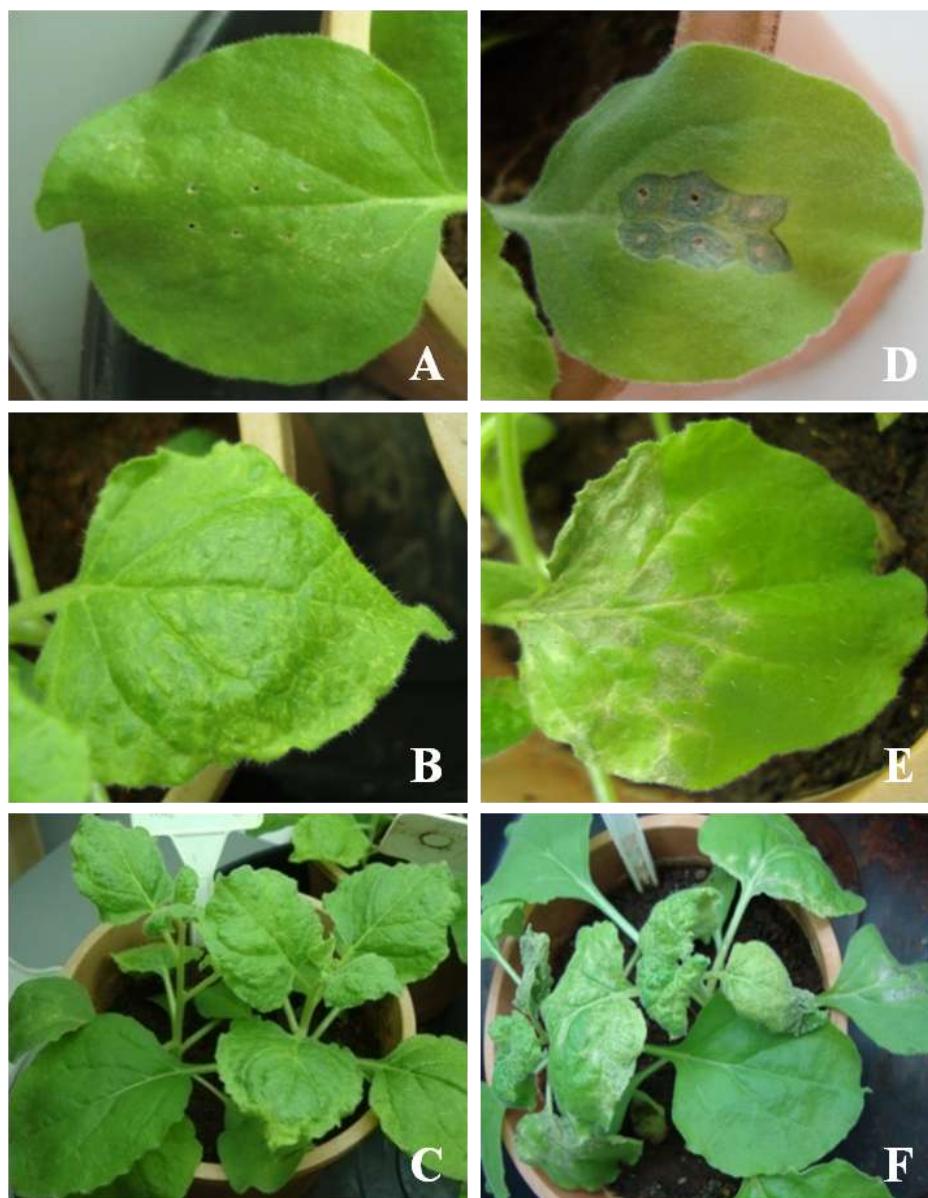


Figura 1.3: Sintomas de plantas de *N. benthamiana* infectadas com Potato vírus X (PVX) (A, B e C) e com PVX-AC2 (D, E e F). (A, D): folhas inoculadas com *A. tumefaciens* contendo PVX e PVX-AC2. (B, E): Sintomas sistêmicos mostrando lesões de mosaico e necrose, respectivamente, aos 17 dias após a inoculação. (C, F): Visão global de plantas de *N. benthamiana* inoculadas com PVX e PVX-AC2, respectivamente.

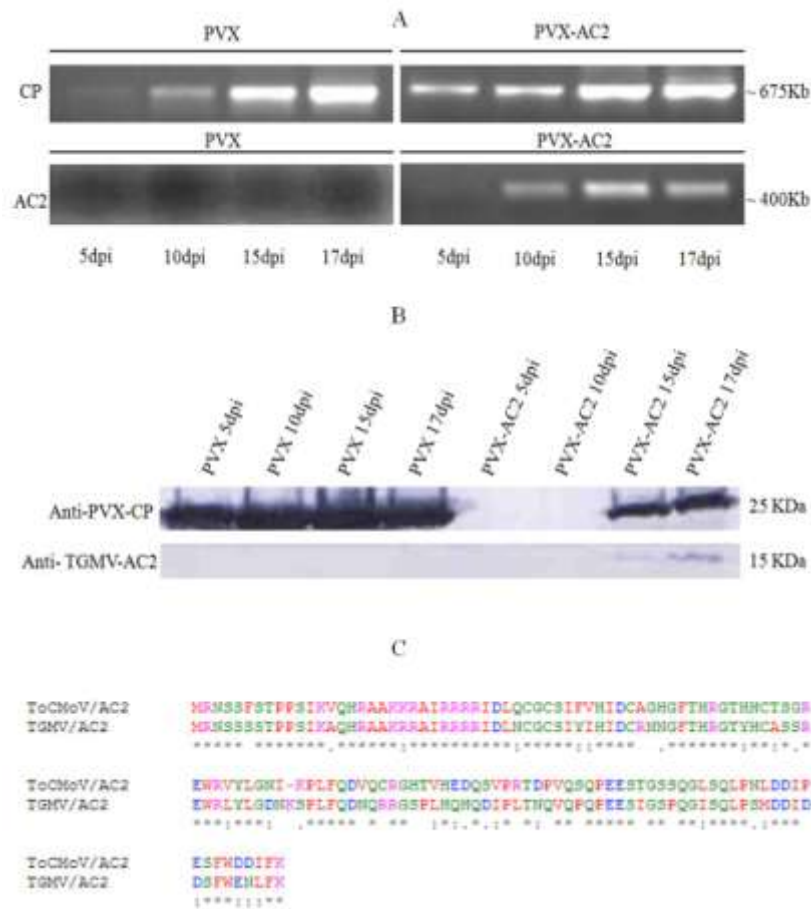


Figura 1.4. Expressão dos genes/proteínas CP (capa proteica de Potato vírus X- PVX) e AC2 em plantas de *N. benthamiana* infectadas com os vetores PVX e PVX-AC2. (A) Análise de RT-PCR dos níveis de expressão gênica de CP e AC2 em 5, 10, 15 e 17 dai. (B) Análise por Western Blot dos níveis de expressão das proteínas CP e AC2 em 5, 10, 15 e 17 dai. (C) Alinhamento das sequências das proteínas de TGMV-AC2 e ToCMoV-AC2, mostrando uma identidade de aminoácidos de 70%.

3.1. Proteínas virais expressas em plantas infectadas com PVX-AC2 e PVX

Várias proteínas presentes nos mapas 2D de plantas inoculadas com PVX e com PVX-AC2 foram identificadas como proteínas virais de PVX, tais como TGB1 (proteínas de movimento viral, 25 kDa) (*spot* 102) e a CP (*spots* 131, 129, 123, 428, e 444) (Figura 1.5 e Figura 1.6).

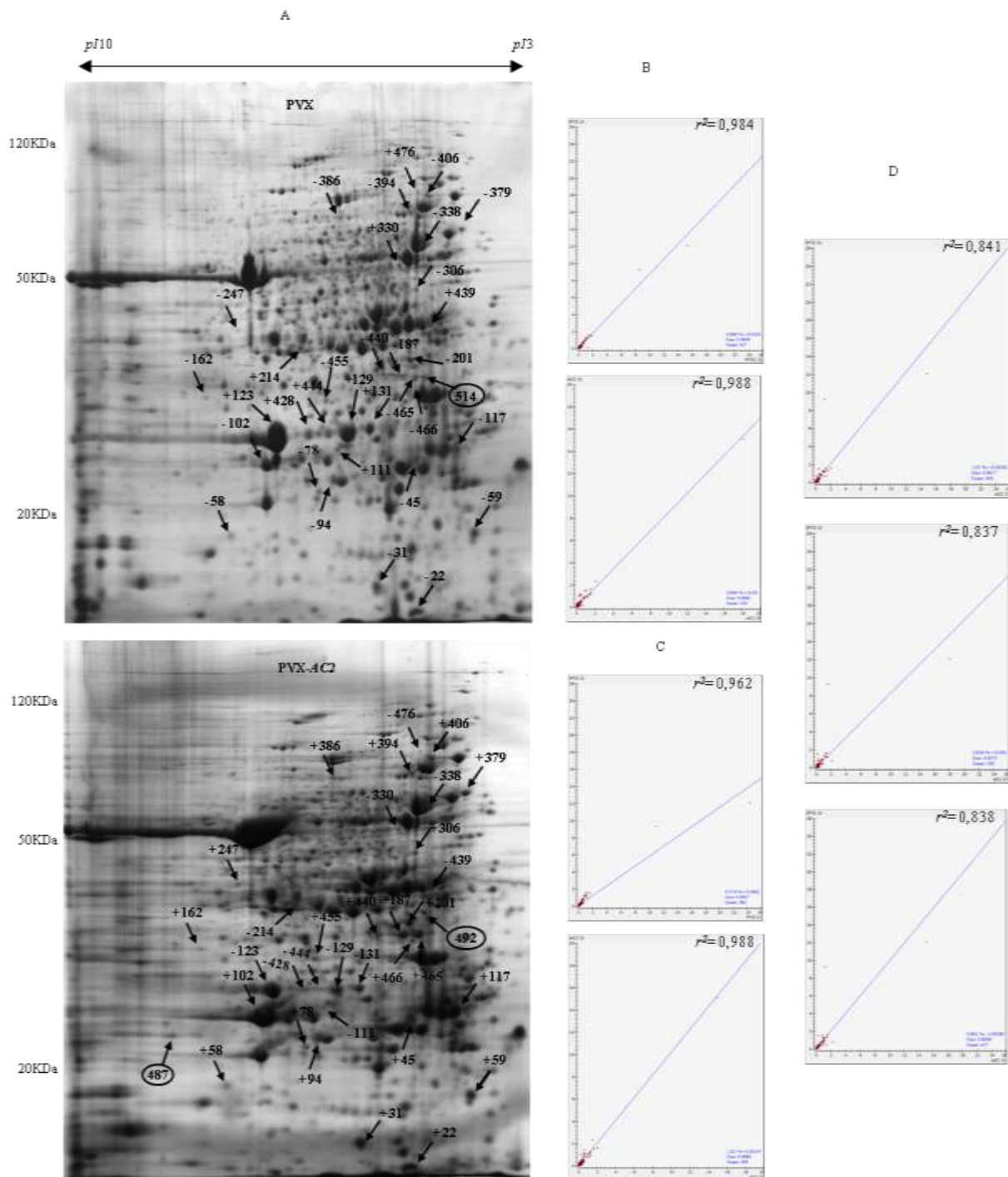


Figura 1.5. Géis representativos de plantas de *N. benthamiana* infectadas com Potato vírus X (PVX) e PVX-AC2 (A), como indicado, e análise de dispersão das proteínas gerada pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Helthcare) (B-D). As setas indicam as proteínas diferencialmente expressas: (+) expressão aumentada e (-) expressão diminuída. Proteínas circuladas indicam proteínas possivelmente exclusivas.

Proteínas diferencialmente expressas

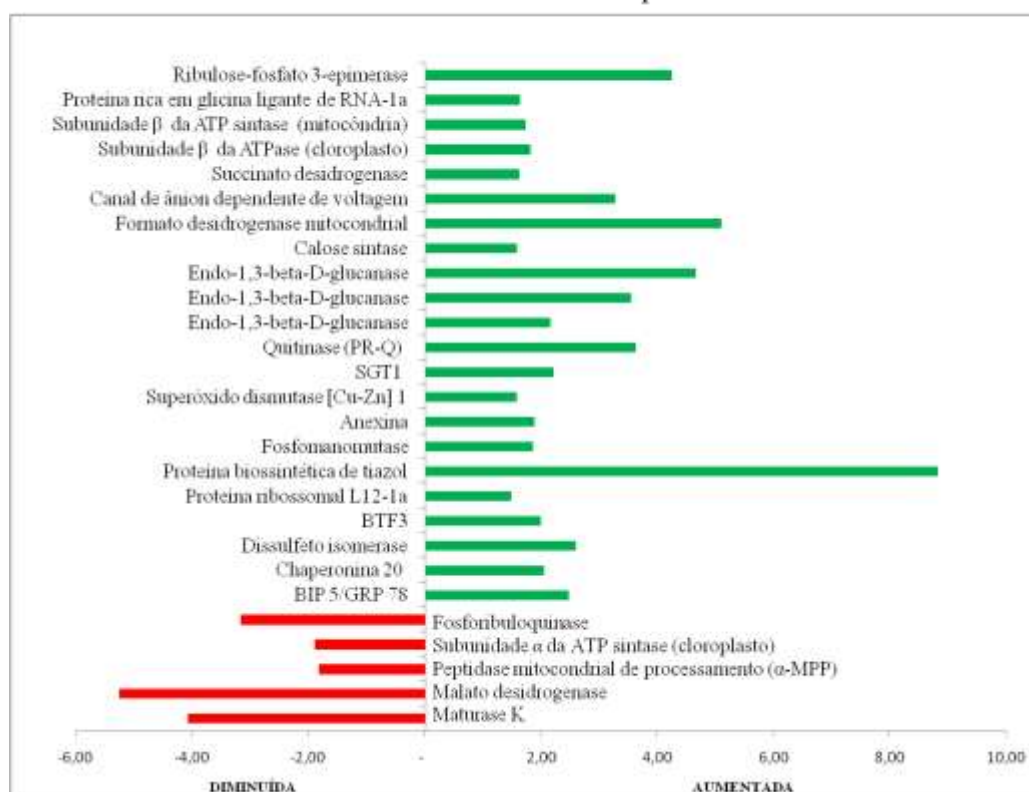


Figura 1.6. Diagrama mostrando proteínas que tiveram a expressão aumentada (barras verdes) e diminuídas (barras vermelhas) em plantas de *N. benthamiana* inoculadas com PVX-AC2. O eixo *x* representa a razão de expressão detectada em PVX-AC2 quando comparada com PVX (PVX-AC2/PVX).

Tabela 1.1. Proteínas diferencialmente expressas e estatisticamente validadas pelo programa ImageMaster 2D Platinum 7.05.

'Match' ID	'Match Count'	PVX	PVX-AC2	Anova	Expressão	Identificação
22	2	0.319708	0.521057	0.0061382	1.63	Proteína rica em glicina ligante de RNA-1a
31	2	0.23523	0.37265	6.82E-04	1.58	Superóxido dismutase [Cu-Zn] 1
58	2	0.0542656	0.108328	0.0118722	2.00	BTF3
59	2	0.18992	0.28281	0.0187819	1.49	Proteína ribossomal L12-1a
78	2	0.0394448	0.0626032	0.0170283	1.59	Calose sintase
94	2	0.0494843	0.20997	0.0348209	4.24	Ribulose-fosfato 3-epimerase
102	2	0.729865	1.99562	0.0073455	2.73	Proteína de movimento-25 kDa
111	2	0.0693269	0.0218592	0.0199302	- 3.17	Maturase K
117	2	0.196501	0.713107	0.0375785	3.63	Quitinase (PR-Q)
123	2	9.68079	1.39387	3.49E-04	- 6.95	Capa proteica

129	2	1.70231	0.339314	2.39E-04	- 5.02	Capa proteica
131	2	0.371485	0.207256	0.0056913	- 1.79	Capa proteica
162	2	0.0151481	0.0496323	0.0221989	3.28	Canal de ânion dependente de voltagem
187	2	0.083911	0.297705	0.0112216	3.55	Endo-1.3-beta-D-glucanase
201	2	0.111568	0.209875	0.0046255	1.88	Anexina
214	2	0.130217	0.0685592	0.0194891	- 1.90	Malato desidrogenase
247	2	0.0100075	0.0509956	0.0080524	5.10	Formato desidrogenase mitocondrial
306	2	0.0407904	0.0905173	0.0486385	2.22	SGT1
330	2	0.0798716	0.0436468	0.0067616	-1.83	Peptidase mitocondrial de processamento (α -MPP)
338	2	0.170597	0.295748	0.0426168	1.73	Subunidade β da ATP sintase (mitocôndria)
379	2	0.0713301	0.184934	9.59E-04	2.59	Dissulfeto isomerase
386	2	0.0420572	0.0679663	0.0211562	1.62	Succinato desidrogenase
394	2	0.0873892	0.158889	0.0305453	1.82	Subunidade β da ATPase (cloroplasto)
406	2	0.100442	0.248624	0.0050854	2.48	BIP 5 /GRP 78)
428	2	0.409725	0.0787743	0.0334465	- 5.20	Capa proteica
432	2	0.0726214	0.0269637	0.0400602	- 2.69	-
436	2	0.0239951	0.005378	0.0370825	- 4.46	-
439	2	0.0687607	0.0168499	0.0182691	- 4.08	Fosforibuloquinase
440	2	0.0635931	0.136992	0.0010374	2.15	Endo-1.3-beta-D-glucanase
444	2	0.215826	0.0174505	0.0073341	-12.37	Capa proteica
451	2	0.132384	0.271458	0.0326013	2.05	Chaperonina 20
455	2	0.0449377	0.0832642	0.0098984	1.85	Fosfomanomutase
461	2	0.0414283	0.0081549	0.048162	- 5.08	-
465	2	0.0813387	0.378845	0.00691	4.66	Endo-1.3-beta-D-glucanase
466	2	0.0095054	0.083904	0.0141356	8.83	Proteína biossintética de tiazol
468	2	0.0125818	0.0408619	0.0348014	3.25	-
476	2	0.0308543	0.0058608	0.0304152	- 5.26	Subunidade α da ATP sintase (cloroplasto)
483	1	-	0.0821656	0.0064966	-	-
487	1	-	0.15434	0.0021081	-	NtPRp27
492	1	-	0.0938748	0.0053056	-	Epóxido hidrolase
514	1	0.0647793	-	0.0046649	-	OEE1
515	1	0.0666339	-	0.0047827	-	-

(-) Proteínas que não foram identificadas.

A proteína de 25 kDa (TGB1) apresentou uma expressão mais elevada (2.73 vezes maior) nas plantas inoculadas com PVX-AC2. Esta proteína já foi reportada como sendo importante para o movimento viral de célula para célula, via plasmodesma, em diferentes plantas hospedeiras (Krishnamurthy *et al.*, 2002; Howard *et al.*, 2004), além de ser capaz de impedir a sinalização de silenciamento gênico (Voinnet, Lederer e Baulcombe, 2000). Além da proteína TGB1, a capa proteica também é necessária para facilitar a movimentação viral nas células

hospedeiras (Verchot-Lubicz, 2005). No entanto, em nosso estudo, a expressão da capa proteica foi menor nas plantas inoculadas com a construção PVX-AC2 (Tabela 1.2). Resultados similares foram relatados anteriormente por Chapman *et al.* (1992) e de acordo com esses autores, embora tenha ocorrido menor acumulação de mRNA da capa proteica em plantas infectadas com PVX-GUS, PVX-GUS infectou a planta sistematicamente, como foi observado em nosso estudo para PVX-AC2 (Figura 1.2).

Vários *spots* de aproximadamente 28 kDa, com distintos pontos isoeletricos foram identificados como capa proteica (Tabela 1.2). Sabe-se que esta proteina sofre varias modificacoes pós-traducionais, como glicosilacao e fosforilacao, afetando a estrutura fisica e quimica da superficie da proteina (Atabekov *et al.*, 2001; Karpova *et al.*, 2006), o que pode contribuir para a presenca de varios *spots* da mesma proteina com diferentes pIs. Além disso, um comportamento anômalo da capa proteica de PVX em SDS-PAGE foi anteriormente observado (Koenig, 1972).

O fato de AC2 não ter sido observado nos géis 2-DE, pode ser explicado por sua massa molecular de 14,6 kDa (massa teórica). Os géis foram feitos com concentração de 13% acrilamida, e, por isso, o limite de detecção foi de 15 kDa.

3.2. Interferência de AC2 em processos fotossintéticos e na produção de energia na planta hospedeira

O sucesso da infecção viral é altamente dependente da criação de um ambiente adequado para a multiplicação e movimentação viral, que envolve o uso da maquinaria celular do hospedeiro e ao mesmo tempo, combate as respostas de defesa do hospedeiro. Os vírus regulam vários processos da célula hospedeira, tais como, a transcrição, tradução e modificações pós-traducionais. Assim, o estudo de proteínas do hospedeiro moduladas durante a infecção

viral, representa uma importante abordagem na identificação de potenciais alvos para a engenharia genética visando a resistência a infecção viral.

No presente estudo, foi observado que a presença da proteína AC2 produziu um desequilíbrio celular, principalmente de proteínas envolvidas com processos metabólicos e fotossintéticos, que são comumente afetados durante infecções virais. Duas proteínas envolvidas na fotossíntese (ribulose-fosfato3-epimerase e proteína rica em glicina ligante de RNA-1a) foram aumentadas, embora estresses bióticos regulem negativamente genes relacionados com a fotossíntese (Bilgin *et al.*, 2010). Outras proteínas foram diminuídas, incluindo a fosforibuloquinase (spot 439; - 4.08 vezes) e uma *oxygen-evolving enhancer protein 1* (PsbO), subunidade do complexo fotossintético II que foi exclusiva nas plantas infectadas com PVX. A fosforibuloquinase está envolvida na regulação do fluxo de açúcar no ciclo de Calvin (Hariharan, Johnson e Cattolico, 1998) e é regulada sob condições de estresse (Chen *et al.*, 2004). Resultados semelhantes foram observados por Soitamo *et al.* (2012) que mostraram que plantas de fumo transgênicas expressando AC2 de ACMV apresentaram vários genes relacionados à fotossíntese reprimidos, incluindo PsbO. Estes autores sugerem que essas alterações na expressão dos genes relacionados ao metabolismo do açúcar causem um desequilíbrio no metabolismo de carboidratos. Além disso, Soitamo *et al.* (2011) analisaram plantas de fumo transgênica com expressão constitutiva de HC-Pro (*helper-component-proteinase*), um supressor de silenciamento derivado do genoma de potyvírus. Esses autores também mostraram proteínas do fotossistema, como proteínas da clororespiração e do transporte de elétrons que foram reprimidas nessas plantas. Similarmente à HC-Pro, a presença da proteína AC2 também resultou no desequilíbrio do metabolismo de carbono em plantas de *N. benthamiana*.

Tabela 1.2. Proteínas diferencialmente expressas identificadas por espectrometria de massa.

Número spot	Proteína identificada	Organismo	Acesso (NCBIInr) ^a	Massa (kDa) teórica/experimental ¹	pI teórica/experimental	Sequência peptídica	Mascot Score	Busca	Cobertura (%)/Nº de peptídeo 'matched'	Erro RMS (ppm)	E-value	Expressão ^b (PVX-AC2/PVX)
Montagem e Movimento viral												
102	Proteína movimento (25 kDa)	<i>Potato virus X</i>	gi 138400	24/25	6.38/7.18	K.HGVEFVKPCQVTGLEFK.V	155	MS/MS	7/1	77	2.8e-12	2.73
131	Capa proteína	<i>Potato virus X</i>	gi 61430	25/28	6.73/5.66	K.TAGATPATASGLFTIPDGDFFSTAR.A	149	MS/MS	10/1	55	1.1e-11	-1.79
129	Capa proteína	<i>Potato virus X</i>	gi 61430	25/28	6.73/5.90	R.AQSNDFASLDAAVTR.G	78	MS/MS	6/1	29	0.00012	-5.02
123	Capa proteína	<i>Potato virus X</i>	gi 61430	25/28	6.73/7.14	K.TAGATPATASGLFTIPDGDFFSTAR.A	90	MS/MS	10/1	67	1.2e-05	-6.95
428	Capa proteína	<i>Potato virus X</i>	gi 61430	25/28	6.73/6.56	K.VPTDTMAQAAWDLVR.H K.TAGATPATASGLFTIPDGDFFSTAR.A	111/58	MS/MS	16/2	19 21	2.4e-07 0.035	-5.20
444	Capa proteína	<i>Potato virus X</i>	gi 61430	25/28	6.73/6.27	K.VPTDTMAQAAWDLVR.H	79	MS/MS	6/1	32	0.00026	-12.35
Fotossíntese e Metabolismo energético												
94	Ribulose-fosfato-3-epimerase	<i>Solanum tuberosum</i>	gi 2499728	30/23	7.71/6.38	R.GLNPWIEVDGGVGPKN	83	MS/MS	5/1	63	1.9e-06	4.24
22	Proteína rica em glicina ligante de RNA-1a	<i>Nicotiana sylvestris</i>	gi 469070	15/15	5.58/5.00	R.GFGFVTFK.D R.EGGYGGGGYGGGR.R	76/97	MS/MS	13/2	21 81	6.7e-05 1.1e-07	1.63

439	Fosforibuloquinase	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	gi 125578 gi 15222551	44/40	6.03/4.88 5.71/4.88	R.KPDFDAYIDPQK.Q K.ILVIEGLHPMYDER.V	80/51	MS/MS	3/1 3/1	53	0.00021	- 4.08
514	OEE1(PsbO)	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 11134054	35/34	5.89/4.96	- K.QLVASGKPEFSGFLVPSYR.G	95/106	MS MS/MS	34/8 6/1	60 59	0.0056 3.7e-07	Exclusiva (PVX)
476	ATP sintase, subunidade α , cloroplasto	<i>Nicotiana sylvestris</i>	gi 78102516	55/81	5.14/4.96	R.EAYPGDVFYLHSR.L	104	MS/MS	2/1	32	6.3e-08	-5.26
394	ATPase. subunidade β , cloroplasto	<i>Nicotiana rustica</i>	gi 114557	53/70	5.15/5.08	K.AHGGVSVFGGVGER.T	99	MS/MS	2/1	9	1.8e-06	1.82
338	ATP sintase, subunidade β , mitocôndria	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	gi 114421	59/55	5.95/4.97	- K.AHGGFSVFAGVGER.T	96/141	MS MS/MS	44/17 2/1	61 64	8.3e-09 6.8e-06	1.73
330	Peptidase mitocondrial de processamento (α - MPP)	<i>Solanum tuberosum</i>	gi 587562 gi 266567	54/56	5.99/5.25 5.71/5.25	R.AEEPTPVYVGGDYR.R R.LNSTVLEEFVAENYTAPR.M	68/172	MS/MS	2/1 3/1	0.83 40	0.0034 1.4e-13	-1.83
386	Succinato desidrogenase, possível	<i>Ricinus communis</i>	gi 255579273	69/68	6.18/6.09	-	104	MS	28/14	33	0.0009	1.62
162	Canal de ânion dependente de voltagem	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 161788874	29/31	7.79/8.05	K.ASALIQHEWRPK.S	60	MS/MS	4/1	75	0.031	3.28
247	Formato desidrogenase mitocondrial	<i>Nicotiana attenuata</i> <i>Solanum lycopersicum</i>	gi 116739352 gi 350538487	19/42 42/42	5.63/7.57 6.87/7.57	- K.GHQYIVTPDKEGPDCELEK.H K.ANEYAEMNPNFVGAENALGIR.E R.YMPNQAMTPHISGTTIDAQLR.Y	82/82/96/6 0	MS MS/MS	66/6 10/1 12/1 5/1	16 86 80 91	0.0079 9.4e-05 3.3e-06 0.018	5.10
78	Calose sintase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 334184624	22/23	9.21/6.40	-	75	MS	6/10	64	0.039	1.59

Defesa e Estresse oxidativo

465	Endo-1.3-beta-D- glucanase	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 100324	18/35	5.49/4.93	K.HFGLFSPDQR.A	82	MS/MS	6/1	66	9e-06	4.66
-----	-------------------------------	--------------------------	-----------	-------	-----------	----------------	----	-------	-----	----	-------	------

187	Endo-1.3-beta-D-glucanase	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Solanum tuberosum</i>	gi 100324 gi 3395595	18/35 38/35	5.49/5.13 6.60/5.13	K.HFGLFSPDQR.A R.IYYPDTNVFNALK.G	65/81	MS/MS	6/1 3/1	146 11	0.0004 0.00021	3.55
440	Endo-1.3-beta-D-glucanase	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 100324	18/34	5.49/5.47	K.HFGLFSPDQR.A	83	MS/MS	6/1	53	0.00013	2.15
117	Quitinase (PR-Q)	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 116342 gi 19773 gi 116342	28/26 27/26 28/26	5.08/4.49	- R.YCGMLNVAPGENLDCYNQR.N K.EIAAFFGQTSHETTGGSLSAEPFTGG YCFVR.Q	75/129/83	MS MS/MS MS/MS	35/6 7/1 12/1	- 66 1	0.035 2e-09 6.3e-05	3.63
487	Proteína relacionada com patogenicidade - 27 kDa (NtPRp27)	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 5360263	27/24	9.30/8.42	R.WDQGYDVTAR.F	70	MS/MS	4/1	68	2.9e-05	Exclusiva (PVX-AC2)
306	Supressor do alelo G2 de Skp1 (SGT1)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	gi 58760268 gi 29468339	41/46 41/46	5.24/5.03 5.23	- K.AEPLHWTSLEYTR.A	91/85	MS MS/MS	25/7 3/1	32 18	0.015 8.2e-05	2.22
492	Epóxide hidrolase	<i>Nicotiana benthamiana</i>	gi 189306755	30/36	4.80/4.90	-	102	MS	38/12	19	0.0014	Exclusive (PVX-AC2)
31	Superóxido dismutase (Cu-Zn)	<i>Nicotiana glumabaginjifolia</i>	gi 134616 gi 134612	15/16	5.47/5.63 5.88/5.63	K.QIPLAGPQSIIGR.A K.EHGAPEDVVR.H	62/57	MS/MS	8/1 6/1	3.01 14	0.0009 -	1.58
201	Anexina	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 2467253	35/37	5.14/5.04	K.QLEEGDEFVGLLR.A R.YGGDEVDLRL	112/47	MS/MS	6/2	13 2	5.9e-09 0.019	1.88
455	Fosfomanomutase	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 122194125	28/32	5.71/6.42	R.YLEEFNEIHFFGDK.T	80	MS/MS	5/1	89	0.00025	1.85
466	Proteína biossintética-tiazol, possível	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 30013665	38/33	5.76/5.07	K.LFNAVATEDLIVK.N	67	MS/MS	3/1	56	0.0003	8.83

Transcrição e Tradução

214	Malato desidrogenase. citosol	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 10798652	35/37	5.91/6.68	R.ELVADDAWLNGEFISTVQQR.G R.VLVTGAAGQIGYALVPMIAR.G	133/89	MS/MS	12/2	11 17	8.4e-10 2.4e-05	- 1.90
-----	-------------------------------	--------------------------	-------------	-------	-----------	--	--------	-------	------	----------	--------------------	--------

59	Proteína ribossomal L12-1a	<i>Nicotianatabacum</i>	gi 20020	20/19	6.34/4.12	K.TEFDVVIDEVPSNAR.I	111	MS/MS	7/1	36	8.4e-09	1.49
58	Fator transcricional básico (BTF3)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	gi 90823167	17/18	6.32/7.68	-	97	MS	61/8	43	0.0033	2.00
111	Maturase K.cloroplasto	<i>Chamerion angustifolium</i>	gi 379039935	31/27	9.41/6.24	K.APFSEYAEFR.N	84	MS	33/7	64	0.0038	- 3.17
Chaperonas												
379	Dissulfeto isomerase	<i>Nicotiana benthamiana</i>	gi 257222620	17/62	4.65/4.34	K.FENYLTAEK.L	69	MS/MS	6/1	35	0.00014	2.59
451	Chaperonina 20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15242045	26/26	8.86/4.97	K.TLGGILLPSTAQSKPQGGEVVAVGE GR.T	127	MS/MS	10/1	29	2.4e-09	2.05
406	BiP 5/GRP 78	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 729623	73/79	5.08/4.80	- K.NQIDEIVLVGGSTR.I	88/58	MS MS/MS	22/11 3/1	96 91	0.031 0.037	2.48

^aMais de um acesso citado indica diferentes "hits" para os peptídeos identificados de uma mesma proteína.

^b O sinal (-) indica diminuição de expressão.

Outras proteínas envolvidas no transporte de elétrons no cloroplasto e mitocôndria foram identificadas no presente estudo. A expressão da subunidade α da ATPase do cloroplasto foi diminuída em plantas infectadas com PVX-AC2 (spot 476; -5.76 vezes), enquanto da subunidade β foi aumentada (spot 394; 1.82 vezes). A ATP sintase do cloroplasto é formada por nove subunidades, sendo que três delas são codificadas no núcleo (atpC, atpD e atpG) enquanto as outras seis são separadas por operons no cloroplasto: operon atpB-atpE (atpB/E) e o agrupamento atpI-atpH-atpF-atpA (Hennig e Herrmann, 1986). Diferenças na expressão das subunidades α e β da ATPase foram relatadas durante a interação de tomateiros resistente e suscetível infectado com Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) (Adi *et al.*, 2012). Foi reportado que a subunidade α da ATP sintase foi somente observada na interação com genótipo resistente, enquanto que a expressão da subunidade β foi aumentada na interação com genótipo suscetível (Adi *et al.*, 2012). Um papel adicional para a subunidade β da ATPase foi recentemente demonstrado por Chivasa *et al.* (2011). Esses autores isolaram uma subunidade β da ATPase mitocondrial responsiva a fumonisina B1 (FB1), uma micotoxina secretada por fungos do gênero *Fusarium*, que inicia a morte celular programada em *Arabidopsis*. Foi proposto que essa subunidade é um novo regulador de morte celular em plantas (Chivasa *et al.*, 2005). Embora esses estudos tenham sido desenvolvidos com a subunidade β da ATPase mitocondrial, a subunidade β da ATPase cloroplástica também foi identificada como responsiva a FB1. É possível que as diferenças encontradas no padrão de expressão das subunidades α e β da ATPase cloroplástica possam ser devidas a uma possível multifuncionalidade dessas subunidades.

Em relação a ATP sintase da mitocôndria, a subunidade β foi aumentada (spot 338; 1.73 vezes). Os resultados mostraram que três proteínas mitocondriais identificadas em plantas infectadas por PVX-AC2 estão envolvidas na fosforilação oxidativa: peptidase mitocon-

drial de processamento (α - MPP) (spot 330; -1.83 vezes), subunidade β da ATP sintase e succinato desidrogenase (spot 386; 1.62 vezes). Duas outras proteínas mostraram um aumento em plantas infectadas com PVX-AC2: canal de ânion dependente de voltagem (spot 162; 3.28 vezes) e formato desidrogenase mitocondrial (spot 247; 5.1 vezes).

Em plantas, a proteína supressora de silenciamento, β C1, do DNA- β satélite associado à begomovírus, foi capaz de regular genes do hospedeiro envolvidos na fotossíntese e no processo respiratório (Andleeb *et al.*, 2010). No presente estudo, foram observados resultados similares para a proteína AC2 ToCMoV, que regulou a expressão de diferentes proteínas cloroplásticas e mitocondriais. O acúmulo da proteína mitocondrial canal de ânion dependente de voltagem, succinato desidrogenase e formato desidrogenase mitocondrial foram maiores nas plantas infectadas com PVX-AC2, que mostrou alta severidade de sintomas. Vários estudos mostraram que a expressão dessas proteínas é alterada sob condições de estresse, como uma resposta de defesa (Kusano *et al.*, 2009; David *et al.*, 2010) e pode estar associada ao desenvolvimento de sintomas.

Por outro lado, a α -MPP teve sua expressão diminuída nas plantas infectadas com PVX-AC2. Essa subunidade é um dos componentes que formam a peptidase mitocondrial de processamento (Glaser *et al.*, 1998) e sob condições de estresse, os níveis dessa proteína podem ser alterados, resultando em aumento de síntese proteica e produção energética em mitocôndrias de plantas infectadas (Satoh *et al.*, 2010).

Em geral, é interessante observar que a proteína AC2 do ToCMoV foi capaz de afetar proteínas importantes envolvidas na respiração celular, revelando uma possível função na modulação do proteoma mitocondrial. Esses resultados fornecem indícios de como os processos são afetados pelas interações begomovírus-planta hospedeira.

Além das proteínas associadas à fotossíntese e produção energética, foi identificada uma calose sintase (spot 78; 1.59 vezes), proteína do metabolismo celular. Um aumento no acúmulo de calose foi previamente observado em lesões induzidas por TMV em plantas de fumo com deficiência de β -1,3-glucanase, que resultou em decréscimo na suscetibilidade ao TMV (Beffa *et al.*, 1996). Em soja, a repressão da calose sintase foi observada no 7º dia após a inoculação e aumentada no 14º dia, podendo estar associada com a redução da resposta de resistência ao Soybean mosaic virus (Babu *et al.*, 2008). A massa molecular observada para a calose sintase (23 kDa) apresentou uma diferença significativa da massa teórica (226 kDa). Foi sugerido que a calose sintase representa um complexo enzimático de multisubunidade, com polipeptídeos variando entre 25 e 92 kDa (Verma e Hong, 2001).

Os resultados obtidos sugerem que a presença da proteína AC2 foi capaz de causar um desbalanço na homeostase celular, interferindo no funcionamento da mitocôndria e do cloroplasto. A regulação de vários genes e proteínas é dependente do tempo amostrado (dias após infecção) e muitos deles, podem estar envolvidos com o desenvolvimento de sintomas. No presente estudo, folhas de diferentes tempos amostrados foram agrupadas para análise e essa flutuação na detecção de proteínas foi provavelmente minimizada.

Estudos preliminares em plantas infectadas com vírus mostraram que sintomas associados à doença estão correlacionados com o aumento da glicólise, respiração e acúmulo de amido, diminuição da fotossíntese e redução da síntese proteica (Herbers *et al.*, 1997; Babu *et al.*, 2008). Neste estudo, foi observado que AC2 de ToCMoV expressada em um vetor viral (PVX) é capaz de interferir em importantes processos celulares da planta hospedeira, indicando que uma situação similar pode ocorrer em uma infecção por ToCMoV, o que reforça a importância dessa proteína na infecção viral.

3.3. Proteínas relacionadas com defesa e estresse oxidativo moduladas por AC2 na planta hospedeira

Outros grupos de proteínas induzidas por AC2 de ToCMoV foram as proteínas relacionadas a patogenicidade (PRs). Essas proteínas são induzidas pelo sistema de defesa da planta na tentativa de evitar o desenvolvimento do patógeno e da infecção (Van Loon, Rep e Pieterse, 2006). Neste estudo, a expressão de três PRs foi aumentada em plantas inoculadas com PVX-AC2 incluindo os spots identificados como endo-1,3-beta-D-glucanase (spots 465, 187 e 440) com diferentes pontos isoelétricos (Tabela 1.2), quitinase PR-Q (spot 117; 3.63 vezes) e proteína relacionada a patogenicidade de 27 kDa (NtPRp27) (spot 487; exclusiva para PVX-AC2). Já foi demonstrado que plantas infectadas com begomovírus aumentam os níveis de PRs (Mckenzie *et al.*, 2002). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram a indução dessas proteínas em resposta a PVX-AC2 na ausência de outras proteínas de ToCMoV. Soitamo *et al.* (2012) também reportaram resultados semelhantes em plantas de fumo transgênico expressando AC2 de ACMV, com o aumento na expressão de genes de defesa e associados a estresse oxidativo, composto por transcritos envolvidos na resistência sistêmica adquirida, na eliminação de espécies reativas de oxigênio (*ROS scavenging*) e explosão respiratória (*respiratory burst oxidation*).

Um supressor do alelo G2 de Skp1, SGT1 (spot 306; 2.22 vezes), foi também identificado neste estudo, com uma maior expressão em plantas inoculadas com PVX-AC2. Essa proteína está envolvida em vários processos biológicos como desenvolvimento da planta, resposta de defesa (Meldau, Baldwin e Wu, 2011), dobramento proteico (Zhang *et al.*, 2008) e degradação de proteínas-alvo durante a interação com o complexo SCF (Skp1, Cullin, F-box), que é um complexo de multiproteínas da E3 ubiquitina ligase que cataliza a ubiquitinação de proteínas, importante para a eliminação de proteínas dobradas de forma incorreta (Ye *et al.*,

2012). Esses resultados indicam que AC2 pode afetar o centro regulatório do processo de ubiquitinação (Lozano-Duran e Bejarano, 2011) para evitar a citotoxicidade, e consequentemente interferir na expressão de outras proteínas para favorecer a infecção viral. Lozano-Dúran *et al.* (2011) utilizaram genética reversa para identificar vários genes do hospedeiro envolvidos na infecção de geminivírus, incluindo um gene Skp1-like 2. Esses autores mostraram que AC2 é capaz de prejudicar a atividade de SKP1 e de outras proteínas do complexo SCF, provavelmente conferindo uma vantagem biológica para infecção viral, em particular relacionada ao processo de ubiquitinação de proteínas da planta hospedeira.

Foi também identificado um aumento na expressão de várias proteínas envolvidas diretamente ou indiretamente em estresse oxidativo, como epóxido hidrolase (spot 492; exclusiva para plantas infectadas com PVX-AC2), superóxido dismutase (spot 31; 1.58 vezes), anexina (spot 201; 1.88 vezes), fosfomanomutase (spot 455; 1.85 vezes) e uma possível proteína biossintética de tiazol do cloroplasto (spot 466; 8.83 vezes). Sabe-se que a epóxido hidrolase e a superóxido dismutase estão diretamente envolvidas em atividade antioxidante e são induzidas em resposta de defesa para reduzir os efeitos do estresse oxidativo (Newman, Morisseau e Hammock, 2005). Duas proteínas metabólicas, uma anexina, e uma fosfomanomutase, e uma proteína associada à biossíntese de vitamina, a possível proteína biossintética, tiazole do cloroplasto, foram relatadas como envolvidas indiretamente com o processo oxidativo (Tunc-Ozdemir *et al.*, 2009; Zhou, L. *et al.*, 2011). Anexina também está envolvida na modulação da atividade de calose sintase em algodão (Andrawis, Solomon e Delmer, 1993), que pode estar relacionada com a cicatrização de ferimentos em situações de estresse (Konopka-Postupolska, Clark e Hofmann, 2011). Calose sintase também foi identificada neste estudo, conforme discutido acima, assim como, a anexina, tiveram a expressão aumentada em resposta a AC2.

O aumento de proteínas envolvidas na eliminação de espécies reativas de oxigênio (*ROS scavenging*) mostra que o efeito de AC2 cria um meio adequado para a infecção viral, contendo o estresse para evitar a morte celular, que irá desfavorecer o avanço viral. De fato, tal perfil de proteínas antioxidantes poderia não só amenizar o desenvolvimento de sintomas, mas também, facilitar a sobrevivência viral. Neste caso, AC2 parece prolongar o tempo de vida celular para facilitar a multiplicação e movimentação viral nas células hpedeiras.

3.4. Fatores transcricionais e traducionais afetados por AC2

A modulação de fatores transcricionais e traducionais por proteínas AC2 de begomovírus já foram previamente reportada. Neste estudo, foi identificada a malato desidrogenase citosólica (cyMDH) que foi reprimida em resposta a AC2 do ToCMoV. Resultados semelhantes foram obtidos por Soitamo *et al.* (2012), quando analisaram o efeito do supressor de silenciamento de ACMV em fumo. cyMDH é uma enzima importante no metabolismo que afeta a estabilidade e a transativação de um fator transcricional que controla o ciclo celular, morte celular e reparo de DNA (Levine, Hu e Feng, 2006). Sob condições de estresse, os níveis de cyMDH podem ser alterados, favorendo o crescimento da planta e conferindo tolerância a estresses (Yao *et al.*, 2011).

Evidências mostraram que a proteína AC2 é também capaz de afetar a expressão de proteínas envolvidas no processo transcricional, como os *Scarecrow transcription regulators-like* SCL6-II e SCL8 (Trinks *et al.*, 2005). Outras proteínas envolvidas nos processos de transcrição e tradução foram identificadas neste trabalho, como a proteína ribossomal L12-1a (spot 59; 1.49 vezes), o fator transcricional básico BTF3 (spot 58; 2.0 vezes) e a maturase K (spot 111; -3.17 vezes).

A maturase K, que foi reprimida nas plantas infectadas com PVX-AC2 é uma enzima que atua como um fator de *splicing* pós-traducional em cloroplasto e as proteínas geradas são importantes para o correto funcionamento do cloroplasto, incluindo a fotossíntese (Barthet e Hilu, 2007). Altos níveis de maturase K estão associados ao aumento de atividade fotossintética (Garavaglia *et al.*, 2010), que não é usualmente observada em infecções.

Este estudo também revelou o acúmulo do fator transcricional BTF3 em plantas infectadas com PVX-AC2. BTF3 foi primeiramente estudada em células de mamíferos como fator transcricional basal envolvido na transcrição de promotores classe II (Zheng *et al.*, 1987) e tem sido implicado em apoptose (Brockstedt *et al.*, 1999). Em plantas, a função desta proteína ainda não está clara. Foi observado que a deficiência de BTF3 em plantas de *N. bethamiana* preferencialmente afeta cloroplastos e mitocôndrias (Yang, K. S. *et al.*, 2007). Subunidades de BTF3 também estão associadas com morte celular mediada por resposta hipersensitiva (HR) em *Capsicum annum* contra TMV em uma interação resistente, mas não em uma suscetível. Os autores sugerem que BTF3 regula a transcrição de genes relacionados com a patogenicidade durante a infecção causada por TMV (Huh, Kim e Paek, 2012). No sistema modelo utilizado no presente estudo, a BTF3 poderia desempenhar um papel similar desencadeado pela expressão da proteína AC2.

3.5. Acúmulo de chaperona em plantas infectadas com PVX-AC2

Três proteínas envolvidas em dobramento proteico foram identificadas neste estudo e foram aumentadas em plantas infectadas com PVX-AC2: dissulfeto isomerase (spot 379), chaperonina 20 (spot 451) e 78 kDa *glucose-regulated protein homolog 5* (BiP 5/GRP 78; spot 406). Foi proposto que a BiP pode regular os efeitos citotóxicos de proteínas de PVX durante a infecção viral para favorecer a multiplicação do vírus (Ye *et al.*, 2011). Essa respos-

ta pode ser importante para evitar distúrbios celulares e mesmo a morte em casos em que proteínas virais atinjam altos níveis. Similarmente, os resultados encontrados neste estudo indicam que a AC2 é capaz de aumentar a expressão de BiP e pode contribuir para facilitar a infecção viral e movimentação nas células hospedeiras.

É bem conhecido que as chaperonas são aumentadas sob condições de estresse (Pedrazzini *et al.*, 1994; Lee, 2001; Lu e Christopher, 2008) e podem formar complexos com proteína virais durante à infecção. Krenz *et al.* (2010) mostraram que proteína de choque térmico 70 kDa (HSP 70) de *Arabidopsis thaliana* interage com a proteína de movimento de Abutilon mosaic virus, propondo que essa interação é importante para o transporte viral e indução de sintomas. Lozano-Durán *et al.* (2011) também mostraram a importância de uma HSP 70 durante a infecção causada por Tomato yellow leaf curl Sardinia virus. Esses autores propuseram que proteínas de choque térmico podem ser importantes para a rápida maturação e acumulação proteica durante um curto ciclo de multiplicação viral. Foi mostrado que a HSP 70 interage com SGT1 (Noël *et al.*, 2007), que é essencial para resistência a vírus (Komatsu *et al.*, 2010) e também foi identificada neste estudo. A possível interação entre a proteína AC2 do ToCMoV com chaperonas da planta hospedeira não foi relatada anteriormente, entretanto, pode ser que ocorra e possa ser essencial para o sucesso da infecção viral através de modificação na maquinaria celular do hospedeiro para favorecer a replicação viral.

4. CONCLUSÃO FINAL

Como mencionado inicialmente neste estudo, o sucesso da infecção viral depende da maquinaria da planta hospedeira para o avanço e a replicação viral. Embora vários estudos tenham sido desenvolvidos para investigar proteínas envolvidas nesses processos, a identificação do exato papel dos genes e proteínas do hospedeiro ainda representa um desafio.

Neste trabalho, foram usadas técnicas de proteômica para entender melhor os efeitos do fator de patogenicidade AC2 de ToCMoV no padrão de expressão proteica da planta hospedeira. A proteína AC2 foi capaz de alterar significativamente o perfil global de proteínas das folhas de *N. benthamiana* e conseqüentemente, afetar vários processos biológicos. Esse é o primeiro relato do efeito global do fator de virulência AC2 de ToCMoV no perfil proteico da planta hospedeira. Esse estudo revelou que mais de 50% das proteínas diferenciais foram aumentadas nas plantas de *N. benthamiana*. Além disso, este estudo destaca o efeito de AC2 na modulação de processos de defesa da planta pelo aumento da expressão de várias proteínas relacionadas com estresse oxidativo e com patogenicidade (PRs), bem como, seu papel na modulação do proteoma do sistema fotossintético e de produção energética. A proteína que mostrou maior aumento de expressão em resposta ao PVX-AC2 foi a possível proteína biossintética tiazol (spot 466; 8,8 vezes). Essa proteína está associada com a biossíntese de tiamina, que é um cofator muito importante em vários processos metabólicos, associado com o aumento de tolerância ao estresse oxidativo (Tunc-Ozdemir *et al.*, 2009) e à resistência a doenças em plantas (Ahn, Kim e Lee, 2005). Baseado nos resultados obtidos, essa nova informação no efeito da proteína AC2 no hospedeiro, revela que esse fator de patogenicidade tem um papel extremamente importante na interação entre o vírus e a planta, comprometendo o equilíbrio homeostático da célula. Está claro que a proteína AC2 tem um papel importante na infecção viral e é essencial para a patogenicidade em fumo. Com base nos resultados deste trabalho, as proteínas-alvo identificadas podem agora ser selecionadas para estudos futuros visando a geração de linhagens de plantas tolerantes ou mesmo resistentes ao ToCMoV.

CAPÍTULO II

**Identificação de proteínas moduladas durante a interação
tomateiro - ToCMoV através de 2D - nanoUPLC/MS^E**

RESUMO

Tomato chlorotic mottle virus (ToCMoV) é uma espécie de begomovírus bipartido amplamente distribuída no Brasil e que infecta a cultura do tomate. No Brasil, programas de melhoramento têm visado à seleção de genótipos de tomate resistentes a begomovírus, como a linhagem LAM 157 contendo o *locus* de resistência *tcm-1*. Esta linhagem é resistente a uma ampla gama de begomovírus bipartidos / monopartidos. O objetivo deste estudo foi identificar proteínas moduladas em tomateiro em resposta à infecção por begomovírus ToCMoV usando a técnica 2D-nanoUPLC/MS^E. As plantas dos genótipos quase-isogênicos resistente (LAM 157) e suscetível (Santa Clara) foram inoculadas com o clone infeccioso do begomovírus ToCMoV (DNA-A e DNA-B) por biobalística. Plantas bombardeadas com o plasmídeo pBlueScript (pBS) foram utilizadas como controle. Aos 15 dias após a inoculação, toda a parte apical das plantas foi coletada. Após a confirmação da infecção viral por PCR, plantas infectadas foram utilizadas para extração de proteínas e digeridas com tripsina. Os peptídeos trípticos foram separados por cromatografia de fase reversa (RP) em pH básico (primeira dimensão) e a pH ácido (segunda dimensão). Os espectros foram processados e analisados por ProteinLynx Servidor Global (PLGS). Este trabalho revelou, pela primeira vez, o perfil proteômico dos tomateiros resistente LAM 157 e suscetível Santa Clara em resposta ao begomovírus ToCMoV. Foram identificadas centenas de proteína em resposta ao ToCMoV, incluindo proteínas envolvidas no processo fotossintético e no metabolismo celular. Potenciais proteínas envolvidas com a infectividade viral também foram reveladas, como a ubiquitina e a proteína ribossomal L14. Foi interessante notar, que proteínas identificadas neste trabalho podem estar sendo reguladas pelo *locus* de resistência *tcm-1*, como a histona H4 e a proteína 14-3-3. Esses resultados poderão fornecer informações importantes sobre os

mecanismos envolvidos durante a interação ToCMoV-tomateiro em genótipos suscetíveis e resistentes.

1. INTRODUÇÃO

O tomate é uma cultura de grande importância econômica em todo o mundo, mas é severamente afetada por geminivírus (família *Geminiviridae*), os quais estão representados por sete gêneros: *Begomovirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Mastrevirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus* e *Turncurtovirus*. Entre os begomovírus, destaca-se o *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV), amplamente distribuído pelo Brasil e transmitido por mosca-branca (*Bemisia tabaci*). Trabalhos foram desenvolvidos com o intuito de caracterizar isolados de ToCMoV presentes no Brasil (Galvão *et al.*, 2003), mas somente em 2007, Ribeiro *et al.* (2007) reportaram, pela primeira vez, a sequência completa do genoma de ToCMoV isolado de folhas de tomate infectadas coletadas no estado da Bahia, na região nordeste do Brasil (ToCMoV-[Ba-Se1]). Esse begomovírus caracteriza-se por conter o genoma bipartido (DNA A e DNA B). Em begomovírus bipartidos, no componente A (DNA-A) estão presentes genes que codificam proteínas envolvidas na encapsidação viral (AV1/CP), replicação viral (AC1/Rep e AC3/REn), ativação transcricional (AC2/TrAP) e em alguns casos, supressão de silenciamento gênico (AC2, AC4), enquanto que no componente B (DNA-B), estão presentes dois genes, BV1 e BC1 que codificam a proteína de movimento intracelular (NSP) e a proteína de movimento intercelular (MP), respectivamente (Lazarowitz, 1992). Mais recentemente, foi reportado que a proteína essencial para a replicação viral, Rep, também possui atividade supressora de silenciamento, interferindo na maquinaria de metilação do DNA viral (Rodriguez-Negrete *et al.*, 2013).

O begomovírus ToCMoV vem sendo utilizado em diversos estudos na tentativa de responder questões relacionadas com o mecanismo de ação do vírus em plantas de importância econômica, como o tomate. No Brasil, programas de melhoramento têm visado à seleção de genótipos de tomate resistentes a begomovírus, como é o caso do *locus* de resistência de-

nominado *tcm-1* (Giordano *et al.*, 2005; Garcia-Cano *et al.*, 2008). Recentemente, foi desenvolvida uma linhagem de tomateiro (LAM 157), contendo o *locus tcm-1*, que apresenta resistência ampla a begomovírus (Blawid *et al.*, dados não publicados). Entretanto, o mecanismo de ação do *tcm-1*, durante o processo de infecção viral, não é conhecido. Até o momento, pouca informação sobre a alteração global das vias metabólicas envolvidas no processo de infecção foi relatada, sendo importante a busca por novas tecnologias que possam elucidar esses mecanismos de interação planta-vírus.

Por décadas, a técnica de 2D-PAGE foi considerada uma ferramenta poderosa na detecção de proteínas presentes em amostras biológicas complexas (O'farrell, 1975). Entretanto, esta abordagem apresenta limitações como, por exemplo, dificuldade na separação de proteínas presentes em pontos isoelétricos extremos e a necessidade de grandes quantidades de amostra. Devido a essas desvantagens, outras tecnologias vêm sendo aplicadas como alternativa à técnica de 2-DE, como a MudPIT (*multidimensional protein identification technology*). Essa metodologia é considerada rápida e sensível na identificação de proteínas de misturas complexas, pois os peptídeos gerados da digestão triptica são diretamente separados por cromatografia líquida e analisados por espectrometria de massa (Link *et al.*, 1999). Nesta abordagem, os espectros gerados por MS/MS são coletados, automaticamente processados e comparados com espectros teóricos gerados a partir de sequências disponíveis nos bancos de dados para a identificação das proteínas (Wang e Hanash, 2003).

A utilização dessa tecnologia, que associa o uso de cromatografia multidimensional à espectrometria de massa, vem sendo aplicada na identificação de proteínas de diferentes organismos, incluindo plantas (Nägele *et al.*, 2004). Além disso, estudos recentes têm mostrado o uso da análise por MS^E na quantificação de proteínas de plantas (Levin, Hradetzky e Bahn, 2011; Murad *et al.*, 2011). Cheng *et al.* (2009) mostraram que a utilização da técnica de cro-

matografia líquida associada a análise por MS^E (LC/ MS^E) foram eficientes para a identificação e quantificação de proteínas induzidas em resposta a estresses. Barvkar *et al.* (2012) utilizaram essa mesma técnica para a identificação de milhares de proteínas envolvidas com o desenvolvimento de sementes de linho. O uso dessas ferramentas também vem sendo aplicadas em estudos de soja geneticamente modificados para identificação da proteína de interesse (Murad *et al.*, 2011), assim como, em tomate, para o estudo de proteínas de membrana (Mbeunkui e Goshe, 2011). Entretanto, não há relatos de estudos de interações planta-vírus utilizando a abordagem MudPIT associada a análise quantitativa por MS^E.

Neste estudo a metodologia de 2D-nanoUPLC/MS^E foi utilizada para obter informações sobre o perfil proteômico, os possíveis mecanismos e vias metabólicas envolvidos na interação entre o begomovírus ToCMoV e linhagens quase-isogênicas de tomateiro resistente e suscetível. Os perfis globais de proteínas obtidos por essa metodologia poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos de ação envolvidos no sucesso da interação ToCMoV-planta. A recente divulgação do sequenciamento completo do genoma de tomateiro pelo "The Tomato Genome Consortium" (Consortium, 2012) permitirá a identificação de um maior número de proteínas, incluindo proteínas envolvidas na defesa/resistência da planta em interações resistentes e suscetíveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Linhagens quase-isogênicas de tomateiro LAM 157 (resistente) e Santa Clara (suscetível) geradas pelo Programa de Melhoramento da Embrapa Hortaliças, foram utilizadas

para avaliação da expressão diferencial de proteínas em resposta a ToCMoV. Sementes das duas linhagens de tomateiro foram germinadas em substrato (Plantmix) e crescidas em casa de vegetação até atingirem o estágio de 2-3 folhas verdadeiras quando foram utilizadas para inoculação.

2.2. Inoculação das plantas e coleta de material

Plantas de tomate da linhagem LAM 157 e Santa Clara foram inoculadas com o clone infeccioso de ToCMoV, isolado BA-Se1 (DNA-A e DNA-B; Figura 2.1) e com o plasmídeo pBlueScript (pBS), como controle, de acordo com Ribeiro *et al.* (2007). Plântulas com 2-3 folhas verdadeiras foram inoculadas, por biobalística, utilizando aproximadamente 2,5 µg de cada componente viral ou 5µg do vetor pBlueScript precipitados em partículas de tungstênio (Blawid *et al.*, 2013). As plantas foram mantidas em câmara de crescimento e o desenvolvimento dos sintomas foi monitorado. No décimo terceiro dia após a inoculação (dai), folhas foram coletadas e usadas para confirmação da infecção viral por meio de PCR. No décimo quinto dai, toda a parte apical das plantas foi coletada, congelada imediatamente em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C.

2.3. Confirmação da infecção viral por PCR

As folhas das plantas das linhagens de tomateiro resistente e suscetível bombardeadas com o clone infeccioso de ToCMoV e com o vetor de clonagem pBS foram utilizadas para extração de DNA total com o método CTAB (Doyle e Doyle, 1987). Uma folha jovem de cada planta inoculada foi coletada em microtubo de 1,5 mL e macerada. Em seguida, foram

adicionados 800 µL de tampão CTAB (2% brometo de hexadeciltrimetil amônio, 1,4 M NaCl, 0,2% 2-mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0) e 400 µL de clorofil (24:1; clorofórmio: álcool isoamílico). Cada amostra foi agitada vigorosamente, incubada a 54 °C por 10 min. (sob agitação) e centrifugada à 13.200 rpm por 10 min.

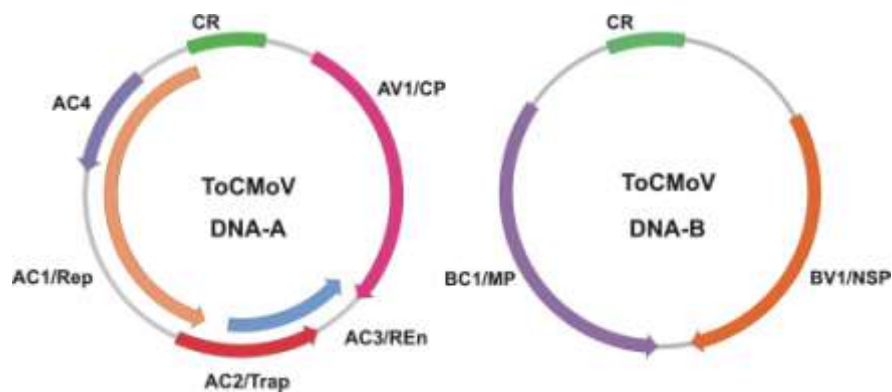


Figura 2.1. Organização genômica do Tomato chlorotic mottle vírus (ToCMoV). AC1/Rep: proteína associada à replicação, AC2/TRAP: fator transcricional, AC3/REn: *replication enhancer*, AV1/CP: capa proteica, BV1/NSP: proteína de transporte nuclear, BC1/MP: proteína de movimento, CR: região comum.

A fase aquosa foi recuperada em um novo microtubo de 1,5 mL, no qual foram acrescentados 1,2 volumes de isopropanol (misturado por inversão). Novamente, cada amostra foi centrifugada à rotação máxima por mais 10 min. e o sobrenadante descartado. Foram acrescentados 500 µL de etanol 70% e o tubo foi centrifugado à rotação máxima por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em centrífuga a vácuo por aproximadamente 15 min. Após secagem, o DNA foi ressuscitado em água ultra pura e utilizado em reações de PCR com os primers degenerados PAR1v1978 (5'- GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT-3')

e PAR1c496 (5'-AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG-3') que amplificam um fragmento de aproximadamente 1,1 kb do genoma dos begomovírus (Rojas *et al.*, 1993). Foram utilizados na reação 1µL de DNA, 0,15 µM de cada primer, 150 µM de dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase, tampão correspondente (Invitrogen) a 1X e sob as seguintes condições de temperatura: 5 min a 95 °C, 30 ciclos por 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C, 1 ½ min a 72 °C, e a para extensão final, 5 min a 72 °C. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1% e visualizados com corante brometo de etídio sob luz ultravioleta.

2.4. Extração de proteínas de tomateiros

Para a extração de proteína total, foram coletas folhas de plantas confirmadamente infectadas com ToCMoV. Proteínas totais foram extraídas de aproximadamente 2 mg de tecido vegetal macerado em nitrogênio líquido. Três experimentos biológicos foram realizados. Proteínas foram extraídas de acordo com Mot & Vanderleyden (1989) pela adição de 750 µL de tampão de extração (0,7 M sacarose, 0,5 M Tris-HCl, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0,1 M KCl, e 40 mM DTT) ao material vegetal macerado e o mesmo volume de fenol. As amostras foram agitadas por 15 min. e centrifugadas por 3 min à 12 000 rpm. A fase superior foi transferida para um novo tubo e duas novas extrações foram feitas com o tampão de extração. As proteínas foram precipitadas em 0,1 M de acetato de amônio (em metanol), lavadas com acetona 80%. O pellet foi seco a 37 °C por 5-10 min., e as proteínas foram ressuspensas em 50 mM de bicarbonato de amônio. Proteínas insolúveis foram descartadas. Proteínas totais solúveis das linhagens 157 e Santa Clara infectadas com o vírus e seus respectivos controles negativos foram quantificadas utilizando Qubit® Fluorometer

(Invitrogen). A concentração de proteínas totais obtida para cada amostra foi de aproximadamente 1,3 µg/µL.

2.5. Preparação das amostras para aquisição por 2D-nanoUPLC/HDMS^E

A mistura complexa de proteínas das amostras de Santa Clara e LAM 157 foram preparadas para a aquisição por 2D NanoUPLC-HDMS^E de acordo com Murad *et al.* (2011) com algumas alterações. Um total de 50 µL de amostra contendo 1,3 µg/µL foi utilizado. A essa alíquota foram adicionados 10 µL de 50 mM bicarbonato de amônio e 25 µL do surfactante *RapiGest*TM SF - Waters (0,2% v/v). As amostras foram agitadas e aquecidas a 80 °C por 15 min. Em seguida, as proteínas foram reduzidas pela adição de 2,5 µL de 100 mM DTT, agitadas novamente e aquecidas a 60°C por 30 min. Para alquilação, foram utilizados 2,5 µL de 300 mM iodoacetamida. As amostras foram misturadas e incubadas por 30 min., a temperatura ambiente e protegidas da luz. A digestão trípica foi feita pela adição de 20 µL de tripsina (400 µL de 50mM bicarbonato de amônio por 20 µg de tripsina). Após homogeneização, por agitação, as amostras foram incubadas a 37°C por aproximadamente 22 h. Para interromper a digestão, clivar e precipitar o surfactante, foram adicionados 10 µL de TFA (ácido trifluoracético - 5% v/v) e as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 90 min. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, durante 30 min., a 10 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e seco completamente em centrífuga a vácuo. O pellet foi ressuscitado em 50 µL de 200 mM de formato de amônio. Uma alíquota de 10 µL foi transferida para um *vial* (Waters), onde foram adicionados mais 37,5 µL de 200 mM de formato de amônio e 2,5 µL de Phosphorylase b (Waters MassPREPTM Digestion Standard) na concentração final de 50 fmol. µL⁻¹.

2.6. Análise dos peptídeos trípticos por 2D-nanoUPLC/HDMS^E

Os peptídeos trípticos foram analisados pelo sistema nanoACQUITY™ (Waters Corp., USA) com tecnologia 2D de fase reversa dupla (RP) acoplado ao espectrômetro de massa Synapt G2 HDMS™ (Waters, Manchester, UK). Os peptídeos foram separados em cromatografia líquida de ultra performance (UPLC), usando uma coluna XBridge™ 300 µm x 50 mm nanoEase™ BEH130 C18 de partícula de 5 µm (primeira dimensão-PD), uma pré-coluna (Symmetry C18 5 µm, 5-mm x 300-µm) e uma coluna HSST3 C18 (partícula de 1,8µm, 75µm x 150mm de fase reversa) (Waters, USA), segunda dimensão-SD. Na PD, foi utilizado como fase móvel A 20 mM formato de amônio e como fase móvel B, acetronitrila. Na SD, a fase móvel A foi 0,1% ácido fórmico (aquoso) e a fase móvel B foi 0,1% de ácido fórmico em acetronitrila. Foram feitas duas corridas: uma durante 70 min. para checar a digestão e quantificação da amostra (1D) e outra completa (2D) de 5 h, usando 5 frações de cada amostra. Para a primeira corrida, 2 µL de amostra foram transferidos para a coluna de PD (0,5 min. por 2 µL.min.⁻¹ e 0,1% de fase móvel B), no qual os peptídeos foram eluídos (2 µL.min.⁻¹ e 65% de fase móvel B) em 4 min. e diluídos para a pré-coluna da SD usando 0,1% ácido fórmico aquoso com um fluxo de 20 µL.min.⁻¹ por 20,5 min. (pH 10/pH 3). O calibrante utilizado para correção das massas foi o Glu-fibrino peptide (GFP). Após a aquisição, as amostras foram quantificadas e uma segunda corrida foi realizada, utilizando as 5 frações. O volume injetado foi ajustado para a concentração de 500 ng. As amostras foram inicialmente transferidas para a coluna da PD em 0,5 min. a 2 µL.min.⁻¹ e 0,1% fase móvel B e os peptídeos da primeira fração foram eluídos a 2 µL.min.⁻¹ e 10,8% de fase móvel B por 2 min., sendo diluídos para a pré-coluna da SD usando 0,1% ácido fórmico aquoso com um fluxo de 20 µL.min.⁻¹ por 8,5 min. Os peptídeos foram separados usando um gradiente de 7-

35% de fase móvel B por 37 min. com fluxo de 500 nL.min.⁻¹, seguido por 5 min. de lavagem com 85% de fase móvel B. A coluna foi reequilibrada e os peptídeos das segunda, terceira, quarta e quinta frações foram eluídos usando 14, 16,7, 20,4 e 50% de fase móvel B, respectivamente. As mesmas condições de diluição, fluxo e análise SD utilizadas para a primeira fração, foram utilizadas para as demais frações. O calibrante foi injetado em todas as frações. Foram feitas triplicadas técnicas para cada amostra. Durante esse processo, a temperatura da coluna foi mantida a 35°C. Todas as análises foram adquiridas em modo positivo utilizando um *nanoelotrospray*. Para todas as mensurações, o espectrômetro de massa foi operado em modo positivo com resolução de pelo menos 20000 FWHM (“metade do máximo da largura do total”, do inglês *full-width half-maximum*) e em modo de aquisição independente de dados (Levin, Hradetzky e Bahn, 2011). O tempo de aquisição do espectro contínuo, em cada modo, foi de 1,5 segundos com um atraso de 0,1 segundo por *interscan*. No modo MS de baixa energia, os dados foram coletados a uma energia de colisão constante de 3 eV; no modo de alta energia, a energia de colisão foi rampeada de 27 a 50 eV a cada intervalo de 1,5 segundos do espectro.

A radiofrequência aplicada ao analisador de massas do quadrupolo foi ajustada de tal maneira que os íons com *m/z* entre 200 e 2000 fossem eficientemente transmitidos, garantindo assim que quaisquer íons com *m/z* menores que 200 que fossem observados no LC-MS tivessem surgido apenas a partir de dissociações geradas na célula de colisão *TRANSFER T-wave* do equipamento ((Giles *et al.*, 2010). A mobilidade iônica foi conduzida sob controle de gás manual com taxa de fluxo do gás da armadilha de íons a 2 mL.min.⁻¹, taxa de fluxo do gás da fonte de ionização 1 mL.min.⁻¹, taxa de fluxo do gás de resfriamento 1 mL.min.⁻¹, taxa de fluxo da célula de hélio 170 mL.min.⁻¹ e taxa de fluxo do gás do sistema de mobilidade iônica 80 mL.min.⁻¹.

2.7. Identificação e quantificação das proteínas

Os dados obtidos do 2D-MS/MS foram processados e analisados pelo ProteinLynx Global Server (PLGS) version 3.0 (Waters) para identificar e quantificar as proteínas. As proteínas foram identificadas usando banco de dados (ITAG2.3-proteins) disponibilizado pelo The International Tomato Genome Sequencing Project (http://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome) e sequências gênicas de ToCMoV disponíveis no banco de dados do NCBI. Os padrões de digestão Mass PREP (MPDS) UniProtKB/Swiss-Prot foram apensos ao banco de dados (Phosphorylase - P00489 - PHS2_RABIT, Bovine Hemoglobin - P02070 - HBB_BOVIN, ADH - P00330 - ADH1_YEAST, BSA - P02769 - ALBU_BOVIN). As identificações e quantificação foram geradas utilizando algoritmos específicos (Geromanos *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). Os parâmetros de procura incluem: carbamidomethyl-C (modificação fixa); amidação C-terminus, deamidação N, deamidação Q, methyl N-terminus, methyl C-terminus, glicação N-terminus, O-GlcNac ST e oxidação M (modificações variáveis); precisão de massa: 10 ppm e tolerância de tempo: 0,25-min. contra a massa teórica de peptídeos, com pelo menos um '*matched*' de peptídeo por proteína; 7 fragmentos iônicos por peptídeos e 3 fragmentos iônicos por peptídeo; perda de clivagem -1; limite de 4% de falsos positivos. As proteínas identificadas foram classificadas em alta confiabilidade (OK = 2), média confiabilidade (OK = 1), e baixa confiabilidade (OK = 0). Como critério rigoroso de seleção, somente foram selecionadas proteínas com alta confiabilidade (OK = 2) (Hao *et al.*, 2013).

A análise quantitativa das proteínas foi baseada nas intensidades de picos dos peptídeos usando Waters Expression^E que faz parte do programa PLGS versão 3.0. Para a quantificação das proteínas, os dados foram normalizados através da opção de 'autormalização' do programa PLGS. A dinâmica experimental foi calculada usando o programa Mass Pivot (desenvolvido

internamente) e a taxa mínima de repetição para cada proteína foi de 1. Foram realizados três experimentos biológicos. Em cada replicata biológica foram analisadas quatro condições: plantas de Santa Clara e LAM 157 inoculadas com o pBS (controle) e plantas de Santa Clara e LAM 157 inoculadas com ToCMoV. Para cada condição, um total de nove replicatas técnicas foram analisadas. Somente foram consideradas as proteínas presentes em pelo menos 4 replicatas técnicas, garantindo que as proteínas estejam presentes em pelo menos 2 replicatas biológicas (Figura 2.2).

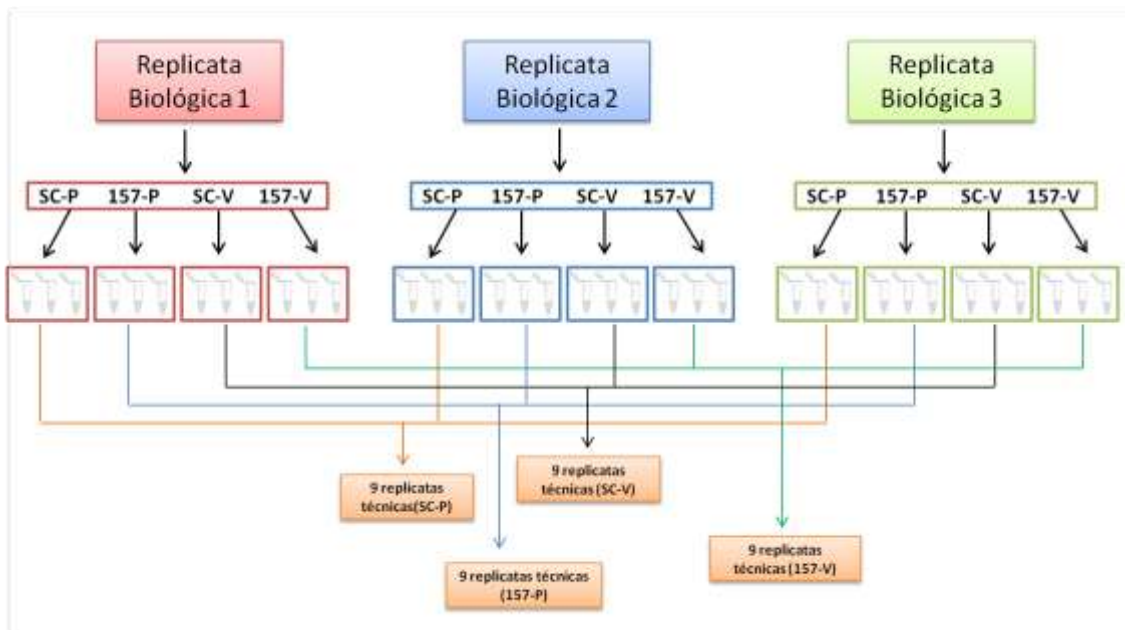


Figura 2.2. Desenho experimental utilizado para identificar as proteínas moduladas durante a infecção viral. Plantas de Santa Clara e LAM 157 foram inoculadas com ToCMoV ou com pBS (controle) e analisadas em triplicatas por experimento biológico. Para cada condição analisada, foram obtidas nove replicatas técnicas. SC-P e 157-P: plantas de Santa Clara e LAM 157 inoculadas com pBS, respectivamente; SC-V e 157-V: plantas de Santa Clara e LAM 157 inoculadas com o ToCMoV, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, duas linhagens quase-isogênicas de tomateiro, uma resistente (LAM 157) e outra suscetível (Santa Clara) foram inoculadas com o clone infeccioso do begomovírus ToCMoV e com o plasmídeo pBlueScript (pBS), como controle negativo. Essas plantas foram mantidas em câmara de crescimento até 15 dai, quando a parte apical de cada planta foi coletada, macerada e submetida à extração de proteína total. Após a confirmação da infecção viral por PCR, o perfil proteômico global da interação ToCMoV- tomateiro foi avaliado por 2D-nanoUPLC/MS^E.

3.1. Avaliação fenotípica das linhagens resistente e suscetível inoculadas com ToCMoV

Plantas das linhagens resistente (LAM 157) e suscetível (Santa Clara) bombardeadas com o plasmídeo pBS (controle) e infectadas com ToCMoV foram mantidas em câmara de crescimento para o acompanhamento do progresso da doença. Durante esse período, os sintomas foram monitorados e os primeiros sintomas de clorose somente foram visualizados nas plantas de Santa Clara por volta de 12-15 dai. Após 15 dai, plantas inoculadas com o vírus foram deixadas na câmara de crescimento para acompanhamento dos sintomas. A progressão da infecção foi avaliada durante 30 dias. Sintomas de clorose e encrespamento foram observados apenas nas plantas suscetíveis Santa Clara infectadas (Figura 2.3 B). Nenhum sintoma visível pôde ser observado nas plantas resistentes LAM 157 ou nas plantas bombardeadas com o plasmídeo pBS (controle) (Figura 2.3 A e B).

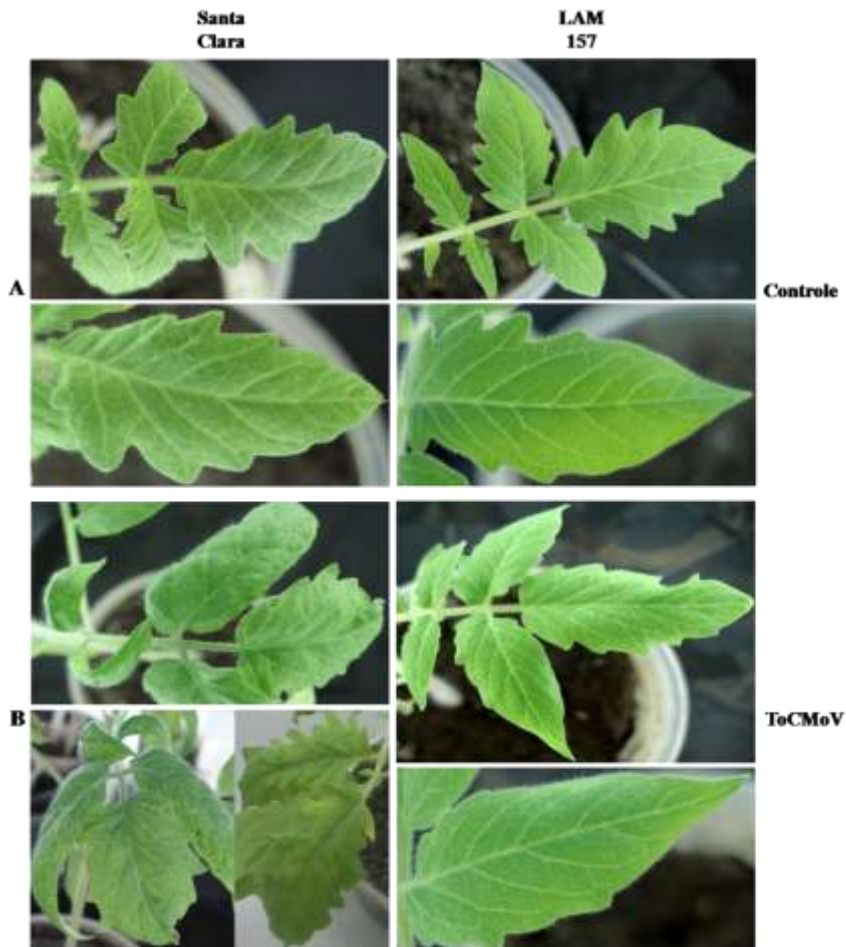


Figura 2.3. Sintomatologia das plantas de tomateiro inoculadas com ToCMoV 15 (dai) por bombardeamento. (A) Plantas controles das linhagens suscetível Santa Clara e resistente LAM 157; (B) Plantas suscetíveis Santa Clara infectadas com ToCMoV apresentando sintomas de encrespamento e mosqueado; Plantas resistentes LAM 157 infectadas com ToCMoV sem sintomas visíveis.

3.2. Confirmação da infecção viral por PCR

Plantas das linhagens LAM 157 e Santa Clara inoculadas com ToCMoV e plantas controle foram avaliadas por PCR para confirmação da infecção viral. Após extração de DNA

e reação de PCR, o DNA viral amplificado (aproximadamente 1,1 Kb) foi observado através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Uma média de 52% das plantas resistentes (LAM 157) inoculadas com ToCMoV mostraram o fragmento viral esperado, enquanto que 91% das plantas suscetíveis (Santa Clara) inoculadas com ToCMoV mostraram o mesmo fragmento, exemplificado por uma das replicatas biológicas (Figura 2.4). Trabalhos têm mostrado que a técnica de inoculação através de biobalística, utilizando clone infeccioso, é altamente eficiente para o estabelecimento da infecção viral (Gal-On *et al.*, 1995). Garzón-Tiznado *et al.* (1993) mostraram que a inoculação do clone infeccioso de begomovírus bipartido por bombardeamento apresentou uma eficiência de 60% a 70% de plantas de pimentão infectadas, indicando que esta metodologia é adequada para a inoculação viral.

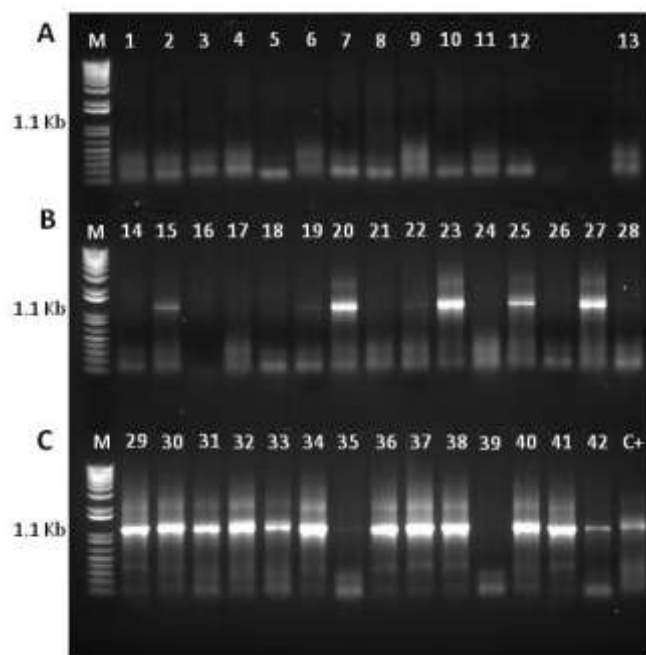


Figura 2.4. Amplificação do DNA de ToCMoV por PCR nas plantas das linhagens resistente (LAM 157) e suscetível (Santa Clara) de uma réplica biológica. Análise por eletroforese em gel de agarose 1%. (A) Amostras controle de tomateiro LAM 157 e Santa Clara bombardeadas

com pBS (1-12); (B) Amostras de tomateiro LAM 157 inoculadas com ToCMoV, mostrando o fragmento de aproximadamente 1,1Kb para as amostras positivas; (C) Amostras de tomateiro Santa Clara inoculadas com ToCMoV, mostrando o fragmento de aproximadamente 1,1Kb para as amostras positivas. C⁺: controle positivo. Marcador: 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).

3.3. Identificação de proteínas do hospedeiro moduladas durante a infecção viral

Na tentativa de compreender melhor os mecanismos de defesa/resistência e de infectividade envolvidos na interação ToCMoV-planta hospedeira, foi realizada a identificação e quantificação de proteínas solúveis de tomateiro infectado das linhagens resistente (LAM 157) e suscetível (Santa Clara). A escolha por proteínas solúveis foi baseada em trabalhos que relataram a presença de proteínas envolvidas com resposta de defesa na fração solúvel em plantas durante a infecção viral (Bol, Linthorst e Cornelissen., 1990) assim como de proteínas envolvidas nos processos de transdução de sinal (Bol, Linthorst e Cornelissen., 1990; Du e Klessig, 1997; Gorovits *et al.*, 2013). Além disso, foi observado que a proteína viral AC3 (AL3, C3 ou REn-*replication enhancer*), está presente na fração solúvel e no extrato bruto de plantas infectadas com o begomovírus bipartido Tomato golden mosaic virus (TGMV) (Pedersen e Hanley-Bowdoin, 1994). Baseado nessas informações, é possível que proteínas presentes na porção solúvel de plantas do tomateiro da linhagem resistente e suscetível possam desempenhar papéis similares durante o processo de infecção viral, auxiliando a planta pela ativação de resposta de defesa, como também, proteínas do hospedeiro que possam ser recrutadas para favorecer a infecção viral na linhagem suscetível.

Para a identificação das proteínas moduladas em tomateiro durante a infecção por ToCMoV, foi utilizada a técnica de 2D-NanoUPLC/MS^E como forma alternativa à técnica de

2-DE. Plantas confirmadamente infectadas e plantas controle foram selecionadas aleatoriamente e utilizadas na análise 2D-NanoUPLC/MS^E. Foram identificadas 345 proteínas totais, mas somente proteínas com alta confiabilidade (OK=2) foram avaliadas quanto à expressão diferencial. Para a análise do perfil proteico do tomateiro infectado com ToCMoV, foram realizadas comparações entre tomateiros resistente/suscetível infectados com ToCMoV e seus respectivos controles. Na interação envolvendo resistência (LAM 157 inoculado x LAM 157 não inoculado) foram identificadas 329 proteínas, sendo 67 diferencialmente expressas, incluindo 34 aumentadas e 31 diminuídas nas plantas resistentes inoculadas (Figura 2.5; Tabela 2.1). Na interação envolvendo suscetibilidade (Santa Clara inoculada x Santa Clara não inoculada) foram identificadas 329 proteínas, sendo 40 proteínas diferencialmente expressas, incluindo 21 aumentadas, 18 diminuídas e 1 proteína exclusiva nas plantas suscetíveis inoculadas (Figura 2.5; Tabela 2.2). Além disso, pôde-se observar que entre as proteínas identificadas, algumas são compartilhadas entre as interações de resistência e suscetibilidade durante o processo de infecção viral (Tabela 2.3).

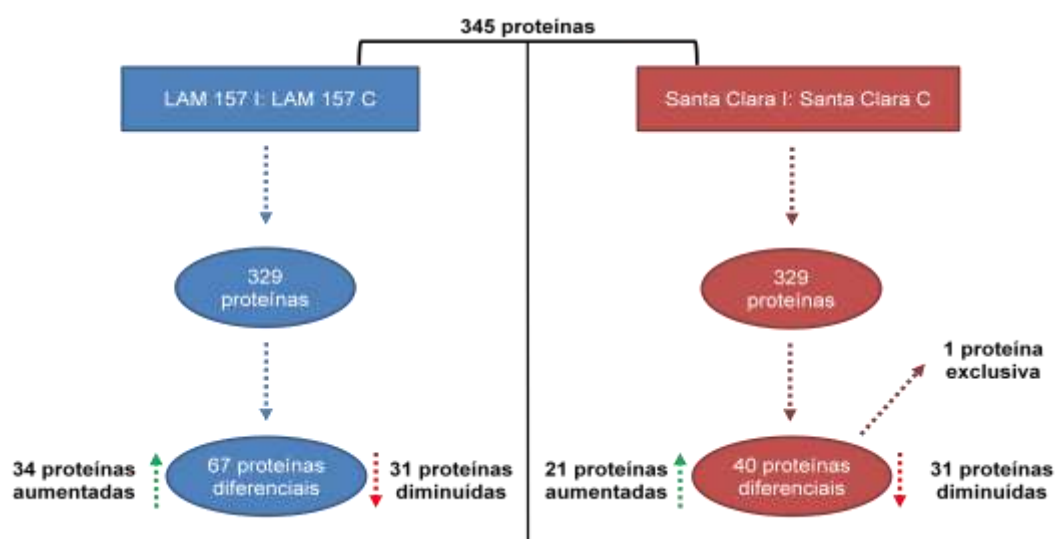


Figura 2.5. Fluxograma mostrando o número de proteínas identificadas e diferencialmente expressas por meio da técnica 2D-NanoUPLC/MS^E.

3.3.1. Proteínas relacionadas à defesa/resistência moduladas na interação resistente

Para compreender melhor a amplitude de ação do gene de resistência *tcm-1* durante o processo de infecção viral, foi realizada uma comparação entre o tomateiro resistente inoculado com o ToCMoV e sua planta controle (15 dai). A análise do perfil proteico revelou, pela primeira vez, diferentes processos biológicos que pontencialmente são afetados durante a infecção por este begomovírus e que podem estar sob a ação do gene de resistência *tcm-1* (Figura 2.6). Entre as proteínas identificadas, destaca-se a histona H4, que representou 19% de todas as proteínas diferencialmente expressas nesta análise comparativa. Foram observadas várias cópias de histona H4, com expressão aumentada, somente nas plantas resistentes inoculadas, não sendo observadas na interação entre o tomateiro suscetível inoculado com ToCMoV.

As histonas são conhecidas por empacotar o DNA através da agregação das histonas H2A, H2B, H3 e H4 (duas de cada), formando assim, o nucleossomo. Além disso, essas proteínas podem ter papéis importantes durante a interação planta-vírus. No caso de interações planta-geminivírus, as histonas da planta hospedeira são utilizadas para formar os minicromossomos. Este processo ocorre quando o DNA viral (DNA fita simples) chega no núcleo, é convertido em DNA circular de fita dupla e empacotado em minicromossomos (Pilartz e Jeske, 1992). Já foi mostrado que a proteína histona H3 interage com proteínas de movimento viral, NSP e MP, do geminivírus Bean dwarf mosaic virus, formando complexo H3, NSP, MP e DNA viral. Esses autores sugerem que esta histona possa ter um papel na movimentação viral (Zhou, Y. *et al.*, 2011). Góngora-Castillo *et al.* (2012) revelaram que tecidos recuperados e sintomáticos de pimentão infectado com Pepper golden mosaic virus mostraram um aumento de expressão das histonas H3, H4, H2A e H2B. Estes autores

sugerem que essas proteínas possam ter uma importante participação na resposta da planta à infecção viral e no processo de recuperação.

As histonas também possuem um papel importante na regulação da expressão gênica de forma epigenética (Over e Michaels, 2013). Esse mecanismo de regulação gênica já foi relatado em plantas com defesa epigenética contra vírus de DNA. Plantas infectadas com geminivírus utilizaram do mecanismo de metilação da histona H3 (H3K9) associada ao DNA viral para combater a infecção (Raja *et al.*, 2008). Além disso, a metilação desta histona é amplamente observada em cromatina viral (Raja *et al.*, 2008). Mais recentemente, foi relatado que tomateiros resistente e suscetível ao geminivírus Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) mostraram respostas distintas ao estresse causado pela infecção. Foi observado um aumento duas vezes maior da histona H4 em tomateiro resistente em comparação ao tomateiro suscetível infectado (Adi *et al.*, 2012).

Foi interessante notar neste trabalho, um aumento da proteína histona H4 no tomateiro com ampla resistência a begomovírus mono e bipartidos (LAM 157) infectado com ToCMoV quando comparado com a condição controle. Esse resultado não foi observado na comparação entre o tomateiro suscetível Santa Clara infectado com ToCMoV e sua planta controle, ou seja, não houve nenhuma expressão significativa dessa proteína durante essa interação. Portanto, é possível que a ativação de histona H4 no tomateiro resistente LAM 157 seja um mecanismo de defesa contra a infecção causada por ToCMoV e seja controlada pelo gene de resistência *tcm-1*.

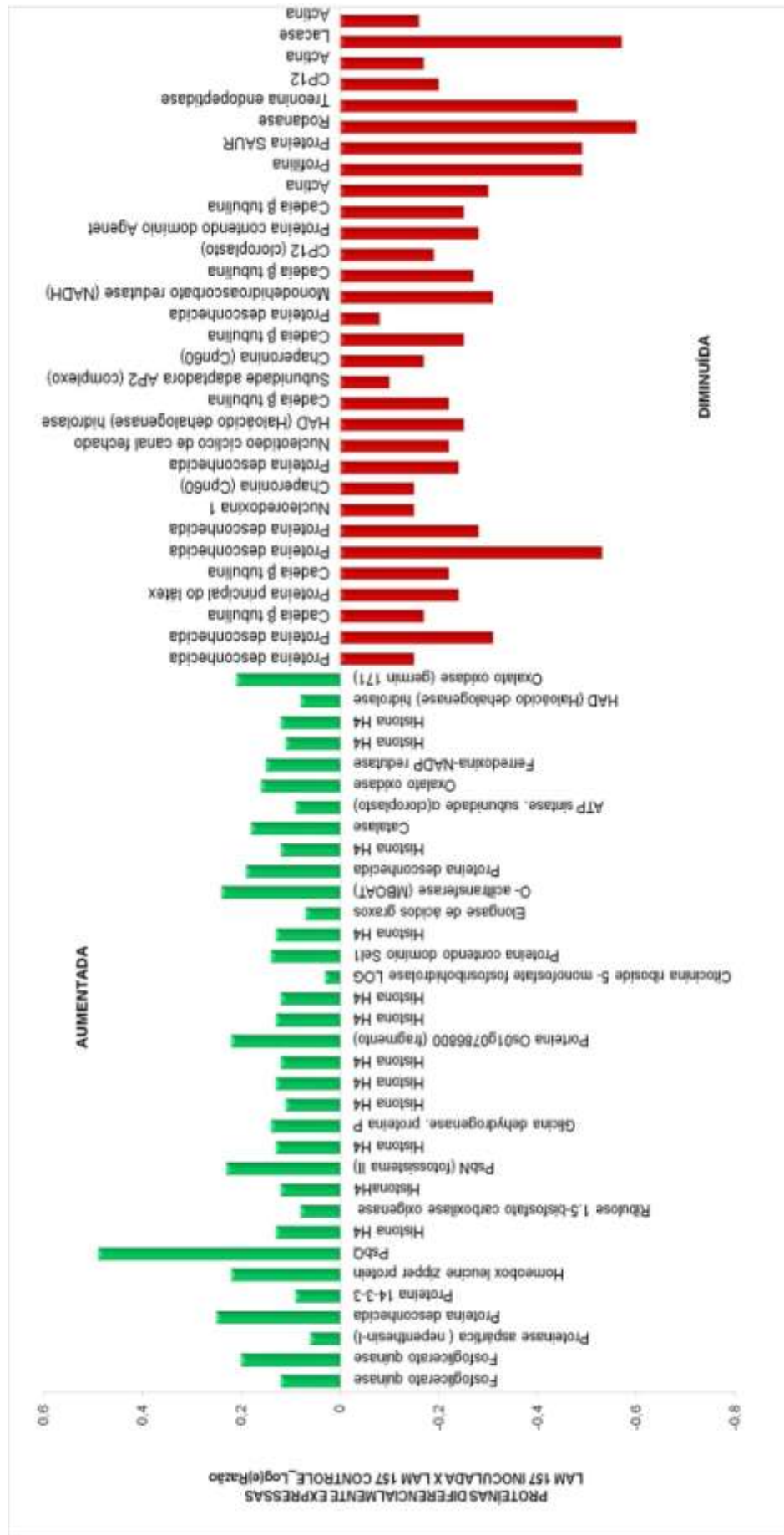


Figura 2.6. Análise comparativa entre plantas resistentes LAM 157 inoculadas com ToCMoV e não inoculadas (controle). O gráfico representa a razão em escala logarítma (logaritmo natural) das proteínas diferencialmente expressas nas plantas resistentes inoculadas com ToCMoV.

Outra proteína interessante identificada neste estudo foi a proteína 14-3-3, com um aumento de expressão nas plantas resistentes infectadas com ToCMoV. Essa proteína está presente em todas as células eucarióticas, regulando a atividade de uma gama de proteínas-alvo de importantes processos biológicos (Fu, Subramanian e Masters, 2000; Roberts, 2003). Em plantas, a proteína 14-3-3 pode atuar em resposta ambiental, metabólica e na resposta de defesa à patógenos (Roberts, Salinas e Collinge, 2002). Trabalhos têm mostrado a participação dessa proteína como mediador de resistência à doenças causadas por fungos e bactérias. Em interações de incompatibilidade foi observado que a proteína 14-3-3 pode interagir e ativar proteínas importantes para a indução de morte celular programada (Finni *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2009; Oh e Martin, 2011). Por outro lado, no presente trabalho, foi observado que essa proteína apresentou uma diminuição de expressão no tomateiro suscetível Santa Clara infectado com ToCMoV quando comparado com seu controle. Esse fato pode sugerir que o acúmulo da proteína 14-3-3, ocorrido apenas no tomateiro resistente LAM 157, esteja diretamente ligado a presença do gene de resistência *tcm-1*, ou seja, é possível que esse gene ative vias biológicas importantes para ação da proteína 14-3-3 como mediador de defesa da planta.

Foram também observadas várias proteínas com expressão diminuída nas plantas resistentes infectadas com ToCMoV, como a proteína SAUR (*Auxin induced SAUR like protein*), rodanese (*rhodanese-like*), treonina endopeptidase e lacase. As proteínas SAUR são conhecidas por serem induzidas pela ativação da auxina, crucial para o desenvolvimento da planta (Hagen e Guilfoyle, 2002). mostrado que essas proteínas são induzidas em plantas suscetíveis infectadas com geminivírus, possivelmente, para criar condições celulares favoráveis para a replicação viral nas folhas apicais (Pierce e Rey, 2013). Assim como a proteína SAUR, a rodanese também é induzida em plantas suscetíveis infectadas por vírus

(Whitham *et al.*, 2003) e pode ser encontrada no floema (Walz *et al.*, 2004), sistema vascular utilizado pela maioria dos geminivírus para replicação e acúmulo viral (Thompson e Schulz, 1999). O mesmo acontece com a treonina endopeptidase, uma enzima proteolítica, que é induzida em tomate infectado por Potyvírus (Alfenas-Zerbini *et al.*, 2009) e com a lacase, uma glicoproteína que está envolvida em diferentes processos como lignificação da parede celular, a regeneração de protoplasto de fumo (Mayer e Staples, 2002), virulência e tolerância a estresses ambientais em fungos (Fang *et al.*, 2010). Diferentemente desses resultados, o presente trabalho mostrou uma redução significativa dessas proteínas na planta resistente infectada por geminivírus. Isso pode indicar um novo mecanismo de defesa encontrado pela planta hospedeira, sob controle do gene *tcm-1*, em combater o patógeno e consequentemente, impedir o avanço da infecção.

3.3.2. Proteínas relacionadas com a infectividade viral que foram moduladas em tomateiro suscetível

Outra comparação foi realizada entre plantas de tomateiro suscetível Santa Clara infectado com ToCMoV e suas plantas controle (interação de suscetibilidade). O objetivo dessa análise foi tentar compreender os mecanismos envolvidos no processo de infecção que favoreçam o begomovírus ToCMoV em sua planta hospedeira. E pela primeira vez, foi demonstrado o perfil proteico de plantas de tomateiro suscetível Santa Clara infectados com ToCMoV.

A análise do perfil proteômico do tomateiro suscetível infectado com ToCMoV revelou que proteínas associadas a diferentes processos biológicos, como a ubiquitinação,

dobramento proteico, fotossíntese e tradução foram afetados. Esses processos podem indicar os mecanismos virais que contribuem para a infectividade de ToCMoV (Figura 2.7).

Entre as proteínas identificadas está a ubiquitina. Essa proteína não foi visualizada no tomateiro resistente LAM 157 infectado com esse begomovírus. Sabe-se que a ubiquitina é uma proteína que se liga a proteínas-alvo (ubiquitinação), mediando a proteólise de importantes proteínas celulares envolvidas em resposta a estresse, ciclo celular, regulação transcricional, reparo de DNA, entre outros (Glickman e Ciechanover, 2002). Foi mostrado que as vias de ubiquitinação são alvos de vírus de planta em benefício próprio através de diferentes mecanismos (Alcaide-Loridan e Jupin, 2012). Diversos trabalhos envolvendo proteínas de geminivírus têm sido relatados, mostrando a diversidade dos mecanismos utilizados por esses vírus. Várias proteínas virais como, C4, C2, β C1 e Rep interagem com proteínas do hospedeiro, incluindo proteínas envolvidas no processo de ubiquitinação (Castillo *et al.*, 2004; Eini *et al.*, 2009; Lozano-Duran e Bejarano, 2011; Lozano-Durán, Rosas-Díaz, Gusmaroli, *et al.*, 2011; Sánchez-Durán *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Mais recentemente, foi mostrado que o fator de patogenicidade AC2 (C2, AL2 e TrAP) do begomovírus TocMoV é capaz de ativar a expressão da proteína SGT1 (Carmo *et al.*, 2013), proteína que interage com complex SCF (SKP1–Cullin–F-box) da E3 ubiquitin ligase (Zhang *et al.*, 2008). Com base nesses resultados, é provável que proteínas virais do ToCMoV estejam interagindo com proteínas associadas com o processo de ubiquitinação na tentativa de garantir o avanço da infecção. A ubiquitina foi também encontrada somente nas plantas-controle não inoculadas de plantas LAM 157, não sendo regulada nas plantas resistentes infectadas. Isso pode indicar que essa proteína esteja sendo ativada somente para favorecer a infecção viral, como um mecanismo utilizado para driblar as vias básicas de defesa da planta hospedeira.

Uma proteína que parece ter um papel importante durante a infecção causada por ToCMoV foi a proteína de choque térmico 70 (HSP70), chaperona envolvida em diferentes processos celulares, como o controle das atividades de proteínas reguladoras e o reestabelecimento das conformações proteicas nativas sob condições de estresse (Rajan e D'silva, 2009). É bem conhecido que essas chaperonas são induzidas em plantas durante a infecção viral. Escaler *et al.* (2000) mostraram que o aumento de HSP70 em tecido embrionário de ervilha infectado com diferentes vírus está associado com a replicação viral. Resultados semelhantes também foram obtidos por Wang *et al.* (2009), que sugeriram que a HSP70 desempenha importantes papéis na replicação do Tomato bushy stunt tobusvirus. Lozano-Durán *et al.* (2011) também mostraram a importância da HSP70 na infecção causada pelo begomovírus Tomato yellow leaf curl Sardinia virus. Esses autores propuseram que um aumento dessa proteína é requerido para uma completa infecção viral. Além disso, foi sugerido que a interação da HSP70 com a proteína de movimento MP do begomovírus Abutilon mosaic virus é importante para o transporte viral e indução de sintomas em *Arabidopsis thaliana* (Krenz *et al.*, 2010). Mais recentemente, Góngora-Castillo *et al.* (2012) mostraram que folhas de pimentão com sintomas causados pelo begomovírus Pepper golden mosaic virus apresentaram níveis induzidos do gene que codifica a HSP70. Todos esses dados corroboram o resultado encontrado neste trabalho, no qual a HSP70 foi aumentada nas plantas de tomateiro suscetível infectado com ToCMoV. Pela primeira vez, foi mostrada a participação dessa chaperona durante a infecção causada por ToCMoV. Possivelmente, a HSP70 é recrutada para favorecer a replicação viral e o desenvolvimento de sintomas em plantas hospedeiras.

Outra proteína identificada e que pode estar associada à infectividade de ToCMoV foi a MLO-like. Essa proteína consiste de sete domínios transmembrânicos (Devoto *et al.*, 2003) e que mostrou um aumento de expressão maior nas plantas de tomateiro suscetível infectados

com ToCMoV. Sob condições de estresse abiótico e biótico, a proteína MLO pode ser modulada, sugerindo sua participação em diversos processos de desenvolvimento da planta (Chen *et al.*, 2006). Trabalhos têm mostrado que os elevados níveis de expressão gênica de MLO estão associados ao aumento de suscetibilidade de fungos fitopatogênicos. Büschges *et al.* (1997) propuseram que o gene *Mlo* é capaz de modular a resposta de defesa e morte celular em folhas de cevada infectada com *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Assim como foi observado no trabalho de Kim *et al.* (2002). Esses autores mostraram que na ausência de calmodulina, a proteína MLO regula negativamente a resposta de defesa contra *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. Zheng *et al.* (2013) também mostraram que o aumento de expressão desse gene está associado ao aumento de suscetibilidade ao fungo *Leveillula taurica*. O presente trabalho revelou pela primeira vez o aumento da proteína MLO-like associada a infecção por ToCMoV. Baseado nestes trabalhos, é possível que essa proteína esteja sendo regulada para combater a resposta de defesa da planta hospedeira, aumentando assim, a suscetibilidade do tomateiro Santa Clara ao begomovírus ToCMoV.

Foram observadas duas proteínas associadas com a fotossíntese que foram significativamente moduladas, a CP43 e a proteína PsaA. Enquanto a CP43 foi modulada positivamente nas plantas de tomateiro suscetíveis infectadas, a proteína PsaA foi modulada negativamente. A CP43 faz parte do fotossistema II, dando estabilidade a esse sistema e sendo essencial na atividade de processamento do oxigênio (Bricker e Frankel, 2002). Foi relatado que plantas infectadas com a linhagem *flavum* do Tobacco mosaic virus mostraram níveis de expressão dessa proteína diminuídos (Lehto *et al.*, 2003). Entretanto, Adi *et al.* (2012) mostraram que a proteína CP47, que também faz parte do fotossistema II (Bricker e Frankel, 2002), apresentou níveis mais elevados em tomateiro suscetível infectado com o begomovírus Tomato yellow leaf curlvirus quando comparado com o tomateiro resistente.

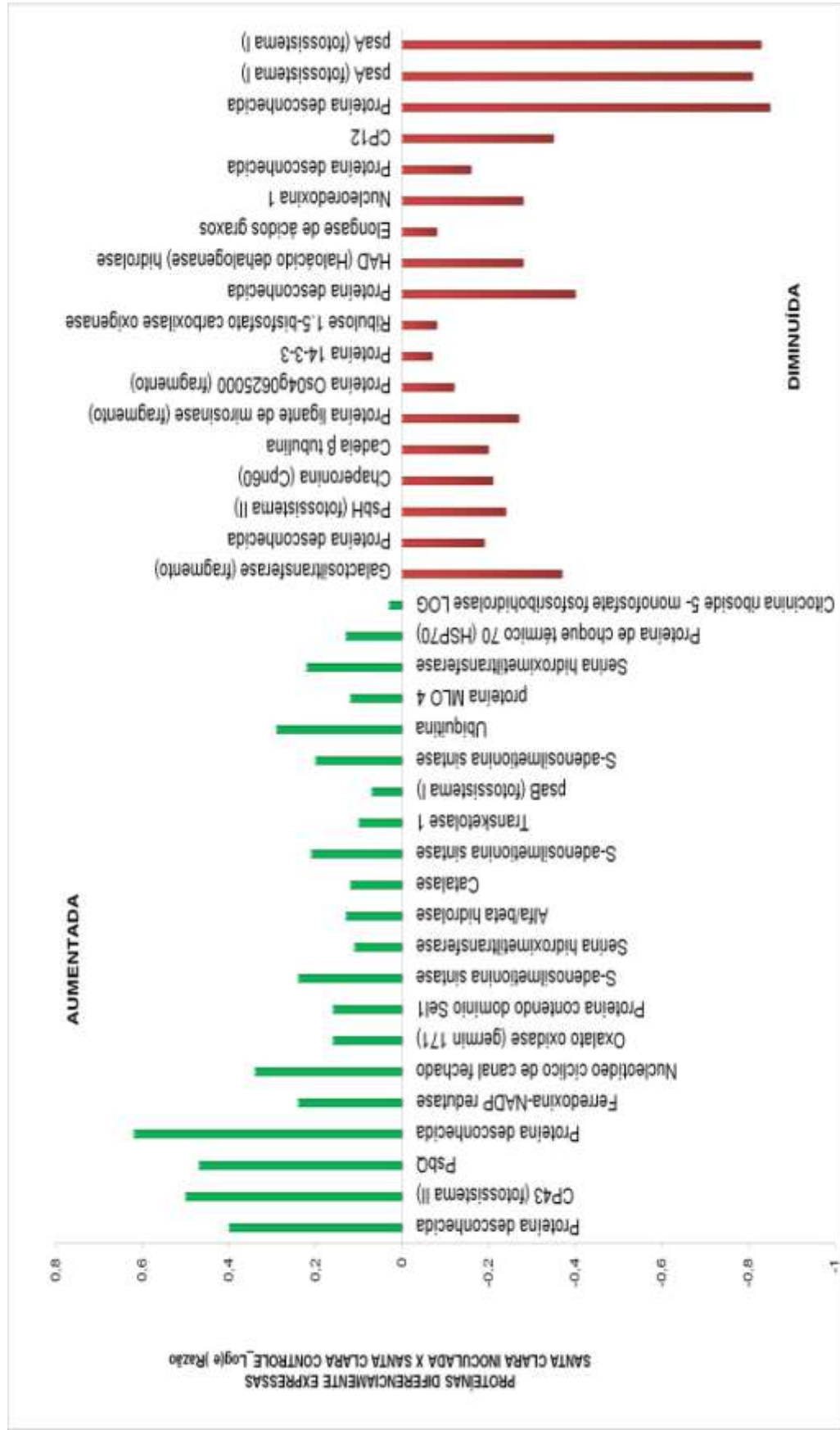


Figura 2.7. Análise comparativa entre plantas suscetíveis Santa Clara inoculadas com ToCMoV e não inoculadas (controle). O gráfico representa a razão em escala logarítmica (logaritmo natural) das proteínas diferencialmente expressas nas plantas suscetíveis inoculadas com ToCMoV.

Diferentemente, a proteína PsaA, uma das principais subunidades que está presente no centro de reação do fotossistema I (PSI) (Golbeck, 1992) é afetada sob condições de estresse. Durante a fotoinibição do PSI ocorre a degradação das proteínas PsaA/PsaB (Ozakca, 2013). Esses dados sugerem que as proteínas fotossintéticas respondem de maneira distinta em tomateiro suscetível infectado com ToCMoV. Provavelmente, a proteína CP43 esteja sendo aumentada na tentativa de reestabelecer o PSII afetado pelo avanço da infecção viral. Enquanto que a proteína PsaA pode estar sendo degradada como consequência do estresse oxidativo causado pela infecção viral.

Foi observada também a expressão de uma proteína envolvida na tradução de proteínas, a proteína L14 que pertence ao complexo ribossomal 60S. Essa proteína foi identificada apenas nas plantas de tomateiro suscetível infetadas com ToCMoV. Estudos anteriores mostraram que uma proteína transativadora do Cauliflower mosaic virus pode interagir com as proteínas L18 e L24 do complexo ribossomal 60S para, possivelmente, permitir a tradução policistrônica do RNA viral (Leh, Yot e Keller, 2000; Park *et al.*, 2001). Mais recentemente, Carmo *et al.* (2013) mostraram que plantas infectadas com PVX expressando a proteína viral AC2 do ToCMoV apresentam um aumento da proteína ribossomal L12-1a quando comparada com plantas infectadas apenas com PVX. A proteína AC2 é conhecida por transativar outros genes virais, como genes da CP e a NSP (Sunter e Bisaro, 1991; 1992). É provável que o ToCMoV esteja recrutando a maquinaria celular da planta hospedeira para favorecer o avanço viral. Isso pode ser um indicativo que a proteína ribossomal (L14) está sendo recrutada durante a infecção para permitir a tradução de proteínas virais importantes para completar o ciclo de multiplicação viral e possivelmente, isso ocorra devido a interação com a proteína transativadora AC2.

3.3.3. Proteínas moduladas nas linhagens de tomateiro resistente e suscetível durante a infecção com ToCMoV

Com base nas análises comparativas feitas entre os tomateiros infectados com ToCMoV e seus controles (LAM 157 I x LAM 157 NI e Santa Clara I x Santa Clara NI), foi possível observar que 11 proteínas apresentaram perfis semelhantes nas duas interações analisadas (resistência e suscetibilidade). Destas, 5 proteínas foram aumentadas e 6 diminuídas nas duas interações. Essas proteínas têm sido associadas a respostas a condições de estresse causado por fatores bióticos ou abióticos. Entre elas está a proteína contendo domínios repetitivos de Sell (*Sell domain protein repeat containing protein*), que é caracterizada por servir de adaptador na montagem de complexos de macromoléculas, ativada em condições de estresse e participar da degradação de proteínas (Mittl e Schneider-Brachert, 2007). Outra proteína aumentada nas duas interações é a Proteína 3 ativadora do processamento de oxigênio (*Oxygen evolving enhancer protein 3*, PsbQ), uma proteína do fotossistema II que tem mostrado expressão reduzida em plantas infectadas por tobamovirus (Pérez-Bueno *et al.*, 2004), mas que em tomateiros infectados com o TYLCV, sua expressão é maior no tomateiro resistente (Adi *et al.*, 2012). A expressão da oxalato oxidase, que está associada a um aumento de resistência a patógenos, como o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Donaldson *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2003; Calla *et al.*, 2014) e da Citocinina riboside 5-monofosfate fosforibohidrolase (LONELY GUY), enzima que tem um papel importante na regulação do hormônio citocinina durante o crescimento e desenvolvimento da planta (Kuroha *et al.*, 2009) foram também aumentadas nas duas interações. Sabe-se que o aumento dos níveis de citocinina contribui para a resposta de defesa da planta contra patógenos (Dermastia e Ravnkar, 1996; Choi *et al.*, 2010).

Algumas proteínas foram reprimidas nas duas interações, incluindo a HAD (Haloácido dehalogenase-superfamília de hidrolase) que podem estar envolvida em diferentes processos catalíticos associados a metabolismo primário e secundário, transdução de sinal, reparação de ácido nucléico e transporte de membrana. Essa superfamília é representada por enzimas que atuam na hidrólise de diferentes substratos (Koonin e Tatusov, 1994; Allen e Dunaway-Mariano, 2004), sendo conservada em diversos organismos (Burroughs *et al.*, 2006). Já foi mostrado que essa superfamília pode favorecer a patogenicidade do fungo fitopatogênico *Verticillium dahliae* (El-Bebany, Rampitsch e Daayf, 2010).

Foi também demonstrada a modulação negativa de uma chaperona, a chaperonina 60 (Cpn 60), nas duas linhagens de tomateiro infectadas. A Cpn 60 é uma importante chaperona para organismos eucariotos e procariotos que pode executar diferentes funções além de dobramento proteico e reparo de dobramento irregular de proteínas (Horwich *et al.*, 2007; Henderson, Fares e Lund, 2013). Sob condições de estresse, essas proteínas podem se acumular (Holland *et al.*, 1998), como por exemplo, em tomateiro resistente infectado com begomovírus que apresentou uma quantidade maior de chaperonin 60 β quando comparada com a planta suscetível (Adi *et al.*, 2012). Foi interessante observar que as plantas infectadas com ToCMoV apresentaram uma diminuição da Cpn 60. É possível que genes que codificam essas proteínas estejam sendo regulados negativamente pela planta como um mecanismo de defesa na tentativa de impedir o avanço viral. Ishikawa *et al.* (2003) mostraram que a deleção de um gene que codifica a chaperonin 60 β causa morte celular em *Arabidopsis*, sugerindo que a deficiência dessa proteína no cloroplasto pode disparar a morte celular em *Arabidopsis*.

Duas proteínas associadas com estresse oxidativo também foram moduladas nas duas linhagens de tomateiro infectadas com ToCMoV, uma ferredoxin-NADP⁺ reductase e uma nucleoredoxina-1 moduladas positivamente e negativamente, respectivamente. A ferredoxin-

NADP⁺ reductase possui um papel importante na defesa da planta contra estresses oxidativos (Krapp *et al.*, 1997), enquanto que a nucleoredoxina é caracterizada como uma tioredoxina envolvida no crescimento e diferenciação celular (Funato e Miki, 2007) e tem expressão aumentada associada a estresse oxidativo (Tomanek *et al.*, 2011; Xue *et al.*, 2013). Porém, a nucleoredoxina foi diminuída tanto na linhagem de tomateiro resistente quanto na suscetível infectadas com ToCMoV. Possivelmente, essa proteína não seja essencial para combater a infecção causada por ToCMoV, mas que o estresse oxidativo causado por esse begomovírus pode ter ativado outras rotas metabólicas que envolvam esse tipo de estresse, como a ferredoxin-NADP⁺ reductase, por exemplo.

Uma pequena proteína do cloroplasto, a CP12, foi identificada neste trabalho. Essa proteína está envolvida na montagem e regulação de complexos supramoleculares, como o complexo PRK/CP12/GAPDH. Entretanto, na forma reduzida, a CP12 é incapaz de reconstituir esse complexo (Graciet *et al.*, 2003). Além disso, já foi relatado que uma tioredoxina ativa a PRK e a GAPDH através da ruptura desse complexo em resposta a mudanças de intensidade da luz (Howard *et al.*, 2008). Foi mostrado no presente trabalho que a expressão de CP12 foi diminuída nas linhagens de tomateiro infectadas por ToCMoV.

Uma proteína relacionada ao citoesqueleto, a β -tubulina, também foi afetada negativamente nas linhagens de tomateiros avaliadas neste trabalho. Consistente com o nosso resultado, Ndimba *et al.* (2005) mostraram que culturas celulares em suspensão de *Arabidopsis thaliana* submetidas à estresse salino e osmótico mostraram redução significativa da proteína β -tubulina.

Diferentes proteínas foram afetadas de forma parecida nas duas linhagens infectadas com ToCMoV quando comparadas aos seus respectivos controles. No geral, é possível que as proteínas atuando da mesma maneira nas duas linhagens de tomateiro sejam consequência

apenas da infecção causada por ToCMoV, não sendo associadas diretamente com as características estudadas (resistência/suscetibilidade). Isso pode indicar que plantas resistente e suscetível apresentam um sistema de defesa basal comum contra o begomovírus ToCMoV.

4. CONCLUSÃO FINAL

Neste trabalho foi utilizada uma técnica relativamente recente, a 2D-nanoUPLC/HDMS^E, para identificar e quantificar as proteínas envolvidas no processo de infecção do begomovírus ToCMoV. Foram identificadas centenas de proteínas envolvidas em diferentes processos biológicos como a fotossíntese, metabolismo energético, ubiquitinação, estresse oxidativo, dobramento proteico, enovelamento de DNA e reposta de defesa. As análises comparativas possibilitaram um maior entendimento sobre possíveis mecanismos envolvidos na defesa/resistência e suscetibilidade a esse begomovírus. Esse trabalho mostrou pela primeira vez os perfis proteicos globais de tomateiros resistente (LAM 157) e suscetível (Santa Clara) infectados com o begomovírus ToCMoV. Durante a análise das plantas resistentes, foi possível identificar uma gama de proteínas que podem estar sendo moduladas pelo *locus tcm-1* para garantir o desenvolvimento da planta hospedeira. Entre essas proteínas, destaca-se a histona H4 que representou 35% das proteínas aumentadas nas plantas resistentes infectadas e que possivelmente represente um novo mecanismo de defesa. As proteínas identificadas na linhagem de tomateiro resistente LAM 157 poderão esclarecer como diferentes vias metabólicas podem ser utilizadas para combater o patógeno. Ao mesmo tempo, a análise da planta suscetível, Santa Clara, revelou uma variedade de proteínas que podem estar associadas à infectividade de ToCMoV, revelando diferentes vias metabólicas que favorecem o avanço viral,

com destaque para a ubiquitina e a proteína ribossomal que foi somente encontrada na planta infectada suscetível. Entretanto, muitas proteínas mostram comportamentos similares nas duas linhagens de tomateiro analisadas. Possivelmente, essas vias metabólicas são moduladas devido ao processo de infecção, não estando associado às características estudadas. Portanto, este trabalho poderá esclarecer como a interação tomate-ToCMoV pode modular processos biológicos para garantir o estabelecimento da infecção viral ou mesmo combater o avanço do patógeno.

Tabela 2.1. Proteínas identificadas em tomateiro resistente infectado com ToCMoV por 2D-NanoUPLC/HDMS^E.

Accesso ^a	OK	Proteína Identificada	PLGS Score	Exclusiva	157Ib:157NI ^b Razão	157I:157NI Log(e) Razão	157I:157NI Log(e) Variância	157I:157 P< 0.05	Expressão	Gene Ontology ^c
Solyc07g066610 2.1	2	Fosfoglicerato quinase	11.615.89	-	1.13	0.12	0.07	1	Aumentada	Ligação de ATP
Solyc07g066600 2.1	2	Fosfoglicerato quinase	5.994.80	-	1.22	0.2	0.16	1	Aumentada	Ligação de ATP
Solyc09g011040 .1.1	2	Proteinase aspártica (nepenthesin-I)	4.161.82	-	1.06	0.06	0.05	1	Aumentada	Atividade de peptidase
Solyc11g022550 .1.1	2	Proteína desconhecida	2.122.46	-	1.28	0.25	0.2	1	Aumentada	-
Solyc03g034180 .2.1	2	Proteína 14-3-3	19.042.99	-	1.09	0.09	0.07	1	Aumentada	Ligação à fosfoserina

Solyc03g120620 .2.1	2	<i>Homeobox leucine zipper protein</i>	1.395.08	-	1.25	0.22	0.18	1	Aumentada	Ligação ao DNA
Solyc02g079950 .2.1	2	PsbQ	1.719.69	-	1.63	0.49	0.15	1	Aumentada	Externo à membrana
Solyc04g011390 .1.1	2	Histona H4	7.806.78	-	1.14	0.13	0.11	0.99	Aumentada	Ligação ao DNA
GI 218317*	2	Ribulose 1.5- bisfosfato carboxilase oxigenase (subunidade menor)	20.377.11	-	1.08	0.08	0.06	0.99	Aumentada	Proteína de ligação/Ligação ao íon cobre
Solyc06g005430 .1.1	2	HistonaH4	7.806.78	-	1.13	0.12	0.09	0.99	Aumentada	Ligação ao DNA
Solyc01g007510 .1.1	2	PsbN (fotossistema II)	295.64	-	1.26	0.23	0.18	0.99	Aumentada	Membrana
Solyc06g072240 .1.1	2	Histona H4	7.806.78	-	1.14	0.13	0.11	0.99	Aumentada	Ligação ao DNA

Solyc08g065220 .2.1	2	Glicina dehydrogenase. proteína P	1.392.04	-	1.15	0.14	0.12	0.99	Aumentada	Descarboxilante
Solyc11g072860 .1.1	2	Histona H4	7.806.78	-	1.12	0.11	0.11	0.99	Aumentada	Ligação ao DNA
Solyc06g075960 .1.1	2	Histona H4	7.806.78	-	1.14	0.13	0.1	0.98	Aumentada	Ligação ao DNA
Solyc06g075930 .1.1	2	Histona H4	7.806.78	-	1.13	0.12	0.1	0.98	Aumentada	Ligação ao DNA
Solyc12g044230 .1.1	2	Proteína Os01g0786800 (fragmento)	1.349.94	-	1.25	0.22	0.23	0.98	Aumentada	Integrada à membrana
Solyc05g054610 .1.1	2	Histona H4	7.806.78	-	1.14	0.13	0.1	0.98	Aumentada	Ligação ao DNA
Solyc11g072840 .1.1	2	Histona H4	7.476.95	-	1.13	0.12	0.1	0.98	Aumentada	Ligação ao DNA

Solyc01g007270 .1.1	2	Citocinina riboside 5- monofosfate fosfosribohidrol ase LOG	11.805.87	-	1.03	0.03	0.02	0.98	Aumentada	-
Solyc01g007930 .2.1	2	Proteína contendo domínio Sel1	935.52	-	1.15	0.14	0.12	0.97	Aumentada	Ligação
Solyc06g075830 .1.1	2	Histona H4	7.806.78	-	1.14	0.13	0.12	0.97	Aumentada	Ligação ao DNA
Solyc02g063140 .2.1	2	Elongase de ácidos graxos	16.697.45	-	1.07	0.07	0.07	0.97	Aumentada	Atividade de eleongase de ácidos graxos
Solyc06g066630 .1.1	2	O- aciltransferase (MBOAT)	1.347.69	-	1.27	0.24	0.24	0.97	Aumentada	Proteína de ligação/ Atividade de transferase
Solyc02g077830 .1.1	2	Proteína desconhecida	561.69	-	1.21	0.19	0.17	0.97	Aumentada	-
Solyc06g075850 .1.1	2	Histona H4	7.806.78	-	1.13	0.12	0.11	0.96	Aumentada	Ligação ao DNA

Solyc04g082460 .2.1	2	Catalase	3.637.91	-	1.20	0.18	0.17	0.96	Aumentada	-
Solyc06g072540 .1.1	2	ATP sintase. subunidade α (cloroplasto)	5.066.97	-	1.09	0.09	0.11	0.96	Aumentada	-
Solyc07g041720 .1.1	2	Oxalato oxidase	10.648.01	-	1.17	0.16	0.16	0.96	Aumentada	Atividade de oxalato oxidase
Solyc02g062130 .2.1	2	Ferredoxina- NADP redutase	4.546.31	-	1.16	0.15	0.16	0.95	Aumentada	NADPH desidrogenase Atividade NADPH desidrogenase / <i>p</i> <i>oly (U) RNA</i> <i>binding</i>
Solyc11g066160 .1.1	2	Histona H4	6.084.02	-	1.12	0.11	0.11	0.95	Aumentada	Ligação ao DNA
Solyc06g005420 .1.1	2	Histona H4	7.806.78	-	1.13	0.12	0.13	0.95	Aumentada	Ligação ao DNA
Solyc02g069410 .2.1	2	HAD (Haloácido dehalogenase) hidrolase	903.32	-	1.08	0.08	0.09	0.95	Aumentada	Proteína de ligação/atividad e de hidrolase

Solyc03g123410 .1.1	2	Oxalato oxidase (germin 171)	1.013.42	-	1.23	0.21	0.26	0.95	Aumentada	Atividade de oxalato oxidase
Solyc03g098770 .1.1	2	Proteína desconhecida	4.238.77	-	0.86	-0.15	0.17	0.04	Diminuída	-
Solyc11g042570 .1.1	2	Proteína desconhecida	529.33	-	0.73	-0.31	0.36	0.04	Diminuída	-
Solyc12g089310 .1.1	2	Cadeiaβtubulina	3.125.40	-	0.84	-0.17	0.19	0.03	Diminuída	Constituinte estrutural do citoesqueleto
Solyc04g007790 .2.1	2	Proteína principal do látex (<i>major latex like protein-MLP</i>)	4.659.47	-	0.79	-0.24	0.22	0.03	Diminuída	Resposta a estresse biótico
Solyc06g076640 .2.1	2	Cadeia β tubulina	2.713.17	-	0.80	-0.22	0.19	0.03	Diminuída	Constituinte estrutural do citoesqueleto
Solyc12g096210 .1.1	2	Proteína desconhecida	610.00	-	0.59	-0.53	0.55	0.03	Diminuída	-

Solyc00g186050 .1.1	2	Proteína desconhecida	2.139.14	-	0.76	-0.28	0.24	0.03	Diminuída	-
Solyc05g005470 .2.1	2	Nucleoredoxina 1	1.378.12	-	0.86	-0.15	0.16	0.02	Diminuída	Atividade de tioredoxina- dissulfeto redutase
Solyc11g069790 .1.1	2	Chaperonina(Cp n60)	3.398.96	-	0.86	-0.15	0.15	0.02	Diminuída	Metabolismo de proteínas/citopla sma
Solyc01g098620 .2.1	2	Proteína desconhecida	454.56	-	0.79	-0.24	0.18	0.02	Diminuída	-
Solyc12g010010 .1.1	2	Nucleotídeo cíclico de canal fechado	2.423.83	-	0.80	-0.22	0.22	0.02	Diminuída	Membrana
Solyc03g111610 .2.1	2	HAD (Haloácido dehalogenase) hidrolase	2.134.54	-	0.78	-0.25	0.27	0.02	Diminuída	Proteína de ligação/atividad e de hidrolase
Solyc10g080940 .1.1	2	Cadeia β tubulina	3.603.25	-	0.80	-0.22	0.17	0.02	Diminuída	Integradaà membrana/Com plexo proteico /microtúbulo

Solyc12g062520 .1.1	2	Subunidade adaptadora AP2 (complexo)	2.276.01	-	0.90	-0.1	0.11	0.02	Diminuída	Complexo adaptador/revestimento da clatrina
Solyc01g028810 .2.1	2	Chaperonina (Cpn60)	3.974.59	-	0.84	-0.17	0.14	0.02	Diminuída	Metabolismo de proteínas/citoplasma
Solyc06g005910 .2.1	2	Cadeia β tubulina	2.820.30	-	0.78	-0.25	0.22	0.01	Diminuída	Constituinte estrutural do citoesqueleto
Solyc02g086810 .1.1	2	Proteína desconhecida	4.627.93	-	0.92	-0.08	0.06	0.01	Diminuída	-
Solyc09g009390 .2.1	2	Monodehidroascorbato redutase (NADH)	866.31	-	0.73	-0.31	0.22	0.01	Diminuída	Atividade de monodehidroascorbato redutase (NADH)
Solyc03g118760 .2.1	2	Cadeia β tubulina	2.420.84	-	0.76	-0.27	0.22	0.01	Diminuída	Constituinte estrutural do citoesqueleto
Solyc01g079470 .2.1	2	CP12 (cloroplasto)	2.384.82	-	0.83	-0.19	0.16	0.01	Diminuída	Proteína de ligação

Solyc07g055040 .1.1	2	Proteína contendo domínio Agenet	317.91	-	0.76	-0.28	0.27	0.01	Diminuída	Ligação ao RNA
Solyc06g035970 .2.1	2	Cadeia β tubulina	3.406.20	-	0.78	-0.25	0.2	0.01	Diminuída	Constituinte estrutural do citoesqueleto
Solyc04g071260 .2.1	2	Actina	2.075.63	-	0.74	-0.3	0.21	0.01	Diminuída	Constituinte estrutural do citoesqueleto
Solyc08g075070 .2.1	2	Profilina	450.40	-	0.61	-0.49	0.42	0.01	Diminuída	Citoesqueleto de actina
Solyc04g082230 .1.1	2	Proteína SAUR	846.41	-	0.61	-0.49	0.26	0	Diminuída	-
Solyc10g009570 .2.1	2	Rodanase	1.183.72	-	0.55	-0.6	0.31	0	Diminuída	Ligação à proteína
Solyc01g095430 .2.1	2	Treonina endopeptidase	14.753.03	-	0.62	-0.48	0.23	0	Diminuída	-

Solyc06g009630 .1.1	2	CP12	40.053.24	-	0.82	-0.2	0.11	0	Diminuída	Ligação à proteína
Solyc11g065990 .1.1	2	Actina	3.923.46	-	0.84	-0.17	0.13	0	Diminuída	Constituinte estrutural do citoesqueleto
Solyc12g056820 11	2	Lacase	631.56	-	0.57	-0.57	0.41	0	Diminuída	Atividade de ferroxidase
Solyc06g076090 .2.1	2	Actina	3.923.46	-	0.85	-0.16	0.12	0	Diminuída	Constituinte estrutural do citoesqueleto
Solyc12g036170 .1.1	2	Proteína desconhecida	695.62	157NI	-	-	-	-	Exclusiva 157NI	-
Solyc08g008590 .2.1	2	Ubiquitina	242.72	157NI	-	-	-	-	Exclusiva 157NI	Proteína de ligação dependente de ATP

* Número de acesso referente a sequência nucleotídica proteína homóloga (NCBI database) à proteína desconhecida identificada.

a) Número de acesso oficial do genoma do tomate construído pelo International Tomato Annotation Group (ITAG).

b) I - inocunada com ToCMoV; NI: não inocunada

c) Termo ontológico associado a cada mRNA.

Tabela 2.2. Proteínas identificadas em tomateiro suscetível infectado com ToCMoV por 2D-NanoUPLC/HDMS^E.

Acceso ^a	OK	Proteína Identificada	PLGS Score	Exclusiva	SCI ^b :SCNI ^b Razão	SCI:SCNI Log(e)Razão	SCI:SCNI Log(e)Variância	SCI:SCNI P < 0.05	Expressão	Gene Ontology ^c
Solyc03g098770 .1.1	2	Proteína desconhecida	4.238.77	-	1.49	0.4	0.18	1	Aumentada	-
Solyc12g038080 .1.1	2	CP43 (fotossistema II)	1.235.78	-	1.65	0.5	0.4	1	Aumentada	Externa à membrana
Solyc02g079950 .2.1	2	PsbQ	1.719.69	-	1.60	0.47	0.14	1	Aumentada	Externa à membrana
Solyc00g186050 .1.1	2	Proteína desconhecida	2.139.14	-	1.86	0.62	0.43	1	Aumentada	-
Solyc02g062130 .2.1	2	Ferredoxina-NADP redutase	4.546.31	-	1.27	0.24	0.17	0.99	Aumentada	Atividade NADPH desidrogenase /poly (U) RNA binding

Solyc12g010010 .1.1	2	Nucleotídeo cíclico de canal fechado	2.423.83	-	1.40	0.34	0.29	0.99	Aumentada	membrana
Solyc07g041720 .1.1	2	Oxalato oxidase (germin 171)	10.648.01	-	1.17	0.16	0.15	0.99	Aumentada	Atividade de oxalato oxidase
Solyc01g007930 .2.1	2	Proteína contendo domínio Sel1	935.52	-	1.17	0.16	0.17	0.97	Aumentada	Ligação
Solyc01g101060 .2.1	2	S- adenosilmetioni na sintase	1.341.29	-	1.27	0.24	0.24	0.97	Aumentada	Metabolismo de carbono (C ₁)
Solyc02g091560 .2.1	2	Serina hidroximetiltran sferase	5.533.11	-	1.12	0.11	0.11	0.97	Aumentada	Atividade glicina hidroximetiltran sferase
Solyc01g080270 .2.1	2	Alfa/beta hidrolase	1.600.12	-	1.14	0.13	0.12	0.97	Aumentada	-
Solyc12g094620 .1.1	2	Catalase	4.811.83	-	1.13	0.12	0.14	0.96	Aumentada	Processo de oxirredução

Solyc12g099000 .1.1	2	S- adenosilmetioni na sintase	1.769.30	-	1.23	0.21	0.22	0.96	Aumentada	Metabolismo de carbono (C ₁)
Solyc05g050970 .2.1	2	Transketolase 1	1.716.89	-	1.11	0.1	0.1	0.96	Aumentada	Atividade de transketolase/lig ação à proteína
Solyc06g009950 .1.1	2	psaB (fotossistema I)	5.635.63	-	1.07	0.07	0.08	0.96	Aumentada	Integrada à membrana
Solyc09g008280 .1.1	2	S- adenosilmetioni na sintase	2.276.53	-	1.22	0.2	0.19	0.96	Aumentada	Metabolismo de carbono (C ₁)
Solyc08g008590 .2.1	2	Ubiquitina	242.72	-	1.34	0.29	0.32	0.95	Aumentada	Proteína de ligação dependente de ATP
Solyc10g044510 .1.1	2	proteína MLO 4	5.192.37	-	1.13	0.12	0.14	0.95	Aumentada	integral to membrane
Solyc12g098490 .1.1	2	Serina hidroximetiltran sferase	560.05	-	1.25	0.22	0.27	0.95	Aumentada	Atividade glicina hidroximetiltran sferase

Solyc07g005820 .2.1	2	Proteína de choque térmico 70 (HSP70)	18.045.47	-	1.14	0.13	0.17	0.95	Aumentada	Ligação de ATP/ligação à proteínas desdobradas
Solyc01g007270 .1.1	2	Citocinina riboside 5- monofosfate fosfosribohidrol ase LOG	11.805.87	-	1.03	0.03	0.03	0.95	Aumentada	-
Solyc09g064480 .1.1	2	Galactosiltransfe rase (fragmento)	130.55	-	0.69	-0.37	0.4	0.05	Diminuída	Membrana
Solyc11g011950 .1.1	2	Proteína desconhecida	328.06	-	0.83	-0.19	0.22	0.05	Diminuída	-
Solyc01g007520 .2.1	2	PsbH (fotossistema II)	6.007.21	-	0.79	-0.24	0.25	0.05	Diminuída	Membrana
Solyc01g028810 .2.1	2	Chaperonina(Cp n60)	3.974.59	-	0.81	-0.21	0.21	0.05	Diminuída	Metabolismo de proteínas/ctoplas ma
Solyc06g076640 .2.1	2	Cadeiaβtubulina	2.713.17	-	0.82	-0.2	0.22	0.04	Diminuída	Constituinte estrutural do citoesqueleto

Solyc10g078600 .1.1	2	Proteína ligante de mirosinase (fragmento)	529.33	-	0.76	-0.27	0.3	0.04	Diminuída	Proteína de ligação
Solyc02g080520 .2.1	2	Proteína Os04g0625000 (fragmento)	1.593.25	-	0.89	-0.12	0.13	0.03	Diminuída	-
Solyc03g034180 .2.1	2	Proteína 14-3-3	19.042.99	-	0.93	-0.07	0.07	0.03	Diminuída	Ligação à fosfoserinea
GI 218317*	2	Ribulose 1.5- bisfosfato carboxilase oxigenase (subunidade menor)	20.377.11	-	0.92	-0.08	0.06	0.02	Diminuída	Protéina de ligação/ligação o íon cobre
Solyc07g063580 .2.1	2	Proteína desconhecida	248.41	-	0.67	-0.4	0.32	0.02	Diminuída	-
Solyc03g111610 .2.1	2	HAD (Haloácido dehalogenase) hidrolase	2.134.54	-	0.76	-0.28	0.29	0.02	Diminuída	Proteína de ligação/Atividad e de hidrolase
Solyc02g063140 .2.1	2	Elongase de ácidos graxos	16.697.45	-	0.92	-0.08	0.06	0.01	Diminuída	Atividade de elongase de ácidos graxos

Solyc05g005470 .2.1	2	Nucleoredoxina 1	1.378.12	-	0.76	-0.28	0.18	0	Diminuída	Atividade de tioredoxina- dissulfeto redutase
Solyc02g086810 .1.1	2	Proteína desconhecida	4.627.93	-	0.85	-0.16	0.09	0	Diminuída	-
Solyc06g009630 .1.1	2	CP12	40.053.24	-	0.70	-0.35	0.15	0	Diminuída	Proteína de ligação
Solyc11g022550 .1.1	2	Proteína desconhecida	2.122.46	-	0.43	-0.85	0.21	0	Diminuída	-
Solyc09g015300 .1.1	2	psaA (fotossistema I)	419.71	-	0.44	-0.81	0.35	0	Diminuída	Integrada à membrana
Solyc10g017890 .1.1	2	psaA (fotossistema I)	346.34	-	0.44	-0.83	0.36	0	Diminuída	Integrada à membrana
Solyc06g008260 .2.1	2	Proteína ribossomal L14 (60S)	392.26	SCI	-	-	-	-	Exclusiva SCI	Constituinte estrutural do ribossomo/ ligação ao RNA

* Número de acesso referente a sequência nucleotídica da proteína homóloga (NCBI database) à proteína desconhecida identificad

a.) Número de acesso oficial do genoma do tomate construído pelo International Tomato Annotation Group (ITAG).

b) I - inocunada com ToCMoV; NI: não inoculada

c) Termo ontológico associado a cada mRNA.

Tabela 2.3. Proteínas comuns identificadas em tomateiro resistente e suscetível infectado com ToCMoV por 2D-NanoUPLC/HDMS^E.

Accesso ^a	OK	Proteína Identificada	PLGS Score	157I ^b :157NI ^b / SCI:SCNI Razão	157I:157NI/ SCI:SCNI Log(e) Razão	157I:157NI/ SCI:SCNI Log(e)Variância	157I:157NI/ SCI:SCNI P<0.05	Expressão	Gene Ontology ^c
Solyc01g007930.2.1	2	Proteína contendo domínio Sel1	935.52	1.15/1.17	0.14/0.16	0.12/0.17	0.97	Aumentada	Ligação
Solyc02g079950.2.1	2	PsbQ	1.719.69	1.63/1.60	0.49/0.47	0.15/0.14	1	Aumentada	extrinsic to membrane
Solyc02g062130.2.1	2	Ferredoxina-NADP redutase	4.546.31	1.16/1.27	0.15/0.24	0.16/0.17	0.95/0.99	Aumentada	Atividade NADPH desidrogenase /poly (U) RNA binding
Solyc07g041720.1.1	2	Oxalato oxidase (germin 171)	10.648.01	1.17	0.16	0.16/0.15	0.96/0.99	Aumentada	Atividade de oxalato oxidase
Solyc01g007270.1.1	2	Citocinina riboside 5-monofosfate fosforibidrolase LOG	11.805.87	1.03	0.03	0.02/0.03	0.98/0.95	Aumentada	-
Solyc05g005470.2.1	2	Nucleoredoxina 1	1.378.12	0.86/0.76	-0.15/-0.28	0.16/0.18	0.02/0	Diminuída	Atividade de tioredoxina-dissulfeto redutase
Solyc03g111610.2.1	2	HAD (Haloácido dehalogenase)hidrolase	2.134.54	0.78/0.76	-0.25/-0.28	0.27/0.29	0.02	Diminuída	Proteína de ligação/Atividade de hidrolase
Solyc06g076640.2.1	2	Cadeia β tubulina	2.713.17	0.80/0.82	-0.22/-0.2	0.19/0.22	0.03/0.04	Diminuída	Constituinte estrutural do citoesqueleto
Solyc01g028810.2.1	2	Chaperonina (Cpn60)	3.974.59	0.84/0.81	-0.17/-0.21	0.14/0.21	0.02/0.05	Diminuída	Metabolismo de proteínas/ctoplasma
Solyc02g086810.1.1	2	Unknown Protein	4.627.93	0.92/0.85	-0.08/-0.16	0.06/0.09	0.01/0	Diminuída	-
Solyc06g009630.1.1	2	CP12	40.053.24	0.82/0.70	-0.2/-0.35	0.11/0.15	0	Diminuída	Proteína de ligação

a) Número de acesso oficial do genoma do tomate construído pelo International Tomato Annotation Group (ITAG).

b) I - inocunada com ToCMoV; NI: não inoculada

c) Termo ontológico associado a cada mRNA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso da infecção viral depende da maquinaria da planta hospedeira para a replicação e avanço viral. Apesar de estudos anteriores terem relatado a participação de proteínas do hospedeiro durante o processo de infecção, ainda existe pouca informação sobre o papel exato dessas proteínas. Neste trabalho, a interação da planta hospedeira com o begomovírus ToCMoV foi investigada na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos na resistência e virulência do patógeno.

Duas abordagens proteômicas foram utilizadas, sendo uma baseada em gel e outra independente de gel, visando a obtenção do perfil global de proteínas de plantas hospedeiras durante a infecção por ToCMoV. Ambas as técnicas foram eficientes e revelaram várias proteínas diferencialmente expressas. Foi interessante notar que o número de proteínas diferenciais identificadas pelas técnicas de 2D-nanoUPLC/MS^E e 2-DE foram muito semelhantes. Uma possível explicação para esse fato é que apenas as proteínas solúveis foram analisadas por 2D-nanoUPLC/MS^E. As diversas proteínas identificadas através das duas abordagens proteômicas forneceram indícios do funcionamento das vias metabólicas que são afetadas durante a infecção por ToCMoV.

Pela primeira vez, proteínas associadas à infectividade de ToCMoV foram identificadas. Foi possível observar que proteínas importantes envolvidas em diferentes processos biológicos sofreram interferência pela presença viral. O comprometimento do funcionamento da fotossíntese foi bastante evidenciado neste trabalho. O fator de patogenicidade AC2 do ToCMoV expressado por um vetor viral e a infecção causada por ToCMoV foram capazes de modular algumas vias comuns, como a ubiquitinação e tradução, possivelmente, recrutando proteínas que favoreçam o avanço viral.

Foi possível observar que as plantas hospedeiras também desencadearam resposta de defesa na tentativa de combater o vírus. Pela primeira vez, este trabalho mostrou o perfil proteico da planta resistente contendo o *locus* de resistência *tcm-1* durante a infecção causada por ToCMoV. Diversas proteínas foram moduladas nas plantas resistentes infectadas, com destaque para a histona H4, representando 35% das proteínas aumentadas. Os resultados obtidos forneceram indícios dos mecanismos de defesa/resistência associados ao *locus tcm-1*. No geral, este trabalho contribuiu para um melhor entendimento das vias metabólicas que são afetadas durante a infecção de ToCMoV, revelando proteínas que possam ser alvos de estudos futuros visando o desenvolvimento de linhagens resistentes e novas estratégias de controle da infecção viral.

PERSPECTIVAS

Visando complementar os resultados obtidos neste trabalho, pretende-se:

- Realizar ensaios para avaliação quantitativa da expressão gênica por qRT-PCR de proteínas selecionadas, potencialmente envolvidas na defesa/resistência do tomateiro a ToCMoV;
- Realizar ensaios para avaliação quantitativa da expressão gênica de SGT1, que foi modulada pelo fator de virulência AC2 do begomovírus ToCMoV, através de qRT-PCR.
- Validar *in vivo* o envolvimento de potenciais proteínas associadas a infectividade viral e a resistência ao ToCMoV através da ferramenta de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLAH, C. et al. Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. **Int J Plant Genomics**, v. 2012, p. 494572, 2012.
- ADI, M. et al. Stress Responses to Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) Infection of Resistant and Susceptible Tomato Plants are Different. **Metabolomics**. S1:006: 13 p. 2012.
- AHN, I. P.; KIM, S.; LEE, Y. H. Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. **Plant Physiol**. 138: 1505–1515 p. 2005.
- ALBUQUERQUE, L. C. et al. Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Archives of Virology**, v. 157, n. 4, p. 747-752, 2012.
- ALCAIDE-LORIDAN, C.; JUPIN, I. Ubiquitin and Plant Viruses, Let's Play Together! **Plant Physiology**, v. 160, n. 1, p. 72-82, 2012.
- ALFENAS-ZERBINI, P. et al. Genome-Wide Analysis of Differentially Expressed Genes During the Early Stages of Tomato Infection by a Potyvirus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 3, p. 352-361, 2009.
- ALLEN, K. N.; DUNAWAY-MARIANO, D. Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. **Trends Biochem Sci**, v. 29, n. 9, p. 495-503, 2004.
- AMBROZEVICIUS, L. P. et al. Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 372-377, 2002.
- AMIN, I. et al. A common set of developmental miRNAs are upregulated in *Nicotiana benthamiana* by diverse begomoviruses. **Virology Journal**, v. 8, 2011.
- ANBINDER, I. et al. Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 119, n. 3, p. 519-530, 2009.
- ANDLEEB, S. et al. Transient expression of β C1 protein differentially regulates host genes related to stress response, chloroplast and mitochondrial functions. **Virol J**, v. 7, p. 373, 2010.
- ANDRAWIS, A.; SOLOMON, M.; DELMER, D. P. Cotton fiber annexins: a potential role in the regulation of callose synthase. **Plant J**, v. 3, n. 6, p. 763-72, 1993.
- ATABEKOV, J. G. et al. Translational activation of encapsidated potato virus X RNA by coat protein phosphorylation. **Virology**, v. 286, n. 2, p. 466-74, 2001.

BABU, M. et al. Association of the transcriptional response of soybean plants with soybean mosaic virus systemic infection. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 4, p. 1069-1080, 2008.

BAGGERMAN, G. et al. Gel-based versus gel-free proteomics: a review. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 8, n. 8, p. 669-77, 2005.

BALIJI, S.; LACATUS, G.; SUNTER, G. The interaction between geminivirus pathogenicity proteins and adenosine kinase leads to increased expression of primary cytokinin-responsive genes. **Virology**, v. 402, n. 2, p. 238-47, 2010.

BANTSCHEFF, M. et al. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, v. 389, n. 4, p. 1017-31, 2007.

BARTHET, M. M.; HILU, K. W. Expression of matK: functional and evolutionary implications. **Am J Bot**, v. 94, n. 8, p. 1402-12, 2007.

BARVKAR, V. T. et al. Proteome profiling of flax (*Linum usitatissimum*) seed: characterization of functional metabolic pathways operating during seed development. **J Proteome Res**, v. 11, n. 12, p. 6264-76, 2012.

BEFFA, R. S. et al. Decreased Susceptibility to Viral Disease of [beta]-1,3-Glucanase-Deficient Plants Generated by Antisense Transformation. **Plant Cell**, v. 8, n. 6, p. 1001-1011, 1996.

BEZERRA J., R. Q. et al. Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa como ferramentas proteômicas aplicadas à definição de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 100-112, 2013.

BIAN, X. Y. et al. A Recessive Allele (tgr-1) Conditioning Tomato Resistance to Geminivirus Infection Is Associated with Impaired Viral Movement. **Phytopathology**, v. 97, n. 8, p. 930-7, 2007.

BILGIN, D. D. et al. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. **Plant Cell Environ**, v. 33, n. 10, p. 1597-613, 2010.

BLAWID, R. et al. Molecular and biological characterization of corchorus mottle virus, a new begomovirus from Brazil. **Arch Virol**, v. 158, n. 12, p. 2603-9, 2013.

BOGDANOV, B.; SMITH, R. D. Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up. **Mass Spectrom Rev**, v. 24, n. 2, p. 168-200, 2005.

BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M.; CORNELISSEN., B. J. C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**. 28: 113-138 p. 1990.

BRICKER, T. M.; FRANKEL, L. K. The structure and function of CP47 and CP43 in Photosystem II. **Photosynth Res**, v. 72, n. 2, p. 131-46, 2002.

BRIDDON, R. W. et al. Diversity of DNA beta, a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. **Virology** v. 312, n. 1, p. 106-121, 2003.

_____. Turnip curly top virus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. **Virus Res**, v. 152, n. 1-2, p. 169-75, 2010.

_____. Identification of DNA components required for induction of cotton leaf curl disease. **Virology**, v. 285, n. 2, p. 234-243, 2001.

BRINGANS, S. et al. Deep proteogenomics; high throughput gene validation by multidimensional liquid chromatography and mass spectrometry of proteins from the fungal wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 301, 2009.

BROCKSTEDT, E. et al. Preparative High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis Enables the Identification of RNA Polymerase B Transcription Factor 3 as an Apoptosis-Associated Protein in the Human BL60–2 Burkitt Lymphoma Cell Line. **J Protein Chem** v. 18, p. 225-31, 1999.

BROWN, J. K. et al. **Family Geminiviridae**. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J., et al (Ed.). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Elsevier Academic Press, p.351-373, 2012.

BUCHER, E. et al. The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. **J Gen Virol**, v. 85, n. 4, p. 983-91, 2004.

BURROUGHS, A. M. et al. Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. **J Mol Biol**, v. 361, n. 5, p. 1003-34, 2006.

BÜSCHGES, R. et al. The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. **Cell**, v. 88, n. 5, p. 695-705, 1997.

CALLA, B. et al. Genomic Evaluation of Oxalate-Degrading Transgenic Soybean in Response to *Sclerotinia Sclerotiorum* Infection. **Mol Plant Pathol**, 2014.

CARMO, L. S. et al. Identification of host proteins modulated by the virulence factor AC2 of Tomato chlorotic mottle virus in *Nicotiana benthamiana*. **Proteomics**, v. 13, n. 12-13, p. 1947-60, 2013.

CASADO-VELA, J.; SELLÉS, S.; MARTÍNEZ, R. B. Proteomic analysis of tobacco mosaic virus-infected tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) fruits and detection of viral coat protein. **Proteomics**, v. 6, p. S196-S206, 2006.

CASTILLO, A. G. et al. Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system. **J Virol**, v. 78, n. 6, p. 2758-69, 2004.

- CASTILLO-URQUIZA, G. P. et al. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. **Arch Virol**, v. 153, n. 10, p. 1985-9, 2008.
- CHAPMAN, S.; KAVANAGH, T.; BAULCOMBE, D. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. **Plant J**, v. 2, n. 4, p. 549-57, 1992.
- CHEN, X. et al. Molecular cloning and expression analysis of rice phosphoribulokinase gene that is regulated by environmental stresses. **Mol Biol Rep**, v. 31, n. 4, p. 249-55, 2004.
- CHEN, Z. et al. Expression analysis of the AtMLO gene family encoding plant-specific seven-transmembrane domain proteins. **Plant Mol Biol**, v. 60, n. 4, p. 583-97, 2006.
- CHENG, F. Y. et al. Absolute protein quantification by LC/MS(E) for global analysis of salicylic acid-induced plant protein secretion responses. **J Proteome Res**, v. 8, n. 1, p. 82-93, 2009.
- CHIVASA, S. et al. Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability. **Plant Cell**, v. 17, n. 11, p. 3019-34, 2005.
- _____. Proteomic analysis of extracellular ATP-regulated proteins identifies ATP synthase beta-subunit as a novel plant cell death regulator. **Mol Cell Proteomics**, v. 10, n. 3, p. M110.003905, 2011.
- CHOI, J. et al. The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in Arabidopsis. **Dev Cell**, v. 19, n. 2, p. 284-95, 2010.
- CONSORTIUM, T. T. G. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**. 485: 635–641 p. 2012.
- COX, J.; MANN, M. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. **Annu Rev Biochem**, v. 80, p. 273-99, 2011.
- DARWIN, S. C. **The systematics and genetics of tomatoes on the Galápagos Islands (Solanum, Solanaceae)** (Doctor of Philosophy). Department of Genetics, Evolution and Environment, University College London, 2009.
- DARWIN, S. C.; KNAPP, S.; PERALTA, I. E. **Tomatoes in the Galápagos Islands: morphology of native and introduced species of *Solanum* section *Lycopersicon* (Solanaceae)**. Systematics and Biodiversity, 2003.
- DAVID, P. et al. Three highly similar formate dehydrogenase genes located in the vicinity of the B4 resistance gene cluster are differentially expressed under biotic and abiotic stresses in *Phaseolus vulgaris*. **Theor Appl Genet**, v. 121, n. 1, p. 87-103, 2010.
- DELAHUNTY, C.; YATES, J. R. Protein identification using 2D-LC-MS/MS. **Methods**, v. 35, n. 3, p. 248-55, 2005.

DERMASTIA, M.; RAVNIKAR, M. Altered cytokinin pattern and enhanced tolerance to potato virus Y^{NTN} in the susceptible potato cultivar (*Solanum tuberosum* cv. Igor) grown in vitro. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 48, n. 1, 1996.

DEVOTO, A. et al. Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family. **J Mol Evol**, v. 56, n. 1, p. 77-88, 2003.

DI CARLI, M.; BENVENUTO, E.; DONINI, M. Recent insights into plant-virus interactions through proteomic analysis. **J Proteome Res**, v. 11, n. 10, p. 4765-80, 2012.

DONALDSON, P. A. et al. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, p. 297-307, 2001.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**. 19: 11-15 p. 1987.

DU, H.; KLESSIG, D. F. Identification of a Soluble, High-Affinity Salicylic Acid-Binding Protein in Tobacco. **Plant Physiol**, v. 113, n. 4, p. 1319-1327, 1997.

EINI, O. et al. Interaction with a host ubiquitin-conjugating enzyme is required for the pathogenicity of a geminiviral DNA beta satellite. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 22, n. 6, p. 737-46, 2009.

EL-BEBANY, A. F.; RAMPITSCH, C.; DAAYF, F. Proteomic analysis of the phytopathogenic soilborne fungus *Verticillium dahliae* reveals differential protein expression in isolates that differ in aggressiveness. **Proteomics**, v. 10, n. 2, p. 289-303, 2010.

ESCALER, M. et al. Pea embryonic tissues show common responses to the replication of a wide range of viruses. **Virology**, v. 267, n. 2, p. 318-25, 2000.

FANG, W. et al. A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence. **Fungal Genet Biol**, v. 47, n. 7, p. 602-7, 2010.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso: 14 de janeiro de 2014, 2012.

FARIA, J. C. et al. Situação atual das geminiviroses no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 125-137, 2000.

FARIA, J. C.; ZERBINI, F. M. Família *Geminiviridae* - Taxonomia, replicação e movimento. In: (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas** v.8, p.25-65, 2000.

FINNI, C. et al. Do 14-3-3 proteins and plasma membrane H⁺-ATPases interact in the barley epidermis in response to the barley powdery mildew fungus? **Plant Mol Biol**, v. 49, n. 2, p. 137-47, 2002.

FLOR, H. H. "Current status of the gene-for-gene concept". **Annu Rev Phytopathol.** 9: 275–296 p. 1971.

FONDONG, V. N. Geminivirus protein structure and function. **Mol Plant Pathol**, v. 14, n. 6, p. 635-49, 2013.

FONTENELLE, M. R. et al. Functional analysis of the naturally recombinant DNA-A of the bipartite begomovirus Tomato chlorotic mottle virus. **Virus Res**, v. 126, n. 1-2, p. 262-7, 2007.

FRANCO, O. L. et al. Methodological evaluation of 2-DE to study root proteomics during nematode infection in cotton and coffee plants. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 40, n. 2, p. 152-63, 2010.

FRANÇA, F. H.; VILLAS BOAS, G. L.; BRANCO, M. C. Occurrence of *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) in the Federal District. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 25: 369-372 p. 1996.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 40, p. 617-47, 2000.

FUNATO, Y.; MIKI, H. Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 8, p. 1035-57, 2007.

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

GAL-ON, A. et al. Particle bombardment drastically increases the infectivity of cloned DNA of zucchini yellow mosaic potyvirus. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 12, p. 3223-3227, 1995.

GALVÃO, R. M. et al. A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 3, p. 715-726, 2003.

GARAVAGLIA, B. S. et al. A plant natriuretic peptide-like molecule of the pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causes rapid changes in the proteome of its citrus host. **BMC Plant Biol**, v. 10, p. 51, 2010.

GARCIA-CANO, E. et al. Phenotypic expression, stability, and inheritance of a recessive resistance to monopartite begomoviruses associated with tomato yellow leaf curl disease in tomato. **Phytopathology**, v. 98, n. 5, p. 618-627, 2008.

GARZÓN-TIZNADO, J. A. et al. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. **Phytopathology**, v. 83, n. 5, p. 514-521, 1993.

GEORGE, B. et al. Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype **Food Chemistry**, v. 84, p. 45-51, 2004.

GEROMANOS, S. J. et al. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1683-95, 2009.

GEVAERT, K. et al. A la carte proteomics with an emphasis on gel-free techniques. **Proteomics**, v. 7, n. 16, p. 2698-718, 2007.

GILES, K. et al. A method for direct measurement of ion mobilities using a travelling wave ion guide. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 298, n. 1-3, p. 10-16, 2010.

GIORDANO, L. B. et al. Inheritance of resistance to the bipartite Tomato chlorotic mottle begomovirus derived from *Lycopersicon*. **Euphytica**, v. 143, p. 27-33, 2005.

GLASER, E. et al. Mitochondrial protein import in plants. Signals, sorting, targeting, processing and regulation. **Plant Mol Biol**, v. 38, n. 1-2, p. 311-38, 1998.

GLICKMAN, M. H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol Rev**, v. 82, n. 2, p. 373-428, 2002.

GOLBECK, J. H. Structure and Function of Photosystem I. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. 43: 293 -324 p. 1992.

GOODIN, M. M. et al. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 21, n. 8, p. 1015-26, 2008.

GOROVITS, R. et al. Recruitment of the host plant heat shock protein 70 by Tomato yellow leaf curl virus coat protein is required for virus infection. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e70280, 2013.

GRACIET, E. et al. The small protein CP12: a protein linker for supramolecular complex assembly. **Biochemistry**, v. 42, n. 27, p. 8163-70, 2003.

GUIMARÃES, P. M. et al. Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. **BMC Genomics**, v. 13, p. 387, 2012.

GÓNGORA-CASTILLO, E. et al. Transcriptome analysis of symptomatic and recovered leaves of geminivirus-infected pepper (*Capsicum annuum*). **Virology**, v. 9, p. 295, 2012.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 3665-85, 2004.

HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. **Plant Mol Biol**, v. 49, n. 3-4, p. 373-85, 2002.

- HANSON, P.; GREEN, S. K.; KUO, G. *Ty-2*, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. **Tomato Genetic Cooperative Report**. 56: 17-18 p. 2006.
- HANSON, P. M. et al. Mapping a wild tomato introgression associated with tomato yellow leaf curl virus resistance in a cultivated tomato line. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 125, n. 1, p. 15-20, 2000.
- HANSEN, I. M.; LAPIDOT, M.; THOMMA, B. P. Emerging viral diseases of tomato crops. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 23, n. 5, p. 539-48, 2010.
- HAO, J. et al. Reprogramming- and pluripotency-associated membrane proteins in mouse stem cells revealed by label-free quantitative proteomics. **J Proteomics**, v. 86, p. 70-84, 2013.
- HAO, L. et al. Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. **Plant Cell**, v. 15, n. 4, p. 1034-48, 2003.
- HARIHARAN, T.; JOHNSON, P. J.; CATTOLICO, R. A. Purification and characterization of phosphoribulokinase from the marine chromophytic alga *Heterosigma carterae*. **Plant Physiol**, v. 117, n. 1, p. 321-9, 1998.
- HARRISON B. D. Advances in Geminivirus Research. **Annu Rev Phytopathol**. 23: 55-82 p. 1985.
- HENDERSON, B.; FARES, M. A.; LUND, P. A. Chaperonin 60: a paradoxical, evolutionarily conserved protein family with multiple moonlighting functions. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v. 88, n. 4, p. 955-87, 2013.
- HENNIG, J.; HERRMANN, R. Chloroplast ATP synthase of spinach contains nine nonidentical subunit species, six of which are encoded by plastid chromosomes in two operons in a phylogenetically conserved arrangement. **Mol Gen Genet**, v. 203, p. 117-128, 1986.
- HERBERS, K. et al. Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. **Plant J** v. 12, p. 1045–1056, 1997.
- HERNÁNDEZ-ZEPEDA, C.; VARSANI, A.; BROWN, J. K. Intergeneric recombination between a new, spinach-infecting curtovirus and a new geminivirus belonging to the genus Becurtovirus: first New World exemplar. **Arch Virol**, v. 158, n. 11, p. 2245-54, 2013.
- HEYDARNEJAD, J. et al. Fulfilling Koch's postulates for beet curly top Iran virus and proposal for consideration of new genus in the family Geminiviridae. **Arch Virol**, v. 158, n. 2, p. 435-43, 2013.
- HOLLAND, N. et al. Stress-responsive accumulation of plastid chaperonin 60 during seedling development. **The Plant Journal**, v. 13, n. 3, p. 311-316, 1998.

HONG, Y.; SAUNDERS, K.; STANLEY, J. Transactivation of dianthin transgene expression by African cassava mosaic virus AC2. **Virology**, v. 228, n. 2, p. 383-7, 1997.

HORNS, T.; JESKE, H. Localization of abutilon mosaic virus (AbMV) DNA within leaf tissue by in situ hybridization. **Virology**, v. 181, n. 2, p. 580-8, 1991.

HOROWITZ, A. R. et al. Dynamics of insecticide resistance in *Bemisia tabaci*: a case study with the insect growth regulator pyriproxyfen. **Pest Manag Sci**, v. 58, n. 11, p. 1096-100, 2002.

HORWICH, A. L. et al. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 23, p. 115-45, 2007.

HOWARD, A. R. et al. Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves. **Virology**, v. 328, n. 2, p. 185-97, 2004.

HOWARD, T. P. et al. Thioredoxin-mediated reversible dissociation of a stromal multiprotein complex in response to changes in light availability. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 10, p. 4056-61, 2008.

HU, X. et al. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. **Plant Physiol**, v. 133, n. 1, p. 170-81, 2003.

HUH, S. U.; KIM, K. J.; PAEK, K. H. Capsicum annum basic transcription factor 3 (CaBtf3) regulates transcription of pathogenesis-related genes during hypersensitive response upon Tobacco mosaic virus infection. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 417, n. 2, p. 910-7, 2012.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. p.1-88, 2012.

ISHIKAWA, A. et al. Deletion of a chaperonin 60 beta gene leads to cell death in the Arabidopsis lesion initiation 1 mutant. **Plant Cell Physiol**, v. 44, n. 3, p. 255-61, 2003.

JESKE, H. Geminiviruses. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 331, p. 185-226, 2009.

JI, Y.; SCHUSTER, D. J.; SCOTT, J. W. Ty-3, a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato. **Mol Breeding**, 20, p.271–284, 2007.

JI, Y.; SCOTT, J. W.; SCHUSTER, D. J. Molecular Mapping of Ty-4, a New Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Locus on Chromosome 3of Tomato. **J. AMER. SOC. HORT. SCI**, 134, p.281–288, 2009.

KARPOVA, O. V. et al. [Translational regulation of potato virus X RNA-coat protein complexes: the key role of a coat protein N-terminal peptide]. **Mol Biol (Mosk)**, v. 40, n. 4, p. 703-10, 2006.

KIM, M. C. et al. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. **Nature**, v. 416, n. 6879, p. 447-51, 2002.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, n. 3, p. 231-43, 1975.

KOENIG, R. Anomalous behavior of the coat proteins of potato virus X and cactus virus X during electrophoresis in dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels. **Virology**, v. 50, n. 1, p. 263-6, 1972.

KOMATSU, K. et al. Viral induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. **Mol Plant Microbe Interact** v. 23, p. 283–293, 2010.

KOMATSU, S.; ZANG, X.; TANAKA, N. Comparison of two proteomics techniques used to identify proteins regulated by gibberellin in rice. **J Proteome Res**, v. 5, n. 2, p. 270-6, 2006.

KONOPKA-POSTUPOLSKA, D.; CLARK, G.; HOFMANN, A. Structure, function and membrane interactions of plant annexins: an update. **Plant Sci**, v. 181, n. 3, p. 230-41, 2011.

KOONIN, E. V.; TATUSOV, R. L. Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. **J Mol Biol**, v. 244, n. 1, p. 125-32, 1994.

KRAPP, A. R. et al. The role of ferredoxin-NADP⁺ reductase in the concerted cell defense against oxidative damage - studies using *Escherichia coli* mutants and cloned plant genes. **Eur J Biochem**, v. 249, n. 2, p. 556-63, 1997.

KRENZ, B. et al. A plastid-targeted heat shock cognate 70kDa protein interacts with the Abutilon mosaic virus movement protein. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 6-17, 2010.

KRISHNAMURTHY, K. et al. Cell-to-cell movement of the PVX 12K, 8K, or coat proteins may depend on the host, leaf developmental stage, and the PVX 25K protein. **Virology**, v. 300, n. 2, p. 269-81, 2002.

KRISTENSEN, B. K. et al. Identification of oxidised proteins in the matrix of rice leaf mitochondria by immunoprecipitation and two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 65, n. 12, p. 1839-51, 2004.

KUNDU, S.; CHAKRABORTY, D.; PAL, A. Proteomic analysis of salicylic acid induced resistance to Mungbean Yellow Mosaic India Virus in *Vigna mungo*. **J Proteomics**, v. 74, n. 3, p. 337-49, 2011.

KUROHA, T. et al. Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 21, n. 10, p. 3152-69, 2009.

KUSANO, T. et al. Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death. **Plant Cell Rep**, v. 28, n. 9, p. 1301-8, 2009.

LACORTE, C. et al. Potatovirus X and Tobacco mosaic virus-based vectors compatible with the Gateway cloning system. **J Virol Methods**, v. 164, n. 1-2, p. 7-13, 2010.

LARRAINZAR, E. et al. Medicago truncatula root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. **Plant Physiol**, v. 144, n. 3, p. 1495-507, 2007.

LAUFS, J. et al. In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 9, p. 3879-83, 1995.

LAZAROWITZ, S. G. Geminiviruses: genomes structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 11, p.327-349, 1992.

LEE, A. S. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. **Trends Biochem Sci**, v. 26, n. 8, p. 504-10, 2001.

LEFEUVRE, P. et al. The spread of tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 10, p. e1001164, 2010.

LEH, V.; YOT, P.; KELLER, M. The cauliflower mosaic virus translational transactivator interacts with the 60S ribosomal subunit protein L18 of Arabidopsis thaliana. **Virology**, v. 266, n. 1, p. 1-7, 2000.

LEHTO, K. et al. Depletion of the photosystem II core complex in mature tobacco leaves infected by the flavum strain of tobacco mosaic virus. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 16, n. 12, p. 1135-44, 2003.

LEVIN, Y.; HRADETZKY, E.; BAHN, S. Quantification of proteins using data-independent analysis (MSE) in simple and complex samples: A systematic evaluation. **Proteomics**, v. 11, p. 3273-3287, 2011.

LEVINE, A. J.; HU, W.; FENG, Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? **Cell Death Differ**, v. 13, n. 6, p. 1027-36, 2006.

LI, G. Z. et al. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1696-719, 2009.

LINK, A. J. et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nat Biotechnol**, v. 17, n. 7, p. 676-82, 1999.

LOZANO-DURAN, R.; BEJARANO, E. R. Geminivirus C2 protein might be the key player for geminiviral co-option of SCF-mediated ubiquitination. **Plant Signal Behav**, v. 6, n. 7, p. 999-1001, 2011.

LOZANO-DURÁN, R. et al. Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v. 23, n. 3, p. 1014-32, 2011.

_____. Identification of host genes involved in geminivirus infection using a reverse genetics approach. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22383, 2011.

LU, D. P.; CHRISTOPHER, D. A. Endoplasmic reticulum stress activates the expression of a sub-group of protein disulfide isomerase genes and AtbZIP60 modulates the response in *Arabidopsis thaliana*. **Mol Genet Genomics**, v. 280, n. 3, p. 199-210, 2008.

LUNA, A. P. et al. Functional analysis of gene-silencing suppressors from tomato yellow leaf curl disease viruses. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 25, n. 10, p. 1294-306, 2012.

LÓPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 849, n. 1-2, p. 190-202, 2007.

MAKISHIMA, N. **O tomateiro – 50 anos da Associação Brasileira de Horticultura. CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51**: Horticultura Brasileira, 29, 2011.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-65, 2002.

MBEUNKUI, F.; GOSHE, M. B. Investigation of solubilization and digestion methods for microsomal membrane proteome analysis using data-independent LC-MSE. **Proteomics**, v. 11, n. 5, p. 898-911, 2011.

MCKENZIE, C. L. et al. Effect of geminivirus infection and Bemisia infestation on accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato. **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 49, n. 4, p. 203-14, 2002.

MELDAU, S.; BALDWIN, I. T.; WU, J. For security and stability: SGT1 in plant defense and development. **Plant Signal Behav**, v. 6, n. 10, p. 1479-82, 2011.

MITTL, P. R.; SCHNEIDER-BRACHERT, W. Sell-like repeat proteins in signal transduction. **Cell Signal**, v. 19, n. 1, p. 20-31, 2007.

MONTEOLIVA, L.; ALBAR, J. P. Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. **Brief Funct Genomic Proteomic**, v. 3, n. 3, p. 220-39, 2004.

MORALES, F. J.; ANDERSON, P. K. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. **Arch Virol**, v. 146, n. 3, p. 415-41, 2001.

MOREL, J. et al. Proteomics of plant detergent-resistant membranes. **Mol Cell Proteomics**, v. 5, n. 8, p. 1396-411, 2006.

MOT, R. D.; VANDERLEYDEN, J. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 960-967, 1989.

MURAD, A. M. et al. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). **J. Sep. Sci.**, v. 34, n. 19, p. 2618-30, 2011.

NAIKA, S. et al. **A cultura do tomate - produção, processamento e comercialização**. Agrodok 17: Fundação Agromisa e CTA, 104, 2006.

NDIMBA, B. K. et al. Identification of Arabidopsis salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 5, n. 16, p. 4185-96, 2005.

NEWMAN, J. W.; MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B. D. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. **Prog Lipid Res**, v. 44, n. 1, p. 1-51, 2005.

NOËL, L. D. et al. Interaction between SGT1 and Cytosolic/Nuclear HSC70 Chaperones Regulates Arabidopsis Immune Responses. **The Plant Cell Online**, v. 19, n. 12, p. 4061-4076, 2007.

NÄGELE, E. et al. 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. **Expert Rev Proteomics**, v. 1, n. 1, p. 37-46, 2004.

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

OH, C. S.; MARTIN, G. B. Tomato 14-3-3 protein TFT7 interacts with a MAP kinase kinase to regulate immunity-associated programmed cell death mediated by diverse disease resistance proteins. **J Biol Chem**, v. 286, n. 16, p. 14129-36, 2011.

OVER, R. S.; MICHAELS, S. D. Open and Closed: The Roles of Linker Histones in Plants and Animals. **Mol Plant**, 7, p. 481-491, 2014.

OZAKCA, D. U. Effect of abiotic stress on photosystem I-related gene transcription in photosynthetic organisms. **Agricultural and Biological Sciences. "Photosynthesis"**, 2013.

PANCHAUD, A. et al. Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: status quo and outlook. **J Proteomics**, v. 71, n. 1, p. 19-33, 2008.

PARK, H. S. et al. A plant viral "reinitiation" factor interacts with the host translational machinery. **Cell**, v. 106, n. 6, p. 723-33, 2001.

PEDERSEN, T. J.; HANLEY-BOWDOIN, L. Molecular characterization of the AL3 protein encoded by a bipartite geminivirus. **Virology**, v. 202, n. 2, p. 1070-1075, 1994.

PEDRAZZINI, E. et al. Binding of BiP to an assembly-defective protein in plant cells. **The Plant Journal**, p.103-110, 1994.

PERALTA, I. E.; KNAPP, S.; SPOONER, D. M. New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. **Systematic Botany**, 30, p. 424–434 2005.

PIERCE, E. J.; REY, M. E. Assessing Global Transcriptome Changes in Response to South African Cassava Mosaic Virus [ZA-99] Infection in Susceptible *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e67534, 2013.

PILARTZ, M.; JESKE, H. Abutilon mosaic geminivirus double-stranded DNA is packed into minichromosomes. **Virology**, v. 189, n. 2, p. 800-2, 1992.

PÉREZ-BUENO, M. L. et al. Proteomic analysis of the oxygen-evolving complex of photosystem II under biotec stress: Studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. **Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 418–425, 2004.

QUIRINO, B. F.; BENT, A. F. Deciphering host resistance and pathogen virulence: the *Arabidopsis/Pseudomonas* interaction as a model. **Mol Plant Pathol**, v. 4, n. 6, p. 517-30, 2003.

RAJA, P. et al. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. **J Virol**, v. 82, n. 18, p. 8997-9007, 2008.

RAJAN, V. B.; D'SILVA, P. *Arabidopsis thaliana* J-class heat shock proteins: cellular stress sensors. **Funct Integr Genomics**, v. 9, n. 4, p. 433-46, 2009.

RAWAT, N. et al. Suppressive subtraction hybridization reveals that rice gall midge attack elicits plant-pathogen-like responses in rice. **Plant Physiol Biochem**, v. 63C, p. 122-130, 2012.

REVINGTON, G. N.; SUNTER, G.; BISARO, D. M. DNA sequences essential for replication of the B genome component of tomato golden mosaic virus. **Plant Cell**, v. 1, n. 10, p. 985-92, 1989.

RIBEIRO, S. **Diversity and Host Interactions of Emerging Tomato Begomoviruses in Brazil**, 148 p. 2006.

RIBEIRO, S. G. **Diversity and host interactions of emerging tomato begomoviruses in Brazil**. Brasília: Starprint Gráfica e Editora, 148, 2006.

RIBEIRO, S. G. et al. Distribution and genetic diversity of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. **Arch Virol**, v. 148, n. 2, p. 281-95, 2003.

_____. Tomato chlorotic mottle virus is a target of RNA silencing but the presence of specific short interfering RNAs does not guarantee resistance in transgenic plants. **J Virol**, v. 81, n. 4, p. 1563-73, 2007.

_____. Molecular and Biological Characterization of Tomato chlorotic mottle virus Suggests that Recombination Underlies the Evolution and Diversity of Brazilian Tomato Begomoviruses. **Phytopathology**, v. 97, n. 6, p. 702-11, 2007.

RICK, C. M.; HOLLE, M. Andean. *Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme: Genetic Variation and Its Evolutionary Significance. **Economic Botany**, v. 44, n. 3, p. 69-78, 1990.

ROBERTS, M. R. 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signalling. **Trends Plant Sci**, v. 8, n. 5, p. 218-23, 2003.

ROBERTS, M. R.; SALINAS, J.; COLLINGE, D. B. 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. **Plant Mol Biol**, v. 50, n. 6, p. 1031-9, 2002.

RODRIGUES, S. P. et al. Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in the latex of sticky diseased *Carica papaya* L. plants. **J Proteomics**, v. 75, n. 11, p. 3191-8, 2012.

RODRIGUEZ-NEGRETE, E. et al. Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. **New Phytol**, v. 199, n. 2, p. 464-75, 2013.

ROJAS, M. R. et al. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. **Plant Disease**, v. 77, n. 4, p. 340-347, 1993.

ROSARIO, K.; DUFFY, S.; BREITBART, M. A field guide to eukaryotic circular single-stranded DNA viruses: insights gained from metagenomics. **Arch Virol**, v. 157, n. 10, p. 1851-71, 2012.

SAEED, M. et al. A monopartite begomovirus-associated DNA beta satellite substitutes for the DNA B of a bipartite begomovirus to permit systemic infection. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 10, p. 2881-9, 2007.

SALVATO, F.; CARVALHO, M. C. C. G. Métodos e estratégias em proteômica e suas aplicações na área vegetal. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 727-734, 2010.

SANTANA, F. M. et al. Sources of resistance in *Lycopersicon* spp. to a bipartite whitefly-transmitted geminivirus from Brazil. **Euphytica** v. 122, n. 1, p. 45-51, 2001.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. **A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos** Lisboa: Boletim de Biotecnologia, p.17. 2004.

SATOH, K. et al. Selective modification of rice (*Oryza sativa*) gene expression by rice stripe virus infection. **J Gen Virol**, v. 91, n. Pt 1, p. 294-305, 2010.

SAUNDERS, K. et al. The DNA β satellite component associated with ageratum yellow vein disease encodes an essential pathogenicity protein (β C1). **Virology**, v. 324, n. 1, p. 37-47, 2004.

SCHNEIDER, T. et al. A proteomics approach to investigate the process of Zn hyperaccumulation in *Noccaea caerulea* (J & C. Presl) F.K. Meyer. **Plant J**, 2012.

SCHULZE, W. X.; USADEL, B. Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. **Annu Rev Plant Biol**, v. 61, p. 491-516, 2010.

SELTH, L. A.; RANGLES, J. W.; REZAIAN, M. A. Host responses to transient expression of individual genes encoded by Tomato leaf curl virus. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 17, n. 1, p. 27-33, 2004.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. **Trends Plant Sci**, v. 16, n. 12, p. 656-65, 2011.

SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal Chem**, v. 68, n. 5, p. 850-8, 1996.

SOARES, M. R. et al. Proteome of the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: a global expression profile. **Proteome Sci**, v. 8, p. 55, 2010.

SOITAMO, A. J.; JADA, B.; LEHTO, K. HC-Pro silencing suppressor significantly alters the gene expression profile in tobacco leaves and flowers. **BMC Plant Biol**, v. 11, p. 68, 2011.

_____. Expression of geminiviral AC2 RNA silencing suppressor changes sugar and jasmonate responsive gene expression in transgenic tobacco plants. **BMC Plant Biol**, v. 12, n. 1, p. 204, 2012.

SUNTER, G.; BISARO, D. M. Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. **Virology**, v. 180, n. 1, p. 416-9, 1991.

_____. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. **Plant Cell**, v. 4, n. 10, p. 1321-31, 1992.

_____. Regulation of a geminivirus coat protein promoter by AL2 protein (TrAP): evidence for activation and derepression mechanisms. **Virology**, v. 232, n. 2, p. 269-80, 1997.

SUNTER, G.; SUNTER, J. L.; BISARO, D. M. Plants expressing tomato golden mosaic virus AL2 or beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. **Virology**, v. 285, n. 1, p. 59-70, 2001.

SÁNCHEZ-DURÁN, M. A. et al. Interaction between geminivirus replication protein and the SUMO-conjugating enzyme is required for viral infection. **J Virol**, v. 85, n. 19, p. 9789-800, 2011.

TAKEOKA, G. R. et al. Processing Effects on Lycopene Content and Antioxidant Activity of Tomatoes **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 3713–3717, 2001.

TANG, J. et al. Recent development of multi-dimensional chromatography strategies in proteome research. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 866, p. 123-32, 2008.

THELEN, J. J.; MIERNYK, J. A. The proteomic future: where mass spectrometry should be taking us. **Biochem J**, v. 444, n. 2, p. 169-81, 2012.

THELEN, J. J.; PECK, S. C. Quantitative proteomics in plants: choices in abundance. **Plant Cell**, v. 19, n. 11, p. 3339-46, 2007.

THOMPSON, G. A.; SCHULZ, A. Macromolecular trafficking in the phloem. **Trends Plant Sci**, v. 4, n. 9, p. 354-360, 1999.

TIMMERMANS, M. C. P.; DAS, O. P.; MESSING, J. Geminiviruses and Their Uses as Extrachromosomal Replicons. **Plant Mol. Biol**, 45, p.79-112, 1994.

TOMANEK, L. et al. Proteomic response to elevated PCO₂ level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. **J Exp Biol**, v. 214, n. 11, p. 1836-44, 2011.

TRINKS, D. et al. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. **J Virol**, v. 79, n. 4, p. 2517-27, 2005.

TUNC-OZDEMIR, M. et al. Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v. 151, n. 1, p. 421-32, 2009.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu Rev Phytopathol**, v. 44, p. 135-62, 2006.

VANITHARANI, R. et al. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. **J Virol**, v. 78, n. 17, p. 9487-98, 2004.

VARMA, A.; MALATHI, V. G. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. **Annals of Applied Biology**, v. 142, p. 145-164, 2003.

VARSANI, A. et al. A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. **Virol J**, v. 6, p. 36, 2009.

VENTELON-DEBOUT, M. et al. Proteome analysis of cultivar-specific deregulations of *Oryza sativa indica* and *O. sativa japonica* cellular suspensions undergoing rice yellow mottle virus infection. **Proteomics**, v. 4, n. 1, p. 216-25, 2004.

VERCHOT-LUBICZ, J. A new cell-to-cell transport model for Potexviruses. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 18, n. 4, p. 283-90, 2005.

VERLAAN, M. G. et al. The Tomato Yellow Leaf Curl Virus resistance genes Ty-1 and Ty-3 are allelic and code for DFDGD-class RNA-dependent RNA polymerases. **PLoS Genet**, v. 9, n. 3, p. e1003399, 2013.

VERMA, D. P.; HONG, Z. Plant callose synthase complexes. **Plant Mol Biol**, v. 47, n. 6, p. 693-701, 2001.

VILLETH, G. R. et al. Comparative proteome analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the interaction with the susceptible and the resistant cultivars of *Brassica oleracea*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 298, n. 2, p. 260-6, 2009.

VOINNET, O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 3, p. 206-20, 2005.

VOINNET, O.; LEDERER, C.; BAULCOMBE, D. C. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. **Cell**, v. 103, n. 1, p. 157-67, 2000.

VOINNET, O. et al. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. **Plant J**, v. 33, n. 5, p. 949-56, 2003.

WALZ, C. et al. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. **Phytochemistry**, v. 65, n. 12, p. 1795-804, 2004.

WANG, H. et al. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. **J Virol**, v. 79, n. 12, p. 7410-8, 2005.

WANG, H.; HANASH, S. Multi-dimensional liquid phase based separations in proteomics. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 787, n. 1, p. 11-8, 2003.

WANG, H. et al. Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. **Plant Cell**, v. 15, n. 12, p. 3020-32, 2003.

WANG, R. Y.; STORK, J.; NAGY, P. D. A key role for heat shock protein 70 in the localization and insertion of tombusvirus replication proteins to intracellular membranes. **J Virol**, v. 83, n. 7, p. 3276-87, 2009.

WHITHAM, S. A. et al. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible *Arabidopsis thaliana* plants. **Plant J**, v. 33, n. 2, p. 271-83, 2003.

WILKINS, M. R. et al. **Proteome Research: new frontiers in functional genomics**. Berlin: Springer-Verlag, 1997.

WOLTERS, D. A.; WASHBURN, M. P.; YATES, J. R. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. **Anal Chem**, v. 73, n. 23, p. 5683-90, 2001.

WRIGHT, P. C. et al. A review of current proteomics technologies with a survey on their widespread use in reproductive biology investigations. **Theriogenology**, v. 77, n. 4, p. 738-765.e52, 2012.

WU, L. et al. Proteomic and phytohormone analysis of the response of maize (*Zea mays* L.) seedlings to sugarcane mosaic virus. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e70295, 2013.

XUE, L. J. et al. Constitutively elevated salicylic acid levels alter photosynthesis and oxidative state but not growth in transgenic populus. **Plant Cell**, v. 25, n. 7, p. 2714-30, 2013.

YANG, H. et al. Proteomics-based analysis of novel genes involved in response toward soybean mosaic virus infection. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 1, p. 511-21, 2011.

YANG, K. S. et al. Silencing of NbBTF3 results in developmental defects and disturbed gene expression in chloroplasts and mitochondria of higher plants. **Planta**, v. 225, n. 6, p. 1459-69, 2007.

YANG, X. et al. Functional modulation of the geminivirus AL2 transcription factor and silencing suppressor by self-interaction. **J Virol**, v. 81, n. 21, p. 11972-81, 2007.

_____. Arabidopsis 14-3-3 lambda is a positive regulator of RPW8-mediated disease resistance. **Plant J**, v. 60, n. 3, p. 539-50, 2009.

YAO, Y. X. et al. The functions of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene in growth and tolerance to cold and salt stresses. **Plant Physiol Biochem**, v. 49, n. 3, p. 257-64, 2011.

YE, C. et al. The unfolded protein response is triggered by a plant viral movement protein. **Plant Physiol**, v. 156, n. 2, p. 741-55, 2011.

YE, C. M. et al. SGT1 Is Induced by the Potato virus X TGBp3 and Enhances Virus Accumulation in *Nicotiana benthamiana*. **Mol Plant**, 5 (5), p. 1151-1153, 2012.

ZAMIR, D. et al. Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, TY-1. **Theor Appl Genet**, v. 88, p. 141-146, 1994.

ZHANG, M. et al. Structural and functional coupling of Hsp90- and Sgt1-centred multi-protein complexes. **EMBO J**, v. 27, n. 20, p. 2789-98, 2008.

ZHANG, Z. et al. BSCTV C2 attenuates the degradation of SAMDC1 to suppress DNA methylation-mediated gene silencing in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 23, n. 1, p. 273-88, 2011.

ZHENG, X. M. et al. A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). **Cell**, v. 50, n. 3, p. 361-8, 1987.

ZHENG, Z. et al. Loss of function in Mlo orthologs reduces susceptibility of pepper and tomato to powdery mildew disease caused by *Leveillula taurica*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e70723, 2013.

ZHOU, L. et al. Characterization of a novel annexin gene from cotton (*Gossypium hirsutum* cv CRI 35) and antioxidative role of its recombinant protein. **J Integr Plant Biol**, v. 53, n. 5, p. 347-57, 2011.

ZHOU, Y. et al. Histone H3 interacts and colocalizes with the nuclear shuttle protein and the movement protein of a geminivirus. **J Virol**, v. 85, n. 22, p. 11821-32, 2011.

APÊNDICE

Artigos publicados

1. Identification of host proteins modulated by the virulence factor AC2 of Tomato chlorotic mottle virus in *Nicotiana benthamiana*.
Proteomics 13:1947–1960 (Capítulo I desta tese).

2. Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.).

Journal of Proteomics (2014)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.013>

Artigo em preparação

3. Identificação de proteínas moduladas durante a interação tomateiro - ToCMoV através de 2D -nanoUPLC/MS^E (**Capítulo II desta tese**).

RESEARCH ARTICLE

Identification of host proteins modulated by the virulence factor AC2 of Tomato chlorotic mottle virus in *Nicotiana benthamiana*

Lilian Silveira Travassos Carmo^{1,2}, Renato Oliveira Resende², Luciano Paulino Silva¹, Simone Graça Ribeiro¹ and Angela Mehta¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil

²Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

Tomato, one of the most important crops cultivated worldwide, has been severely affected by begomoviruses such as the *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV). Virulence factor AC2 is considered crucial for a successful virus–plant interaction and is known to act as a transcriptional activator and in some begomoviruses to function as an RNA silencing suppressor factor. However, the exact functions of the AC2 protein of the begomovirus ToCMoV are not yet established. The aim of the present study was to identify differentially expressed proteins of the model plant *Nicotiana benthamiana* in response to the expression of the AC2 gene, isolated from ToCMoV. *N. benthamiana* plants were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing the viral vector Potato virus X (PVX) and with the PVX-AC2 construction. 2DE was performed and proteins were identified by MS. The results showed that the expression of ToCMoV AC2 alters the levels of several host proteins, which are important for normal plant development, causing an imbalance in cellular homeostasis. This study highlights the effect of AC2 in the modulation of plant defense processes by increasing the expression of several oxidative stress-related and pathogenesis-related proteins, as well as its role in modulating the proteome of the photosynthesis and energy production systems.

Received: December 3, 2012

Revised: February 8, 2013

Accepted: February 25, 2013

Keywords:

Differential expression / Plant proteomics / Plant–virus interaction / ToCMoV



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

1 Introduction

Tomato (*Solanum lycopersicon*) is one of the most important vegetable crops cultivated worldwide, and is severely affected by several pathogens, including nematodes, fungi, bacteria, and viruses. Whitefly-transmitted geminiviruses, which be-

long to the genus *Begomovirus* (family Geminiviridae), affect tomato productivity in several countries around the world [1], including Brazil, where losses can range from 40 to 100% [2].

In an attempt to minimize the damage caused by these viruses, characterization of the begomoviruses present in the tomato cultivating regions in Brazil has been carried out and revealed a highly diverse group, phylogenetically distant from the begomoviruses reported in other countries [3, 4]. *Tomato chlorotic mottle virus* (ToCMoV) is one of the five predominant begomovirus species and is prevalent in several tomato cultivating areas in Brazil. The control of begomoviruses is achieved by applying pesticides that target the whitefly vector and therefore are costly and not totally efficient. The

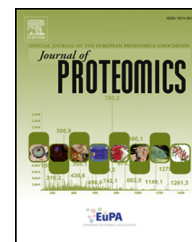
Correspondence: Dr. Angela Mehta, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Av. W5 Norte (final), 70770-917 Brasília, DF, Brazil
E-mail: angela.mehta@embrapa.br
Fax: +55-61-3340-3658

Abbreviations: ACMV, African cassava mosaic virus; CP, coat protein; PRs, pathogenesis-related proteins; cyMDH, cytosolic malate dehydrogenase; PVX, Potato virus X; ToCMoV, Tomato chlorotic mottle virus; TMV, Tobacco mosaic virus

Colour Online: See the article online to view Figs. 1–3 in colour.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jprot

Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)[☆]

Rafael de Carvalho Silva^{a,1}, Lilian Silveira Travassos Carmo^{b,1}, Zanderluce Gomes Luis^c, Luciano Paulino Silva^b, Jonny Everson Scherwinski-Pereira^{b,c,*}, Angela Mehta^{b,*}

^aPPGBIOTEC, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Amazonas, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brazil

^bEmbrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Av. W5 Norte Final, CEP 70770-917, Brasília, DF, Brazil

^cPPGBOT, Departamento de Botanica, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, CEP 70910-900, Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Araceae

Micropropagation

Embryogenic callus

Protein expression analysis

ABSTRACT

In the present study we have identified and characterized the proteins expressed during different developmental stages of *Elaeis guineensis* calli obtained from zygotic embryos. We were interested in the possible proteomic changes that would occur during the acquisition of somatic embryogenesis and therefore samples were collected from zygotic embryos (E1), swollen explants 14 days (E2) in induction medium, primary callus (E3), and pro-embryogenic callus (E4). The samples were grinded in liquid nitrogen, followed by total protein extraction using phenol and extraction buffer. Proteins were analyzed by two-dimensional electrophoresis (2-DE) and the differentially expressed protein spots were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry (MS and MS/MS). Interestingly, we have identified proteins, which can be used as potential candidates for future studies aiming at the development of biomarkers for embryogenesis acquisition and for the different stages leading to pro-embryogenic callus formation such as type IIIa membrane protein cp-wap13, fructokinase and PR proteins. The results obtained shed some light on the biochemical events involved in the process of somatic embryogenesis of *E. guineensis* obtained from zygotic embryos. The use of stage-specific protein markers can help monitor cell differentiation and contribute to improve the protocols for successfully cloning the species.

Biological significance

Understanding the fate and dynamics of cells and tissues during callus formation is essential to understand totipotency and the mechanisms involved during acquisition of somatic embryogenesis (SE). In this study we have investigated the early stages of somatic embryogenesis induction in oil palm and have identified potential markers as well as

[☆] This article is part of a Special Issue entitled: Environmental and structural proteomics.

* Corresponding authors at: Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Av. W5 Norte (final), 70770-917 Brasília, DF, Brazil. Tel.: +55 61 3448 4796; fax: +55 61 3340 3658.

E-mail addresses: jonny.pereira@embrapa.br (J.E. Scherwinski-Pereira), angela.mehta@embrapa.br (A. Mehta).

¹ These authors contributed equally to this work.

proteins potentially involved in embryogenic competence acquisition. The use of these proteins can help improve tissue culture protocols in order to increase regeneration rates. This article is part of a Special Issue entitled: Environmental and structural proteomics.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Somatic embryogenesis is a powerful process based on the totipotency of plant cells that allows the regeneration of plants without the occurrence of gamete fusion [1]. In this morphogenic pathway, the induction phase is an event mediated by several factors, such as nutritional composition, culture medium pH and heat shocks. The use of growth regulators such as auxins is also very important and is considered essential in the process [2,3].

For several plant species, including the oil palm *Elaeis guineensis*, somatic embryogenesis is one of the most important tools for cloning elite genotypes [4–6]. However, the success in the formation of embryogenic callus, differentiation into somatic embryos and plant regeneration demands a better understanding of the entire process. Basically, somatic embryogenesis can be divided into two phases: induction and expression. During the induction phase, generally somatic cells are undifferentiated, acquire embryogenic competence and proliferate as embryogenic formations. In the expression phase, the embryogenic cells differentiate to form somatic embryos and thereafter plants.

Pioneer studies of *in vitro* somatic embryogenesis were initiated in carrots [7]. Later, several other studies followed trying to identify the factors that control this morphogenic route in plants, however, most of them focused on nutritional and hormonal needs in the different species [8]. Therefore, the biochemical and molecular mechanisms that regulate somatic embryogenesis are not well understood. Several studies have been conducted comparing somatic and zygotic embryos and a differential expression of stress- and storage-related proteins has been identified [9–11]. However, few studies have focused in the earlier stages of embryogenesis [12,13].

Although it is known that during the acquisition of embryogenic competence by the somatic cells, a cellular reprogramming occurs and several genes are specifically activated [14,15], information regarding the synthesized mRNAs and proteins is still limited. One of the first genes described as involved in the expression of cellular competence was SERK (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase) in *Daucus carota* [16], and the expression of this gene is currently used as a genetic marker of the embryogenic process [17]. Recently, it has been suggested that the *E. guineensis* Eg707 gene, with similar expression to that of AtSERK1 (*Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1), may be involved in the induction of somatic embryogenesis and could be used as a marker for detecting early stages of oil palm somatic embryogenesis [13].

Although somatic embryogenesis has been used for micropropagation of *E. guineensis* [18,19], there are few studies regarding cellular metabolism, including the expression of proteins during this process. Knowledge of the physiological and biochemical events involved can allow a better comprehension of control points of this morphogenic route and

therefore help improve the protocols to successfully clone this species. Due to the limited amount of information regarding protein expression of *E. guineensis* during the somatic embryogenesis process, we have conducted a proteomic study in order to get a global view of the proteins expressed during the different embryogenic stages of induction and development of pro-embryogenic calli. We have focused on the initial stages of embryogenesis as an attempt to identify proteins, which may play important roles in triggering the acquisition of embryogenic competence.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Cultures were established from zygotic embryos obtained from mature seeds of oil palm (*E. guineensis* Jacq.), cultivar BRS C2328. The mature seeds were kindly supplied by Embrapa Amazônia Ocidental (Station of Rio Urubu), located in Rio Preto da Eva city, Amazonas State, Brazil. The standard somatic embryogenesis (SE) protocol was used with the callus induction medium (CIM) [4] comprising salts and vitamins, as proposed by Murashige and Skoog [20], supplemented with 20 g·L⁻¹ sucrose, 0.5 g·L⁻¹ glutamine, 2.5 g·L⁻¹ activated charcoal, 450 μM 4-amino-3,5,6-trichloro picolinic acid (Picloram), and solidified with 2.5 g·L⁻¹ Phytigel (Sigma®). The explants were kept in this phase for a period of up to 150 days, until pro-embryogenic calli were obtained. A total of four induction stages of somatic embryogenesis were analyzed and the zygotic embryo was considered as the first stage (E1); the swollen explant in the beginning of induction after 14 days in culture was considered the second stage (E2), the primary callus at 60 days as the third stage (E3) and the pro-embryogenic callus at 150 days as the fourth stage (E4). At least 10 biological replications were prepared for each embryogenic stage. Approximately 10 zygotic embryos were placed in each culture medium plate and, based on anatomical analysis (described in the headings 2.2 and 2.3 below), samples were scraped from the medium. Only tissue presenting typical features of each embryogenic stage were selected and separated for analysis.

2.2. Microscopy and histochemical analysis

The plant material from three biological replicates was immersed in 70% FAA (Formalin–Acetic Acid–Alcohol) fixative solution (Formaldehyde, acetic acid and ethanol 70%, at a ratio of 1:1:18 v/v) [21], under vacuum, for 24 h. The samples were then dehydrated in an increasing ethanol series (70%–100%), infiltrated, and embedded in historesin (Leica®), according to the manufacturer's recommendations. Seriated transversal and longitudinal sections (7 μm) were obtained using a manual rotator microtome (Leica model RM 2125). The sections were spread out, and placed on microscopic slides on

a hot plate heated to 40 °C. The sections were then stained with Toluidine blue [22], and submitted to Lugol's iodine test [21] to detect starch levels, followed by slide-coverslip mounting with Entellan (Merck®). The results were recorded in an optical microscope (Motic BA 300) attached to a digital image capture system (Software ImagePro 4.5).

2.3. Scanning electron microscopy

Samples from three biological replicates were fixed in Karnovsky [21] and post-fixed in 2% osmium tetroxide and sodium cacodylate buffer 0.05 M, pH 7.1 for 3 h. Samples were washed three times with the fixation buffer, dehydrated through growing ethanol concentration solutions (30%–100%), dried to a critical point with CO₂ and gold-coated. The specimens were examined under a scanning electron microscope.

2.4. Protein extraction

Plant materials from three biological replicates in the different embryonic stages were pulverized in liquid nitrogen using a pestle and a mortar and approximately 100 mg was transferred to polypropylene microtubes (1.5 mL). Protein extraction was performed using 750 µL of extraction buffer (0.7 M sucrose; 0.5 M Tris; 0.07 M HCl; 0.05 M EDTA; 0.1 M KCl, 0.04 M DTT) and the same volume of phenol. The tubes were maintained under vortex agitation for 15 min and centrifuged for 3 min at 12000 g. The supernatant was transferred to new tubes and the process was repeated three times. Protein precipitation was performed by the addition of five volumes of ammonium acetate 0.1 M in methanol. The pellet was washed with 500 µL acetone 80% and suspended in 80 µL of solubilization buffer (7 M urea; 1 M thiourea; 4% (m/v) chaps; 2% IPG buffer pH 3–10 (non-linear) NL; 0.04 M DTT). Protein concentrations were estimated using the Bradford Reagent (BioRad). In general a protein yield of approximately 800 µg per g of ground material was obtained.

2.5. Bidimensional electrophoresis

Immobiline DryStrips of 13 cm, pH 3–10 NL (GE Healthcare) were rehydrated with 250 µL of rehydration buffer (7 M urea; 2 M thiourea; 2% chaps; 2% IPG Buffer pH 3–10 NL; 0.002% bromophenol blue 1%) containing approximately 400 µg of proteins for 16 h. Strips were loaded onto a Multiphor II system (GE Healthcare) and electrofocused at 18 °C using a gradually increasing voltage (phase 1: 300 V, 2 mA, 5 W, 0:01 h; phase 2: 3500 V, 2 mA, 5 W, 1:30 h; phase 3: 3500 V, 2 mA, 5 W, 4:00 h), according to the manufacturer's instructions. The strips were then maintained in equilibration buffer (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8; Urea 6 M; Glycerol 30%; SDS 2%; bromophenol blue 1%) with 1 M DTT for 15 min followed by 15 min in the same buffer containing 2.5% iodoacetamide. Second dimension was performed by SDS-PAGE using 14% polyacrylamide gels and the molecular mass marker "Benchmark Protein Ladder" (Invitrogen). Two gels were run in parallel using the Biometra Electrophoresis system V16-2 (16 × 16 cm) (Biometra). Proteins were stained with a Colloidal Coomassie Blue solution (0.1% Coomassie G250; 2% phosphoric acid; 10% ammonium sulphate and 20% methanol) and at least four gel replicates

were obtained and digitalized with an Image Scanner III (GE Healthcare). The calibration of the Scanner was performed, according to the manufacturer's instructions. Image and data analyses of the scanned gels were performed using the Image Master 2D Platinum, which allows spot detection, quantification, background subtraction, and spot matching among multiple gels. In order to compensate for slight variations in sample loading, gel staining, and destaining, data were normalized by expressing protein abundance as relative volume (% vol). The proteins were accepted as having been differentially expressed when they were significant in Student's *t*-test at a significance level of 95%. Image analysis was performed on the set of reproducible spots from each stage.

2.6. In gel digestion and mass spectrometry analysis

Gel spots showing a fold change of ± 2.0 were cut, washed for 15 min in 50% acetonitrile and 25 mM ammonium bicarbonate and then dehydrated with acetonitrile 100%, for 10 min [23]. The gel spots were rehydrated in 15 µL solution containing 50 mM NH₄HCO₃ and trypsin Sequencing Grade (Promega) and incubated at 37 °C for 22 h. After the digestion, 1 µL of the solution was mixed with 1 µL of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (10 mg·mL⁻¹ in 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid) and applied onto MALDI target plate. Peptides were analyzed in a MALDI TOF-TOF UltraFlex III (Bruker Daltonics, Germany) operating in the positive reflector (MS) and LIFT™ (MS/MS) Modes. Peak lists were generated using the FlexAnalysis 3.0 software (Bruker Daltonics). The sophisticated numerical annotation procedure (SNAP) algorithm was used to detect the monoisotopic peak values, with a quality factor threshold of 30 and 6 as S/N threshold. Database searches were performed using the MASCOT search engine (Matrix Science, UK) with the NCBI nr protein database and Viridiplantae taxa. The mass tolerance was 80 ppm and one missed cleavage was allowed. Carbamidomethylation of cysteines, oxidation of methionine, and acrylamide-modified cysteines were considered for PMF searches. For accepting the identification, the cutoff value for the Probability Based Mowse score calculated by MASCOT (at $p < 0.05$) was used. For MS/MS data, the peptide mass tolerance was 0.5 Da, allowance of 1 missed cleavage, and charge state of +1. When the pI and MW of matched proteins were not available, these values were calculated using ExPASy Compute pI/Mw tool (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html). MS and MSMS data searches were individually performed using the MASCOT search engine (Matrix Science, UK). When only one peptide was identified, the sequence generated by the MASCOT program was checked by manual *de novo* sequencing using the FlexAnalysis 3.0 software (Bruker Daltonics).

3. Results and discussion

3.1. Anatomical and histological analysis

Mature zygotic embryos were used as explants for the somatic embryogenesis of *E. guineensis* (Fig. 1A and B). At this stage, the embryo is conical, and small when compared to the total volume of the endosperm, measuring around 5 mm and consisting of a distal and a proximal region. The distal region

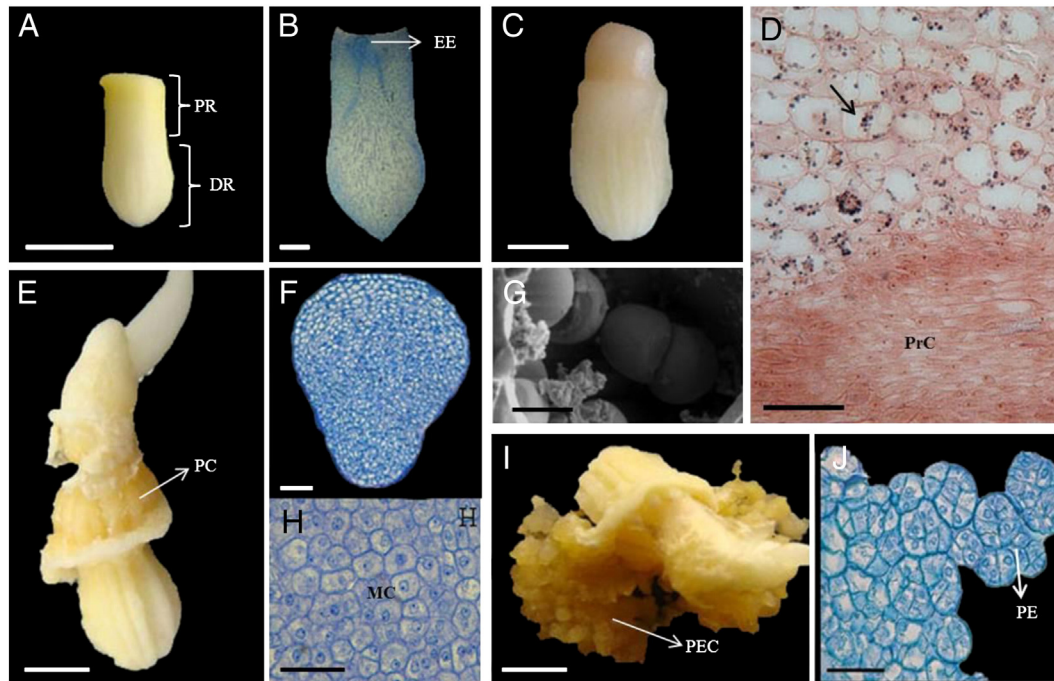


Fig. 1 – *Elaeis guineensis* Jacq explant used for somatic embryogenesis induction. **A:** Zygotic embryo (bar = 2 mm). **B:** Longitudinal cut of the zygotic embryo (bar = 200 μ m). **C:** Zygotic embryo at 14 days in induction medium (450 μ M Picloram), presenting bands in the distal region (bar = 5 mm). **D:** Accumulation of starch in the parenchyma cells adjacent to the region of intense division of procambial cells (bar = 100 μ m). **E:** Explant at 60 days in induction medium, presenting primary callus (bar = 1 cm). **F and H:** Primary callus with meristematic cells, characterized by the dense cytoplasm and evident nucleus with intense cell division at 60 days in the induction medium (bar = 100 μ m). **G:** Details of the amyloplast (bar = 10 μ m). **I:** Explant at 150 days in the induction medium, presenting pro-embryogenic callus (bar = 1 cm). **J:** Formation of pro-embryos (arrow) (bar = 100 μ m). PR: proximal region; DR: distal region; EE: embryony axis; PrC: procambial cells; PC: primary callus; MC: meristematic cells; PEC: pro-embryogenic callus; PE: pro-embryos.

corresponds to the haustorium and contains three types of cells: those of the fundamental meristem, those of the procambium and those of the protoderm. The proximal region is extended with the tissues adjacent to the embryonic axis.

The zygotic embryos presented the first signs of cell proliferation after 14 days on callus induction medium, when it was possible to observe swelling and the formation of bands in the distal region of the explant (Fig. 1C). In this phase, the histological observations showed that the first cell divisions occur in the procambial cells and in the parenchyma cells adjacent to the vascular tissue (Fig. 1D). An accumulation of starch grains occurred in the parenchymatic tissue, particularly in the cells adjacent to the centers of cell division (Fig. 1D and G).

The proliferation of primary calli with yellowish coloration was observed after 60 days in induction medium (Fig. 1E). Through the histological analysis, numerous nodular structures were observed, consisting mainly of meristematic cells, presenting isodiametric form cells, with dense cytoplasm, voluminous nucleus, and clearly evident nucleoli (Fig. 1F and H). At 150 days of cultivation, the explants presented embryogenic calli with nodular appearance, compact consistency, and yellowish coloration (Fig. 1I). The histological analysis in this phase showed regions with intense formation of proembryos (Fig. 1J).

3.2. Proteomic analysis

The analysis of the proteomic profiles of the embryogenic stages revealed approximately 200–500 reproducible protein spots ranging in pH from 3 to 10 and in mass from 10 to 160 kDa. A high variation in protein content could be observed in the different stages analyzed, even though equal protein amounts were loaded onto the gels. The zygotic embryo presented the lowest diversity of protein spots (Fig. 2). This intriguing but common event, which has been reported earlier [10,24], occurs due to the high accumulation of certain protein groups, such as globulins, in each embryogenic stage [25] and to intense cellular reprogramming that occurs during the transition from somatic to embryogenic tissue. Initially, all four stages were compared using the Image Master 2D Platinum software (GE Healthcare), however, the high variation observed in the 2D maps resulted in matching errors, especially when the most diverse stages were compared (E1 and E4). Since we were interested in studying the changes that occur during the embryogenesis competence acquisition, firstly the zygotic embryo profile (E1) was compared to that of 14 days in induction medium (E2). After that, a second comparison was performed of the profiles at 14 (E2), 60 (E3) and 150 (E3) days in induction medium in order to understand

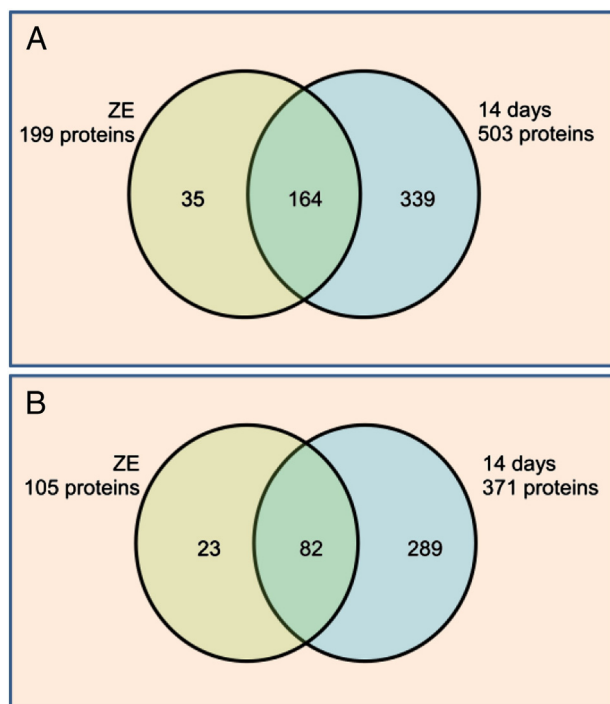


Fig. 2 – Number of exclusive and common proteins to the different stages of somatic embryogenesis in *Elaeis guineensis*. A) distribution of all proteins detected by Image Master 2D Platinum (GE Healthcare) and B) distribution of differential proteins significant in Student's t-test.

the behavior of proteins during somatic embryogenesis induction. The separation of the comparisons into two groups was crucial to reduce complexity and produce reliable results.

The well resolved differential spots (Fig. 3) were analyzed by mass spectrometry and identified using the Mascot Program. All identifications (MS and MS/MS) were manually checked using FlexAnalysis 3.0 software and only reliable results were included for discussion in Tables 1 and 2. The proteins identified were categorized into groups according to their biological function, as well as their role in metabolic pathways. Although many of the identified proteins have overlapping functions, we have attempted to categorize them in a comprehensive manner.

Although several proteins were excised for MS and MS/MS analysis (>100 spots), a limited number of protein spots could be unequivocally identified. Several positive identifications obtained by the Mascot Program were disregarded from the analysis after manual checking, which resulted in an identification rate of approximately 40%. This percentage is slightly lower than those obtained for embryogenic cell suspension cultures of *Medicago truncatula* [26] and cowpea [27], which was around 55% and for early somatic embryogenesis in *Picea glauca*, which was 62% [28]. The lack of sequence information in the databases significantly hinders current protein identification, however a total of 45 proteins could be identified in the present study and their possible functions, based on literature findings, are discussed below.

3.2.1. Comparison of the proteomic profiles of stages E1 (zygotic embryos) and E2 (14 days in induction medium)

The comparison of stages E1 and E2 showed 164 overlapping protein spots as well as a high number of unique proteins to stage E2 (Fig. 2 and Fig. 3). All proteins identified (Table 1) were searched for in the comparison of stages E2, E3 and E4 and those showing differential expression and statistical validation are discussed.

As mentioned before, the somatic embryogenesis process involves the acquisition of embryogenic capacity by the somatic cells through dedifferentiation and cellular reprogramming, which is associated with the expression of specific genes [14]. The higher number of exclusive protein spots observed in stage E2, which is the stage of induced callus at 14 days, may be due to the high mitotic activity during cellular proliferation (Fig. 1D). The cellular cycle is dependent on the synthesis of new proteins that cause morphological and biochemical changes associated to mitotic activity [29,30]. Indeed a protein (spot E319) involved with cellular proliferation was identified in stage E2 as a type IIIa membrane protein cp-wap13 (Table 1). It has been reported that high rates of cell division require proteins such as type IIIa membrane protein cp-wap13, involved in cell wall degradation, loosening and biosynthesis [31,32]. This protein spot, when searched for in the comparison of stages E2, E3 and E4 (spot 219), showed a reduced intensity in stage E3 and increased in E4. This protein was only detected during the somatic embryogenesis process and not in the zygotic embryo and therefore, it could be considered a potential candidate to be used in future studies to verify its relation to somatic embryogenesis induction.

Interestingly, fructokinase (spot E306 and spot E311), which is a primary enzyme of glycolysis and is involved in starch synthesis, was unique to stage E2 when compared to E1. This protein has been reported previously as exclusively increased in developed calli compared with corm explant [33]. The expression of this protein in our study is in agreement with the histochemical analysis, which showed the accumulation of starch grains in the parenchyma, especially in cells localized next to the centers of cell division (E2), in primary callus (E3), and in pro-embryogenic callus (E4). Indeed, spot E306 was also observed in the comparison of stages E2, E3 and E4 (spot 203) and was increased in stage E3 and decreased in stage E4 when compared to stage E2. This protein was not observed in stage E1, and according to the anatomical analysis, the zygotic embryo does not contain starch grains as energy source, indicating that starch synthesis occurred during the first two weeks of somatic embryogenesis induction (Fig. 1D and G). The deposition of starch in the cortex of the embryogenic callus has been observed in several species [8,34], and is mobilized and used as an energy source by the meristematic cells during intense cell division and differentiation.

Proteins showing quantitative differences in stages E1 and E2 were also observed. Most differential protein spots presented increased intensity in stage E2 (Fig. 2). These results again are in agreement with the intense cellular proliferation and activity that occur during the induction of somatic embryogenesis. Stress-related proteins such as glutathione S-transferase and peroxidase, both enzymes related to detoxification of reactive oxygen species (ROS) abundantly produced during somatic embryogenesis were observed among the differential protein

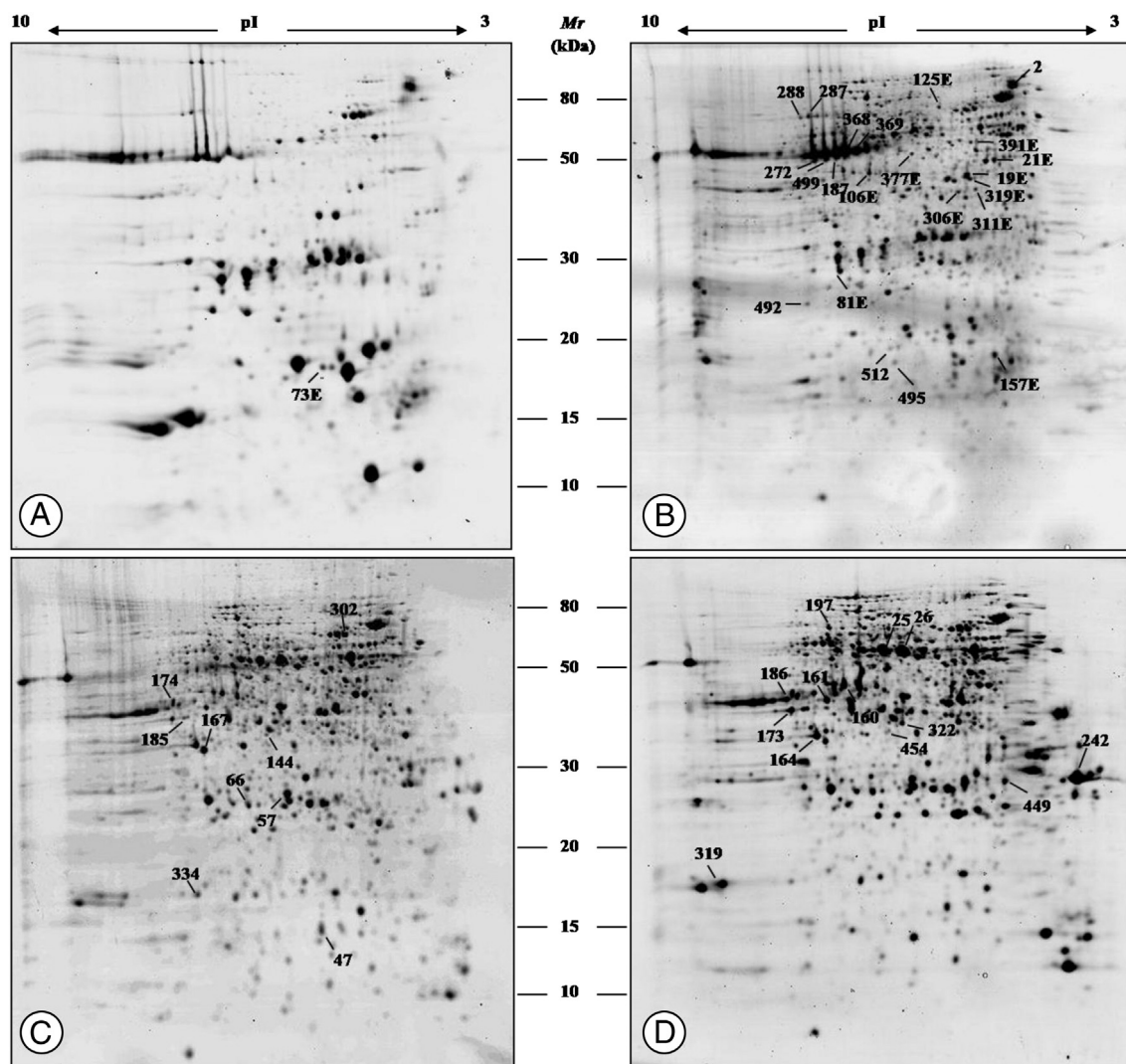


Fig. 3 – 2-DE profile of the different stages of somatic embryogenesis in *Elaeis guineensis*. A) Zygotic embryo, B) explant at 14 days in the induction medium, C) primary callus at 60 days in induction medium, D) pro-embryogenic callus at 150 days in the induction medium. Approximately 400 μ g of proteins were resolved in IPG strips of pH 3–10 NL and polyacrylamide gels 14% and stained with Colloidal Coomassie blue.

spots identified. The knowledge of the expression pattern of different stress-associated proteins during *in vitro* embryogenesis is important since stress itself has a crucial role as a trigger of the somatic embryogenesis process [35]. The high amount of endogenous phytohormones, especially auxin, is considered as the most important factor for the acquisition of embryogenic competence [28]. The high auxin concentrations cause an oxidative stress due to the increase in ROS, a process previously reported during SE in several plant species [36–38]. The expression of peroxidase and glutathione S-transferase identified in the present study could be associated to the protection of the cell against the hazardous effects of the amount of ROS, by eliminating these radicals and allowing the continuity of the embryogenic process.

A protein (spot E73) from explant origin (zygotic embryo) was also identified and showed identity to a Class 1 LMW heat

shock protein (Table 1). This protein was decreased in stage E2 when compared to stage E1. The expression of small heat shock proteins has been well characterized in developing seeds [39] as well as during initiation of SE [14]. Our results are in agreement with other studies showing that during germination HSPs are abundant during the first few days and then decline [40–42]. Indeed, in our study, the heat shock protein identified was not observed in stages E3 and E4 (spot 515).

Overall, in the comparison of stages E1 and E2, proteins related to cellular proliferation, stress and energy production were predominant. Oxidative stress management has been reported as one of the main events for the successful development of somatic embryogenesis [33]. The proteins identified in this study should be further investigated in order to associate their specific function to somatic embryogenesis competence acquisition.

Table 1 – Differential protein spots identified in the comparison of zygotic embryos and swollen explants 14 days in induction medium.

Spot number	Protein identification	Peptide sequence	Organism	Mascot score	Fold change 14d/EZ
19 E	Phosphoglycerate kinase	K.KPFVAIVGGSK.V	<i>Polytomella parva</i>	49	+3.3
21 E	Actin	K.MVAALPDGGVLLLENVR.F	<i>Gossypium hirsutum</i>	102	+2.9
		-	<i>Populus trichocarpa</i>	78	
		K.IWHHTFYNELR.V	<i>Glycine max</i>	75	
		K.SYELPDGQVITIGAER.F	<i>Oryza sativa</i>	133	
		K.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A	<i>Oryza sativa</i>	66	
73 E	Class-1 LMW heat shock protein	K.VEVEEGNVLQISGER.T	<i>Ananas comosus</i>	77	-2,6
81 E	Glutathione S-transferase	K.AWWEAVSSRPACK.K	<i>Elaeis guineensis</i>	68	+2.6
		K.AWWEAVSSRPACK.V		54	
		R.NPFGQVPAFEDGALMLHESR.A		67	
		K.GTFFGNYKPR.S	<i>Solanum lycopersicum</i>	71	
106 E	Alcohol dehydrogenase	K.THPMNFNLNER.T	<i>Oryza sativa</i>	56	+2.4
		K.FITHSVSFAEINK.A	<i>Saccharum officinarum</i>	92	
		R.IIGVDLNPFRFEEAK.K	<i>Gossypium hirsutum</i>	57	
		K.GSTVAIFGLGAVGLAAAEGAR.I	<i>Oryza sativa</i>	133	
125 E	Phosphoglucomutase, cytoplasmic	K.ATGAFILTASHNPGGPHEDFGIK.Y	<i>Solanum tuberosum</i>	43	+2.4
157 E	Putative thioredoxin-dependent peroxidase	-	<i>Elaeis guineensis</i>	108	+2.7
		K.VANIEEGGAFITISGADEILK.A		197	
		K.FLADGSGSYTHALGLELDLSEK.G		127	
306 E	Fructokinase	R.LPLWPSEQAAR.D	<i>Dimocarpus longan</i>	50	Exclusive to 14d
311 E	Fructokinase	K.IFHYGSISLISEPCR.T	<i>Arabidopsis thaliana</i>	96	Exclusive to 14d
		K.IFHYGSISLISEPCR.T	<i>Arabidopsis thaliana</i>	88	
319 E	Type IIIa membrane protein cp-wap13	K.VPEGFDYELYNR.N	<i>Vigna unguiculata</i>	77	Exclusive to 14d
377 E	Methionine adenosyltransferase	-	<i>Zea mays</i>	200	Exclusive to 14d
		K.TAAYGHFGR.E	<i>Dianthus caryophyllus</i>	46	
		K.TIFHLNPSGR.F	<i>Arabidopsis thaliana</i>	69	
		R.FVIGGPHGDAGLTGR.K	<i>Dianthus caryophyllus</i>	66	
		K.VLVNIEQQSPDIAQGVHGHFTK.C	<i>Arabidopsis thaliana</i>	81	
		-	<i>Dendrobium crumenatum</i>	100	
391 E	Methionine adenosyltransferase	-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	55	Exclusive to 14d
		K.TIFHLNPSGR.F	<i>Arabidopsis thaliana</i>	55	
		R.FVIGGPHGDAGLTGR.K	<i>Dianthus caryophyllus</i>	97	
		K.VLVNIEQQSPDIAQGVHGHFTK.C	<i>Arabidopsis thaliana</i>	60	
		-			

The symbol “-” in the peptide sequence column indicates that peptide mass fingerprinting (PMF) was performed and therefore no peptide sequence was generated.

3.2.2. Comparison of the proteomic profiles of stages E2, E3 and E4

Three stages of somatic embryogenesis of oil palm (E2, E3 and E4) were compared in order to study the possible changes that occur during early somatic embryogenesis induction (Fig. 3). A total of 334 proteins were commonly expressed, as well as several proteins unique to each stage: 73 to stage E2, 15 to E3 and 35 to E4 (Fig. 4). Thirty three proteins showing at least 2 fold difference in expression were identified (Table 2). Representative graphs for the mean percentage volumes (% vol.) of each of the identified protein spots are given in Table 2. In our study, we have observed three predominant protein functions during somatic embryogenesis: stress, energy production and protein folding. Rode et al. [11], in the comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum*, reported similar results, showing that 55% of the identified proteins belonged to three categories: glycolysis, stress response and protein folding. It seems that proteins involved in these physiological functions are predominant in the embryogenesis process and play important roles in somatic embryo development. Proteins related to these and other biological functions identified in our study are discussed below.

3.2.2.1. Signal transduction and energy metabolism proteins involved in cellular proliferation.

Calcium is an essential messenger in plants during several biological processes in response to hormones and stress signals. This response is obtained by the binding of calcium (Ca^{2+}) to proteins that act as biological sensors, activating or inhibiting biochemical reactions [43]. Annexin, identified in the present study (spot 164), binds to phospholipids in a Ca^{2+} -dependent manner and is postulated to be involved in mitogenic signal transduction [44]. This protein had its expression increased from stage E2 to E4 (Table 2), which are the stages with high cellular proliferation.

In order to sustain cellular division, a high amount of energy is also required. In the present work we have identified several proteins related to energy metabolism such as enolase, alcohol dehydrogenase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Table 2). Enolase was expressed in all stages analyzed, however, a higher expression level was observed in stages E3 and E4. Enolase is responsible for the catalysis of the conversion of 2-phosphoglycerate (2-PG) to phosphoenolpyruvate (PEP), in the glycolytic pathway, converting glucose to pyruvate, producing NADH and ATP [45]. The higher expression of enolase during

Table 2 – Differential protein spots identified during early stages of somatic embryogenesis in oil palm.

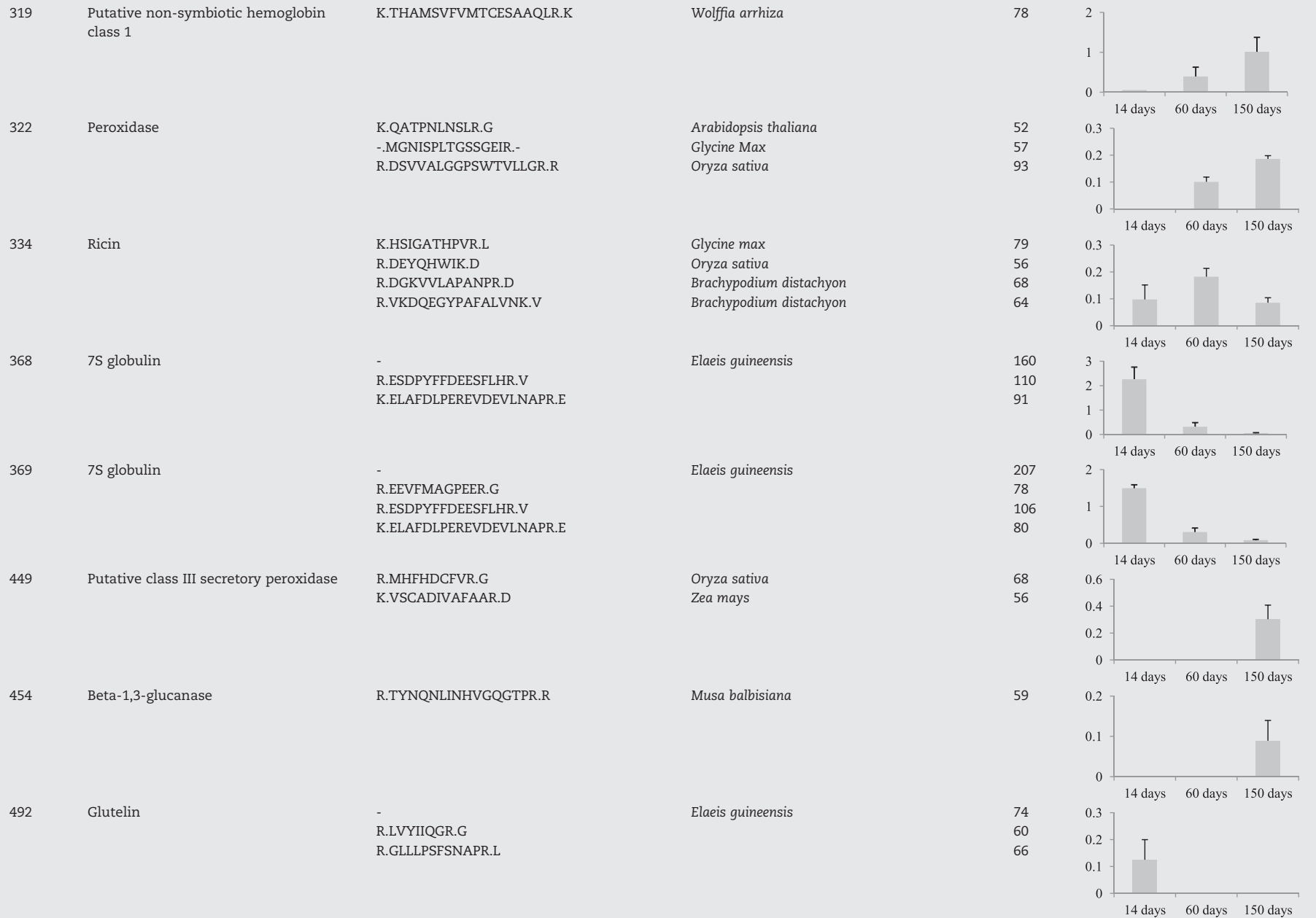
Spot number	Protein identification	Peptide sequence	Organism	Mascot score	Spot pattern (Relative spot volume)
2	Heat shock protein (HSP90)	-	<i>Vitis pseudoreticulata</i>	92	
		K.HFSVEGQLEFK.A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	82	
		K.GIVDSEDLPLNISR.E	<i>Arabidopsis thaliana</i>	44	
		K.HNDDEQYVWESQAGGSFTVTR.D	<i>Arabidopsis thaliana</i>	55	
25	Enolase	-	<i>Guzmania wittmackii</i> × <i>Guzmania lingulata</i>	117	
		K.MGVEVYHHLK.A	<i>Alnus glutinosa</i>	59	
		K.KIPLYQHIANLAGNK.Q	<i>Oryza sativa</i>	87	
		R.AAVPSGASTGIYEALRLR.D	<i>Ricinus communis</i>	132	
26	Enolase	R.AAVPSGASTGIYEALRLR.D	<i>Ricinus communis</i>	155	
47	40S ribosomal protein S12	K.AHTAIISVR.C	<i>Hordeum vulgare</i>	46	
		K.TLGEWAGLCK.I		74	
57	Ascorbate peroxidase	R.TGGPFGTMR.F	<i>Raphanus sativus</i>	55	
		R.LAWHSAGTYDVSTK.T	<i>Ammopiptanthus mongolicus</i>	112	
66	Mixture Triosephosphate isomerase, cytosolic Probable ATP synthase 24 kDa subunit, mitochondrial	K.FFVGGNWK.C	<i>Coptis japonica</i>	68	
		K.VIACVGETLEQR.E	<i>Coptis japonica</i>	63	
		R.EKADLFSQSQR.I <i>de novo</i>	<i>Vitis vinifera</i>	-	
144	Beta-1,3-glucanase	R.TYNQNLINHVGQGTPR.R	<i>Musa balbisiana</i>	69	

160	Alcohol dehydrogenase	K.GSSVAVFGLGAVGLAAAEGAR.I	<i>Dioscorea tokoro</i>	129	
161	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	-	<i>Elaeis guineensis</i>	74	
		R.VPEADVSVVTLVLR.L	<i>Populus balsamifera</i>	87	
		K.FVAWYDNEWGYSSR.V	<i>Cuscuta pentagona</i>	117	
		K.MVAWYDNEWGYSSR.V + Oxidation (M)	<i>Elaeis guineensis</i>	77	
164	Annexin	K.LLVPLVSSYR.Y	<i>Capsicum annuum</i>	48	
		R.SLEEDVASHVTGDFR.K	<i>Triticum urartu</i>	78	
167	Ricin	R.DEYQHWIK.D	<i>Oryza sativa</i>	46	
		K.HSIGATHPVR.L	<i>Glycine max</i>	63	
		R.DGKVVLPANPR.D	<i>Brachypodium distachyon</i>	80	
173	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-	<i>Populus maximowiczii</i> × <i>Populus nigra</i>	84	
		K.YDTPVHGQWK.H	<i>Hordeum vulgare</i>	62	
		R.VPTVDVSVVTLVLR.L	<i>Antirrhinum majus</i>	117	
		K.LVSWYDNEWGYSSR.V	<i>Magnolia liliiflora</i>	102	
		K.GILGYVDEDLVSTDFLGDSR.S	<i>Helianthus annuus</i>	166	
174	Formate dehydrogenase	-	<i>Quercus robur</i>	76	
		K.KGVLIVNNAR.G	<i>Arabidopsis thaliana</i>	40	
		R.LKPFNCNLLYHDR.L	<i>Oryza sativa</i>	79	
		K.NLQLLTAGIGSDHIDLK.A	<i>Vitis vinifera</i>	108	
185	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-	<i>Oryza sativa</i>	84	
		K.YDTPVHGQWK.H	<i>Hordeum vulgare</i>	61	
		R.VPTVDVSVVTLVLR.L	<i>Antirrhinum majus</i>	110	
		K.LVSWYDNEWGYSSR.V	<i>Magnolia liliiflora</i>	107	
		K.GILGYVDEDLVSTDFLGDSR.S	<i>Helianthus annuus</i>	109	
186	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	-	<i>Elaeis guineensis</i>	109	
		K.QVTVFGIR.N	<i>Elaeis guineensis</i>	47	
		K.AGIALNDHFVK.L	<i>Zea mays</i>	75	
		R.VPTVDVSVVTLVLR.L	<i>Antirrhinum majus</i>	125	
		K.MVAWYDNEWGYSSR.V	<i>Elaeis guineensis</i>	65	
		K.GILGYTEDDLVSTDFIGDSR.S	<i>Elaeis guineensis</i>	122	

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Spot number	Protein identification	Peptide sequence	Organism	Mascot score	Spot pattern (Relative spot volume)
187	7S globulin	-	<i>Elaeis guineensis</i>	229	
		K.LLLGVANYR.V		45	
		R.AGTIVSFANR.G		50	
		R.RPFNLFHK.R		50	
		R.EEVFMAGPEER.G		81	
		R.ESDPYFFDEESFLHR.V		73	
		K.ELAFDLPEREVDEVLNAPR.E		80	
197	Malic enzyme	K.STVGGGVEDVYGEDR.A	<i>Populus trichocarpa</i> × <i>Populus deltoides</i>	44	
242	Putative class III chitinase	YYDEL/INNYSATV.K <i>de novo</i>	<i>Elaeis guineensis</i>	-	
272	7S globulin	-	<i>Elaeis guineensis</i>	76	
		R.EEVFMAGPEER.G		72	
		R.ESDPYFFDEESFLHR.V		102	
287	7S globulin	-	<i>Elaeis guineensis</i>	201	
		R.RPFNLFHK.R		46	
		R.EEVFMAGPEER.G		78	
		R.ESDPYFFDEESFLHR.V		93	
		K.VSCGTTFIVPAGHPSVSVSSR.N		44	
		K.ELAFDLPEREVDEVLNAPR.E		84	
				84	
288	7S globulin	-	<i>Elaeis guineensis</i>	259	
		R.ESDPYFFDEESFLHR.V		71	
302	2,3-Bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	K.ALEYEDFDKFDR.V	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	66	
		K.LPSHYLVSPPEIER.T		51	
		K.AVGPIVDGDAVVTFNFR.A		61	
			<i>Ricinus communis</i>		
			<i>Arabidopsis thaliana</i>		



(continued on next page)

Table 2 (continued)

Spot number	Protein identification	Peptide sequence	Organism	Mascot score	Spot pattern (Relative spot volume)								
495	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	R.AVVVHADPDDLKGGHELSK.S	<i>Zea mays</i>	92	<table border="1"> <caption>Relative spot volume for spot 495</caption> <thead> <tr> <th>Time (days)</th> <th>Relative spot volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>14</td> <td>~0.12</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>~0.00</td> </tr> <tr> <td>150</td> <td>~0.00</td> </tr> </tbody> </table>	Time (days)	Relative spot volume	14	~0.12	60	~0.00	150	~0.00
Time (days)	Relative spot volume												
14	~0.12												
60	~0.00												
150	~0.00												
499	7S globulin	- R.RPFNLFHK.R R.EEVFMAGPEER.G R.ESDPYFFDEESFLHR.V K.ELAFDLPEREVDEVLNAPR.E	<i>Elaeis guineensis</i>	114 43 69 116 73	<table border="1"> <caption>Relative spot volume for spot 499</caption> <thead> <tr> <th>Time (days)</th> <th>Relative spot volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>14</td> <td>~0.12</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>~0.00</td> </tr> <tr> <td>150</td> <td>~0.00</td> </tr> </tbody> </table>	Time (days)	Relative spot volume	14	~0.12	60	~0.00	150	~0.00
Time (days)	Relative spot volume												
14	~0.12												
60	~0.00												
150	~0.00												
512	Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein isoform 2	K.GADGSWLWCTTDDTVYDAVK.S <i>de novo</i>	<i>Theobroma cacao</i>	-	<table border="1"> <caption>Relative spot volume for spot 512</caption> <thead> <tr> <th>Time (days)</th> <th>Relative spot volume</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>14</td> <td>~0.08</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>~0.00</td> </tr> <tr> <td>150</td> <td>~0.00</td> </tr> </tbody> </table>	Time (days)	Relative spot volume	14	~0.08	60	~0.00	150	~0.00
Time (days)	Relative spot volume												
14	~0.08												
60	~0.00												
150	~0.00												

The symbol “-” in the peptide sequence column indicates that peptide mass fingerprinting (PMF) was performed and therefore no peptide sequence was generated. *de novo* — the sequence of the peptide was obtained manually and compared to the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

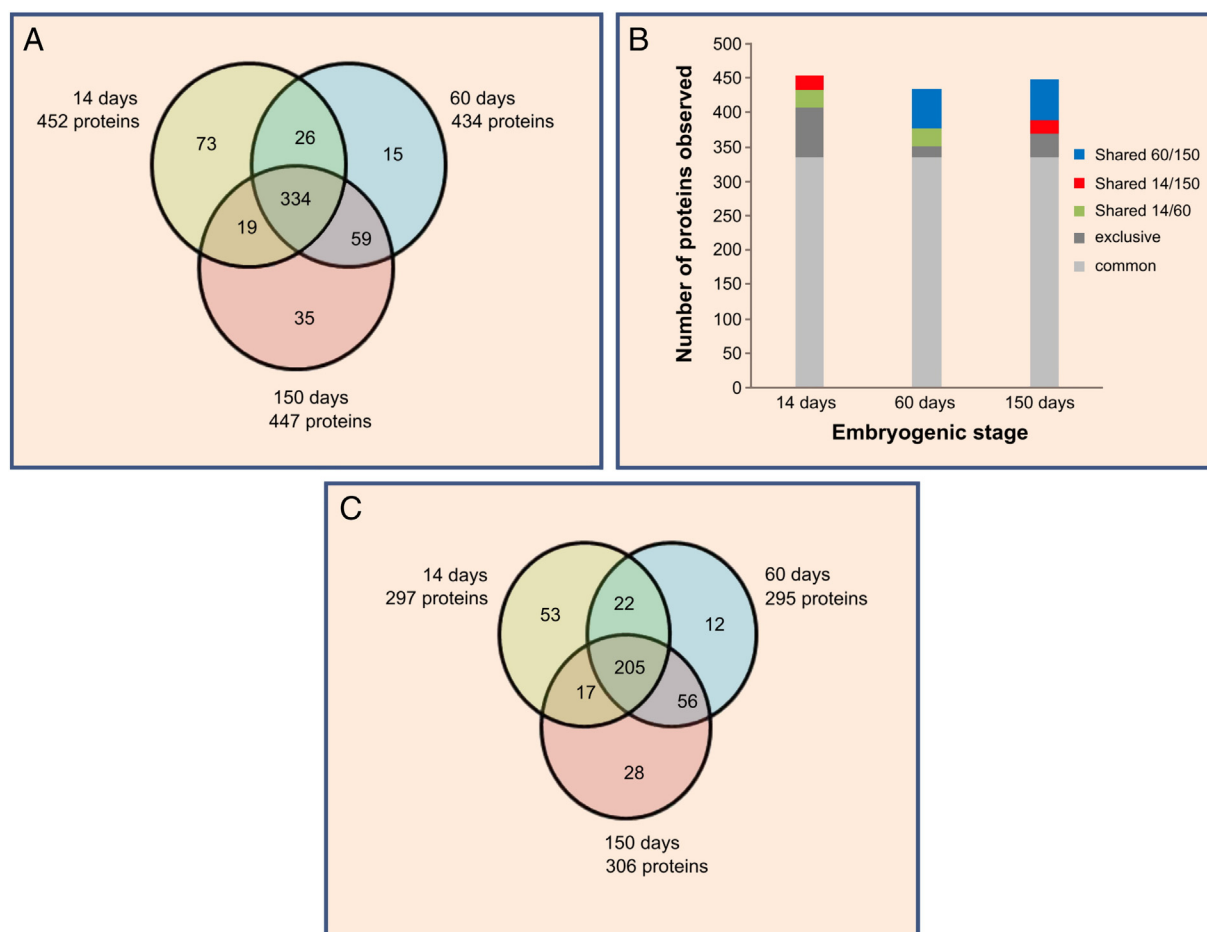


Fig. 4 – Number of exclusive and common proteins to the different stages of somatic embryogenesis in *Elaeis guineensis*. A) distribution and B) graphical view of all proteins detected by Image Master 2D Platinum (GE Healthcare) and C) distribution of differential proteins significant in Student's t-test.

development of somatic embryogenesis has been well documented [28,46].

The two other energy-related proteins identified (alcohol and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases) were only detected in E3 and, as mentioned earlier, an intense cell division was observed in the anatomical analysis in this stage (Fig. 1H and J). One of the ways to obtain glucose during the induction of pro-embryogenic callus is by degrading starch accumulated by the cells, forming glycolytic intermediaries that when submitted to oxidative catalysis, supply the high levels of ATP necessary for cellular metabolism [47]. However, during the glycolytic pathway, for the reduction of NAD^+ to NADH, a group of dehydrogenase enzymes (ADH) are necessary, demonstrating the interdependence of enolase and ADH proteins during energy metabolism [48]. These cellular activities in the *in vitro* stress conditions of somatic embryogenesis demand high energy levels, which may account for the higher expression of energy metabolism proteins during the development of somatic embryogenesis.

3.2.2.2. Storage proteins. Storage proteins have been widely studied in developing seeds of several plant species [45,49,50]. It is well known that storage proteins serve as carbon, nitrogen

and sulfur sources during embryo development in seeds [51] while carbohydrates and lipids are used as a source of energy and carbon skeletons [52].

Several protein spots were identified in this study as the storage proteins globulins and glutelins. Most globulin 7S spots were expressed in all stages, but showed the highest expression level in stage E1 and the lowest in E4 (Table 2). Globulin is a storage protein rich in basic amino acids and the accumulation begins several days after pollination, concomitantly with the maximum levels of seed maturation [53]. On the other hand, glutelin was expressed only in stages E1 and E2. Storage proteins are classified into four groups according to their solubility properties: albumins, globulins, prolamins and glutelins [54]. The differential accumulation of specific storage proteins during different stages of embryo development has been reported [55,56] and may be indicators of embryo developmental stages [57]. In oil palm, glutelin accumulation could be used as a biological marker of an early stage of somatic embryogenesis, since it was only observed in the first stage of somatic embryogenesis.

3.2.2.3. Stress-related proteins. In this study, several proteins related to stress were increased during the formation of pro-embryogenic callus, including two pathogenesis-related

(PR) proteins: beta 1,3-glucanase and chitinase. PR proteins have been observed during early stages of somatic embryogenesis in several species [58,59].

Proteins involved in oxidative stress response were also identified in this study, including one superoxide dismutase unique to stage E2, a putative secretory peroxidase unique to stage E4, an ascorbate peroxidase detected in all stages and a peroxidase present in stages E3 and E4. The occurrence of different peroxidases in embryos during germination has been reported previously [60]. However, the differential behavior of these peroxidases in the somatic embryogenesis stages is intriguing. The importance of secretory proteins in somatic embryogenesis has been reported [61,62] and it has been shown that some secreted proteins have the ability to restore somatic embryogenesis when added to the medium [63]. These are important outcomes of proteomic studies by revealing proteins, which can be used to enhance somatic embryogenesis protocols and increase regeneration rates.

Interestingly, we have identified a hemoglobin, which showed higher abundance in stage E4 (Table 2). Plant hemoglobins have been grouped into 3 classes: class 1, up-regulated by abiotic and biotic stresses [64,65], class 2, up-regulated by low temperatures [66], cytokinin [67] and ABA [68] and class 3, with limited studies. Hemoglobins act as key regulators of programmed cell death (PCD) during embryogenesis by regulating the cellular homeostasis of nitric oxide (NO). Expression of specific hemoglobins can alter PCD in plants by scavenging the NO, thus, interrupting the cell death process. PCD is an essential process for the formation of somatic embryos and a positive correlation between the number of cells undergoing PCD and the frequency of somatic embryo formation has been observed [69]. It is possible that the increase in hemoglobin levels at stage E4 in our study may be related to PCD and somatic embryo formation, since after this stage globular embryos are formed.

3.2.2.4. Protein processing. In the present study, a heat shock protein (HSP90), related to protein processing, was identified in all stages of somatic embryogenesis (E2–E4) with a higher intensity in stage E2. Heat shock proteins have an important role in the process of embryogenesis [70,71], including HSP90 [72,73]. Regarding somatic embryogenesis, the involvement of heat-shock proteins has also been reported [59]. Cordewener et al. [74] showed that embryogenesis competence of microspores is correlated to HSP protein synthesis in *Brassica napus*. Milioni et al. [75] also suggested that the embryogenic competence may also be supported by the active expression of hsp genes and their mRNA accumulation. HSP90 seems to be an interesting candidate to be further investigated regarding its ability to induce embryogenic competence in oil palm.

4. Concluding remarks

In the present study, we have identified several differentially expressed proteins during the early embryogenic stages of *E. guineensis* and detected proteins, which were stage-specific. This is the first proteomic report of *E. guineensis* somatic embryogenic tissues. Most studies related to somatic embryogenesis have focused on the comparison of zygotic and somatic embryos or among the different somatic embryos

(globular, torpedo and cotyledonary), and have revealed important information regarding the genes and proteins expressed. However, few studies have dealt with the early stages of embryogenesis, when the embryogenic competence is acquired. The ability to control oxidative stress and preserve protein structure seems to be a key component for a successful embryogenesis process. Several of the proteins identified in this study had been previously reported, however, we have shown in more detail through a time course of the early embryogenic stages, the specific stage in which the proteins are expressed. Interestingly, we have identified proteins, which can be used as potential candidates for future studies aiming at the development of biomarkers for embryogenesis acquisition and for the different stages leading to pro-embryogenic callus formation such as type IIIa membrane protein cp-wap13, fructokinase and PR proteins. Future studies to analyze the specific expression of these proteins by techniques such as RT-qPCR may confirm the differential expression and stage specificity.

Conflict of interest statement

The authors have declared no conflict of interest.

Acknowledgment

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq (551423/2010-2), and Financiadora de Estudos e Projetos—FINEP (01.08.0597.00), Brasília, Brazil, for the financial support and fellowships.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.013>.

REFERENCES

- [1] Sané D, Aberlenc-Bertossi F, Gassama-Dia YK, Sagna M, Trouslot MF, Duval Y, et al. Histochemical analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Ann Bot* 2006;98:301–8.
- [2] Zimmerman JL. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell Online* 1993;5:1411–23.
- [3] Su YH, Zhang XS. Auxin gradients trigger de novo formation of stem cells during somatic embryogenesis. *Plant Signal Behav* 2009;4:574–6.
- [4] Scherwinski-Pereira JE, Guedes RSd, Fermino Jr PCP, Silva TL, Costa FHS. Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2010;46:378–85.
- [5] Teixeira JB, Sondahl MR, Kirby EG. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Rep* 1994;13:247–50.
- [6] Thuzar M, Vanavichit A, Tragoonrun S, Jantasuriyarat C. Efficient and rapid plant regeneration of oil palm zygotic

- embryos cv. 'Tenera' through somatic embryogenesis. *Acta Physiol Plant* 2010;33:123–8.
- [7] Steward FC, Mapes MO, Mears K. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am J Bot* 1958;45:705–8.
- [8] Portillo L, Santacruz-Ruvalcaba F, Gutierrez-Mora A, Rodriguez-Garay B, Jordan MC. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2007;43:569–75.
- [9] Winkelmann T, Heintz D, Van Dorselaer A, Serek M, Braun H-P. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. Reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta* 2006;224:508–19.
- [10] Sghaier-Hammami B, Drira N, Jorrín-Novo JV. Comparative 2-DE proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) somatic and zygotic embryos. *J Proteomics* 2009;73:161–77.
- [11] Rode C, Gallien S, Heintz D, Dorselaer A, Braun H-P, Winkelmann T. Enolases: storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Mol Biol* 2011;75:305–19.
- [12] Lin H-C, Morcillo F, Dussert S, Tranchant-Dubreuil C, Tregear JW, Tranbarger T. Transcriptome analysis during somatic embryogenesis of the tropical monocot *Elaeis guineensis*: evidence for conserved gene functions in early development. *Plant Mol Biol* 2009;70:173–92.
- [13] Thuc L, Sarpan N, Ky H, Ooi S-E, Napis S, Ho C-L, et al. A novel transcript of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), Eg707, is specifically upregulated in tissues related to totipotency. *Mol Biotechnol* 2011;48:156–64.
- [14] Marsoni M, Bracale M, Espen L, Prinsi B, Negri A, Vannini C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep* 2008;27:347–56.
- [15] Zeng F, Zhang X, Cheng L, Hu L, Zhu L, Cao J, et al. A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics* 2007;90:620–8.
- [16] Schmidt ED, Guzzo F, Toonen MA, de Vries SC. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 1997;124:2049–62.
- [17] Santa-Catarina C, Hanai LR, Dornelas MC, Viana AM, Floh EIS. SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2004;79:53–61.
- [18] Touchet B, Duval Y, Pannetier C. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Cell Rep* 1991;10:529–32.
- [19] Rival A, Bertrand L, Beulé T, Combes MC, Trouslot P, Lashermes P. Suitability of RAPD analysis for the detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Breed* 1998;117:73–6.
- [20] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962;15:473–97.
- [21] Johansen DA. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company Inc.; 1940 523.
- [22] O'Brien TP, Feder N, McCully ME. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 1964;59:368–73.
- [23] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850–8.
- [24] Bian F, Zheng C, Qu F, Gong X, You C. Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Mol Biol Rep* 2010;28:22–31.
- [25] Shoemaker RC, Christofferson SE, Galbraith DW. Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep* 1987;6:12–5.
- [26] Imin N, De Jong F, Mathesius U, van Noorden G, Saeed NA, Wang X-D, et al. Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. *Proteomics* 2004;4:1883–96.
- [27] Nogueira FCS, Gonçalves EF, Jereissati ES, Santos M, Costa JH, Oliveira-Neto OB, et al. Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Cell Rep* 2007;26:1333–43.
- [28] Lippert D, Zhuang J, Ralph S, Ellis DE, Gilbert M, Olafson R, et al. Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics* 2005;5:461–73.
- [29] Dewitte W, Murray JAH. The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* 2003;54:235–64.
- [30] Silveira V, Balbuena TS, Santa-Catarina C, Floh EIS, Guerra MLP, Handro W. Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regul* 2004;44:147–56.
- [31] Wald F, Kissen R, du Jardin P, Moreno S. Characterization of UDP-glucose: protein transglucosylase genes from potato. *Plant Mol Biol* 2003;52:705–14.
- [32] Nakai H, Tanizawa S, Ito T, Kamiya K, Kim Y-M, Yamamoto T, et al. Function-unknown glycoside hydrolase family 31 proteins, mRNAs of which were expressed in rice ripening and germinating stages, are α -glucosidase and α -xylosidase. *J Biochem* 2007;142:491–500.
- [33] Sharifi G, Ebrahimzadeh H, Ghareyazie B, Gharechahi J, Vatankhah E. Identification of differentially accumulated proteins associated with embryogenic and non-embryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.). *Proteome Sci* 2012;10:3.
- [34] Verdeil JL, Hocher V, Huet C, Grosdemange F, Escoute J, Ferriere N, et al. Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Ann Bot* 2001;88:9–18.
- [35] Reddy ASN. Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci* 2001;160:381–404.
- [36] Caliskan M, Turet M, Cuming AC. Formation of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryogenic callus involves peroxide-generating germin-like oxalate oxidase. *Planta* 2004;219:132–40.
- [37] Ganesan M, Jayabalan N. Evaluation of haemoglobin (erythrogen): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR2). *Plant Cell Rep* 2004;23:181–7.
- [38] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 2002;7:405–10.
- [39] Waters ER, Lee GJ, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot* 1996;47:325–38.
- [40] Coca MA, Almoguera C, Jordano J. Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. *Plant Mol Biol* 1994;25:479–92.
- [41] zur Nieden U, Neumann D, Bucka A, Nover L. Tissue-specific localization of heat-stress proteins during embryo development. *Planta* 1995;196:530–8.
- [42] Wehmeyer N, Hernandez LD, Finkelstein RR, Vierling E. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol* 1996;112:747–57.
- [43] Rudd JJ, Franklin-Tong VE. Unravelling response-specificity in Ca^{2+} signalling pathways in plant cells. *New Phytol* 2001;151:7–33.
- [44] Schlaepfer DD, Haigler HT. Expression of annexins as a function of cellular growth state. *J Cell Biol* 1990;111:229–38.
- [45] Crofts AJ, Crofts N, Whitelegge JP, Okita TW. Isolation and identification of cytoskeleton-associated prolamine mRNA binding proteins from developing rice seeds. *Planta* 2010;231:1261–76.

- [46] Andriotis VME, Kruger NJ, Pike MJ, Smith AM. Plastidial glycolysis in developing *Arabidopsis* embryos. *New Phytol* 2010;185:649–62.
- [47] Martin AB, Cuadrado Y, Guerra H, Gallego P, Hita O, Martin L, et al. Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. *Plant Sci* 2000;154:143–51.
- [48] Haseba T, Ohno Y. A new view of alcohol metabolism and alcoholism—role of the high-Km class III alcohol dehydrogenase (ADH3). *Int J Environ Res Public Health* 2010;7:1076–92.
- [49] Raina A, Datta A. Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:11774–8.
- [50] Agrawal L, Narula K, Basu S, Shekhar S, Ghosh S, Datta A, et al. Comparative proteomics reveals a role for seed storage protein AmA1 in cellular growth, development, and nutrient accumulation. *J Proteome Res* 2013;12:4904–30.
- [51] Nielsen NC, Bassüner R, Beaman T. The biochemistry and cell biology of embryo storage proteins. In: Larkins BA, Vasil IK, editors. *Cellular and molecular biology of plant seed development*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1997. p. 151–220.
- [52] Motto M, Thompson R, Salamini F. Genetic regulation of carbohydrate and protein accumulation in seeds. In: Larkins BA, Vasil IK, editors. *Cellular and molecular biology of plant seed development*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1997. p. 479–522.
- [53] Dierks-Ventling C. Lysine biosynthesis and utilization during seed development of normal and opaque-2 *Zea mays* L. *Planta* 1983;157:233–8.
- [54] Yamagata H, Sugimoto T, Tanaka K, Kasai Z. Biosynthesis of storage proteins in developing rice seeds. *Plant Physiol* 1982;70:1094–100.
- [55] Flinn BS, Roberts DR, Webb DT, Sutton BCS. Storage protein changes during zygotic embryogenesis in interior spruce. *Tree Physiol* 1991;8:71–81.
- [56] Raghavan V. Storage protein synthesis in developing embryos. *Molecular embryology of flowering plants*. 1st ed. Cambridge: Cambridge Books Online; 1997.
- [57] Stuart DA, Nelsen J, Nichol JW. Expression of 7S and 11S alfalfa seed storage proteins in somatic embryos. *J Plant Physiol* 1988;132:134–9.
- [58] Helleboed S, Hendriks T, Bauw G, Inze D, Vasseur J, Hilbert J-L. Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. *J Exp Bot* 2000;51:1189–200.
- [59] Dong J-Z, Dunstan DI. Characterization of three heat-shock-protein genes and their developmental regulation during somatic embryogenesis in white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss]. *Planta* 1996;200:85–91.
- [60] Anstine W, Jacobsen JV, Scandalios JG, Varner JE. Deuterium oxide as a density label of peroxidases in germinating barley embryos. *Plant Physiol* 1970;45:148–52.
- [61] De Jong AJ, Cordewener J, Lo Schiavo F, Terzi M, Vandekerckhove J, Van Kammen A, et al. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell Online* 1992;4:425–33.
- [62] Takeda H, Kotake T, Nakagawa N, Sakurai N, Nevins DJ. Expression and function of cell wall-bound cationic peroxidase in *Asparagus* somatic embryogenesis. *Plant Physiol* 2003;131:1765–74.
- [63] Cordewener J, Booiij H, Zandt H, Engelen F, Kammen A, Vries S. Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta* 1991;184:478–86.
- [64] Taylor ER, Nie XZ, MacGregor AW, Hill RD. A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Mol Biol* 1994;24:853–62.
- [65] Nagata M, Hashimoto M, Murakami E-i, Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K-i, et al. A possible role of class 1 plant hemoglobin at the early stage of legume–rhizobium symbiosis. *Plant Signal Behav* 2009;4:202–4.
- [66] Trevaskis B, Watts RA, Andersson CR, Llewellyn DJ, Hargrove MS, Olson JS, et al. Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:12230–4.
- [67] Hunt PW, Watts RA, Trevaskis B, Llewellyn DJ, Burnell J, Dennis ES, et al. Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants. *Plant Mol Biol* 2001;47:677–92.
- [68] Bustos-Sanmamed P, Tovar-Méndez A, Crespi M, Sato S, Tabata S, Becana M. Regulation of nonsymbiotic and truncated hemoglobin genes of *Lotus japonicus* in plant organs and in response to nitric oxide and hormones. *New Phytol* 2011;189:765–76.
- [69] Filonova LH, Bozhkov PV, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovskiy B, von Arnold S. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J Cell Sci* 2000;113:4399–411.
- [70] Rojas A, Almoquera C, Jordano J. Transcriptional activation of a heat shock gene promoter in sunflower embryos: synergism between ABI3 and heat shock factors. *Plant J* 1999;20:601–10.
- [71] Wehmeyer N, Vierling E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol* 2000;122:1099–108.
- [72] Reddy RK, Chaudhary S, Patil P, Krishna P. The 90 kDa heat shock protein (hsp90) is expressed throughout *Brassica napus* seed development and germination. *Plant Sci* 1998;131:131–7.
- [73] Marrs KA, Casey ES, Capitant SA, Bouchard RA, Dietrich PS, Mettler IJ, et al. Characterization of two Maize HSP90 heat shock protein genes: expression during heat shock, embryogenesis, and pollen development. *Dev Genet* 1993;14:27–41.
- [74] Cordewener JHG, Hause G, Gorgen E, Busink R, Hause B, Dons HJM, et al. Changes in synthesis and localization of members of the 70-kDa class of heat-shock proteins accompany the induction of embryogenesis in *Brassica napus* L. microspores. *Planta* 1995;196:747–55.
- [75] Milioni D, Franz G, Sung R, Hatzopoulos P. Gene expression during heat-shock in embryogenic carrot cell lines. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2001;65:221–8.

development of resistant tomato plants seems to be the best alternative to be used together with integrated crop management of whitefly/begomoviruses. Therefore, the comprehension of the interaction between ToCMoV and the host plant is essential to establish more efficient disease management strategies.

The virulence factor AC2, isolated from different geminiviruses, is considered crucial for a successful interaction between the virus and the host plant. The AC2 gene encodes the multifunctional protein AC2 (also called C2, AL2, and TrAP), which is present in all members of the *Begomovirus* genus. The AC2 protein can be found in the nucleus and in the cytoplasm of the infected host cell [5, 6] and is known to activate the transcription of other virus genes, such as the coat protein and the nuclear shuttle protein genes [7, 8]. Moreover, the AC2 protein of some begomoviruses can act as a suppressor of RNA silencing by activating the transcription of host silencing suppressor genes [9] or by inactivating the host adenosine kinase [5], which is important for several processes such as the transmethylation cycle, expression of primary cytokinin-responsive genes [10], and inactivation of sucrose nonfermenting 1 kinase [11].

It has also been suggested that the AC2 protein may play a role in the inhibition of the methylation process, an important defense mechanism of the host plant against viral infection [12, 13]. Additionally, it has been shown that AC2 can interfere in the expression of important regulators of several cellular processes, such as SCFs (Skp1/Cullin1/F-box), enzymes associated to ubiquitination [12]. AC2 has also been reported to increase the host plant susceptibility to infections caused by viruses [14].

In spite of the large amount of information available regarding the multifunctionality of AC2, there is limited knowledge of the function of the AC2 protein isolated from the begomovirus ToCMoV or of its effect over the global protein expression of the host plant. Moreover, the function of ToCMoV AC2 as a silencing suppressor has not been established yet.

One of the strategies often used to analyze the effect of a given protein in a plant is heterologous expression using viral vectors, such as the Potato virus X (PVX) and Tobacco mosaic virus (TMV) [15]. Lacorte et al. [16] have constructed Gateway-compatible versions of these two vectors and showed that the targeted genes were efficiently cloned by recombination and successfully expressed. This approach has been used in several studies and changes in the transcription profile have been reported. Amin et al. [17] showed that the transient expression of genes from different begomoviruses, including the Trap/C2 gene, altered the phenotype of *Nicotiana benthamiana* plants and also modulated the miRNA levels. Similarly, Hong et al. [18] used the viral vector PVX to evaluate the effect of AC2 gene isolated from *African cassava mosaic virus* (ACMV) in transgenic model plant *N. benthamiana* and showed the potential of this system for AC2 functional investigation in planta.

Although crop plants such as *Phaseolus vulgaris* and tomato [19], and the model plants *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana spp.* have been used for virus gene functional studies [5, 9, 10, 12, 13, 19], *N. benthamiana* has been considered the best choice for plant–pathogen interaction investigations, since it presents homologous genomic regions to other agronomically important solanaceous plants such as tomato, potato, and pepper. Moreover, *N. benthamiana* is susceptible to several pathogens, including bacteria and viruses, among others [20]. It has been shown that *N. benthamiana* is an efficient host for studies involving virus-induced gene silencing and protein transient expression [21, 22].

In this study, we have used the model plant *N. benthamiana* and the PVX-based viral vector to analyze the effect of the AC2 protein encoded by the begomovirus ToCMoV in the global protein profile of the host plant in an attempt to better understand the changes modulated by this pathogenicity factor. We show that the AC2 protein interferes with several cellular processes, with major effects on the cellular homeostasis of the host plant, causing oxidative stress and the upregulation of defense-related proteins.

2 Materials and methods

2.1 Vector, plant material, and inoculations

The PVX-AC2 vector construction used in this study was previously obtained [23]. Briefly, the AC2 gene was PCR-amplified from a ToCMoV infectious clone [24] with specific primers containing attB-flanked sequences to allow Gateway® (Invitrogen) cloning. The PCR fragment was introduced by BP recombination, using BP-clonase II enzyme mix (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, into pDonr207. Subsequent LR recombination, using LR-clonase II enzyme mix (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, into the Gateway-compatible destination vector PVX-GW [16] originated PVX-AC2 (Supporting Information Fig. 1). *N. benthamiana* plants presenting 3–4 leaves were used for inoculation with *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 containing the PVX-AC2 and PVX empty vector as control. A total of 2 leaves were punctured around the central vein with a toothpick dipped in bacterium culture [25]. Leaves from the apical region were collected at 5, 10, 15, and 17 days after inoculation for protein and RNA extraction and the symptoms were monitored during this period (Fig. 1 and Supporting Information Fig. 2).

2.2 RNA extraction and RT-PCR analysis

Leaves from *N. benthamiana* inoculated with PVX-AC2 and PVX alone were collected at 5, 10, 15, and 17 dpi and pulverized in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. For cDNA synthesis,

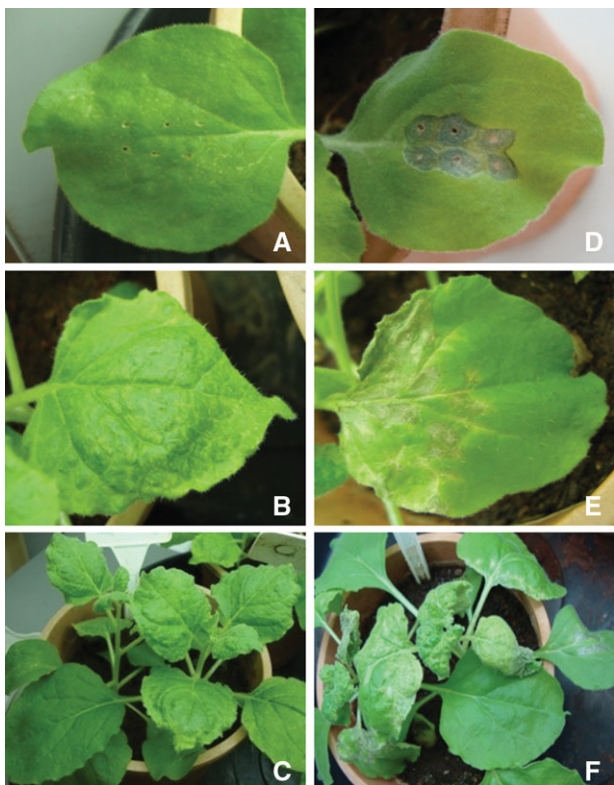


Figure 1. Symptoms of *N. benthamiana* plants infected with PVX (A, B, and C) and with PVX-AC2 (D, E, and F). (A, D) close-up view of leaves inoculated with *A. tumefaciens* containing PVX and PVX-AC2. (B, E) Systemic symptoms showing mosaic lesions and necrosis, respectively, at 17 days after inoculation. (C, F) Overview of *N. benthamiana* plants inoculated with PVX and PVX-AC2, respectively.

approximately 2 μg of total RNA were mixed with 500 ng oligo d(T) primer and 0.5 mM dNTP and the reaction was incubated for 5 min at 65°C. A total of 1 μL Superscript Reverse Transcriptase II (200 U/ μL), 1 X First strand buffer (Invitrogen), and 10 mM DTT were added and the reaction was incubated for 60 min at 42°C, followed by 15 min at 70°C. PCR reactions were performed using the primers specific for the PVX coat protein (CP) (forward: ATGTCAGCACCAGCTAGCAC and reverse: GTTATGGTG-GTGGTAGAGTG) and ToCMoV AC2 gene (forward: 5'-GGTACCGCGCGGCCGCATGCGCAATTCATCTT-3' and reverse: 5'-GTGACGCGGCCGCCTATTTAAATATGTCATCCC-3'). A total of 0.5 μL of the synthesized cDNA, 0.15 μM of each primer, 150 μM dNTP, 1 U Taq DNA Polymerase, and 1X of the corresponding buffer (Invitrogen) were used for PCR reactions in the following conditions: 4 min at 95°C, 30 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55°C, and 1 min at 72°C, and a final extension of 4 min at 72°C. The amplified fragments were separated in 1.0% agarose gels and visualized after ethidium bromide staining under UV light.

2.3 Protein extraction

Total proteins were extracted from approximately 2 mg of ground tissue pooled from the different sampling points. Only plants successfully infected were used for protein extraction. Two biological replicates were performed and at least five gels from each sample were produced. Proteins were extracted according to Mot and Vanderleyden [26] by adding 750 μL of extraction buffer (0.7 M sucrose, 0.5 M Tris-HCl, 30 mM HCl, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl, and 40 mM DTT) to the plant material and the same volume of phenol. Samples were agitated for 15 min and centrifuged for 3 min at 12 000 rpm. The upper phase was transferred to a new tube and reextracted twice with extraction buffer. Proteins were precipitated in 0.1 M ammonium acetate in methanol and washed with 80% acetone. Proteins were resuspended in rehydration buffer (7 M urea; 1 M thiourea; 4% m/v CHAPS; 2% IPG buffer pH 3–10 NL; 40 mM DTT) and the amount was estimated using the Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) by following the manufacturer's instructions.

2.4 Western blot

For Western blot analysis, proteins were extracted from approximately 1 mg of ground tissue from the different sampling points (5, 10, 15, and 17 dpi) separately. Approximately 40 μg of total proteins were submitted to SDS-PAGE using a 12% polyacrylamide gel. Samples were transferred to a PVDF membrane (Hybond-P/GE Healthcare Life Sciences), which was blocked with 5% milk in PBS-T (68 mM NaCl, 58 mM Na_2HPO_4 , 17 mM NaH_2PO_4 pH 7.4, and 0.1% v/v Tween-20) overnight at 4°C and washed twice with 0.5% milk in PBS-T for 10 min. The membranes were incubated for 2 h at room temperature with the primary anti-CP antibody for PVX coat protein (diluted 1:2500 in 0.5% milk in PBS-T) and anti-Tomato golden mosaic virus (TGMV) AC2 for AC2 (diluted 1:2000 in 0.5% milk in PBS-T). After two washes with 0.5% milk in PBS-T, secondary antibody Anti-Rabbit IgG (Sigma) alkaline phosphatase conjugate, diluted 1:10 000 in 0.5% milk in PBS-T, was added and membranes were incubated for 1 h at room temperature. Membranes were washed with 0.5% milk in PBS-T and immunodetection was performed using SIGMAFAST™ BCIP® (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium) tablets (Sigma) dissolved in 10 mL of water.

2.5 2DE and image analysis

Immobiline DryStrips of 13 cm, pH 3–10 NL were rehydrated with 280 μL of rehydration buffer and traces of bromophenol blue containing approximately 600 μg of proteins for 16 h. The first dimension was performed using a Multiphor II Electrophoresis system (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions (phase 1: 300 V, 2 mA, 5 W,

0:01 h; phase 2: 3500 V, 2 mA, 5 W, 1:30 h; phase 3: 3500 V, 2 mA, 5 W, 4:00 h).

The strips were maintained in equilibration buffer (1.5 M Tris-HCl pH 8.8; 6 M Urea; 30% Glycerol; 2% SDS; 1% bromophenol blue) with 1 M DTT for 15 min followed by 15 min in the same buffer containing 2.5% iodoacetamide. The second dimension was performed by SDS-PAGE using 13% polyacrylamide gels and the molecular mass marker “Benchmark Protein Ladder” (Invitrogen). Proteins were stained with Coomassie Blue G-250 and the gel replicates were digitalized with the ImageScanner III (GE Healthcare).

Three gels from each condition showing highest spot resolution and homogeneity in the electrophoretic pattern were selected and used for image and data analysis with the software Image Master 2D Platinum version 7.05 (GE Healthcare). Spots were automatically detected, followed by manual editing to improve detection and eliminate technical artifacts. In order to compensate for slight variations in sample loading, gel staining, and destaining, data were normalized by expressing protein abundance as relative volume (% vol). Automated matching was performed and spot alignment was improved by manual spot detection and matching. The proteins were accepted as having been differentially expressed when they displayed a fold change of 1.5 and differences were significant in Student's *t*-test at a significance level of 95%. Image analysis was performed on the set of reproducible spots from each stage and only spots present in two of three replicates were considered for the differential expression analysis.

2.6 Protein identification by MS

Gel spots were washed for 15 min in 50% acetonitrile and 25 mM ammonium bicarbonate and then dehydrated with 100% acetonitrile for 10 min [27]. The gel spots were rehydrated in a 15 μ L solution of trypsin Sequencing Grade (Promega) 0.1 μ g/ μ L prepared in 50 mM NH_4HCO_3 and incubated at 37°C for 22 h. After digestion, 1 μ L of the solution was mixed with 1 μ L of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (10 mg/mL in 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid) and applied manually onto the MALDI plate. Peptides were analyzed by Ultra-Flex III or Auto-Flex Speed MALDI TOF-TOF (Bruker Daltonics) mass spectrometers operating in positive reflector (MS) and LIFTTM (MS/MS) modes.

Peak lists were generated using the FlexAnalysis 3.3 software (Bruker Daltonics). The sophisticated numerical annotation procedure algorithm was used to detect the monoisotopic peak values, with a quality factor threshold of 30 and 3 as S/N threshold. All MS and MS/MS peak lists were individually searched using the MASCOT search engine (Matrix Science, UK) with the NCBI nr protein database and Viridiplantae taxonomy. The mass tolerance used in the searches was 150 ppm and one missed cleavage was allowed. Carbamidomethylation of cysteine residues and oxidation of methionine residues were considered as fixed and variable modifications, respec-

tively. The cutoff value for the Probability Based Mowse score calculated by MASCOT (at $p < 0.05$) was used to accept the identification. For MS/MS data, the peptide mass tolerance was 150 ppm, MS/MS ion mass tolerance at 0.6 Da, allowance of 1 missed cleavage, and charge state +1. When the pI and MW of matched proteins were not available, these values were calculated using ExPASy Compute pI/Mw tool (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html).

3 Results and discussion

AC2 proteins have been studied in several begomoviruses and some have been described as gene silencing suppressors [9, 19, 28–30]. Although the silencing suppression property of ToCMoV-AC2 has not been established yet, it has been shown that PVX-ToCMoV-AC2 causes enhanced symptoms in tomato, as well as *N. benthamiana* and *Datura stramonium* plants [23]. These results indicate that ToCMoV-AC2 is a pathogenicity determinant, which is a characteristic shared by several virus silencing suppression proteins [31]. Similar enhanced symptoms have been reported when the Tomato leaf curl virus (TLCV) C2 gene was expressed in *N. benthamiana* plants [29], showing that this gene has an important role in pathogenicity. In this study, we have analyzed the proteomic profile of *N. benthamiana* plants inoculated with PVX viral vector expressing the AC2 protein of the begomovirus ToCMoV to better understand the effect of this pathogenicity factor on the global protein expression of the host plant. Symptoms of *N. benthamiana* inoculated with *A. tumefaciens* containing PVX-AC2 and PVX control vectors were compared at 5, 10, 15, and 17 days after inoculation. Plants inoculated with PVX alone showed typical symptoms of mild mottling, whereas PVX-AC2 inoculated plants presented chlorotic and necrotic lesions, curled leaves, and systemic necrosis (Fig. 1), as previously observed [23]. The successful infection and expression of AC2 was also confirmed by RT-PCR using PVX CP and ToCMoV AC2-specific primers (Fig. 2). The RT-PCR analysis showed that the CP and AC2 mRNAs could be observed at 5 dpi with increasing intensities at 10, 15, and 17 dpi. Although slightly lower AC2 mRNA levels could be observed at 17 dpi when compared to 15 dpi, the results show that AC2 is expressed at an early stage of infection and its levels increase during disease development.

The expression of the AC2 protein was also detected by Western blotting analysis (Fig. 2). The results show that the AC2 protein could be detected at 15 dpi, which is consistent with the RT-PCR results that show an earlier AC2 mRNA detection at 5 dpi. Although the detection of AC2 protein was only observed at 15 dpi, it is probable that this protein is present at an earlier stage in low amounts, but was beyond the detection capacity of the Western blot analysis and therefore could not be visualized. Moreover, since the antibody used was developed against an AC2 protein from another virus (TGMV) showing 70% protein sequence identity to ToCMoV AC2 (Fig. 2), it is possible that the lower levels of

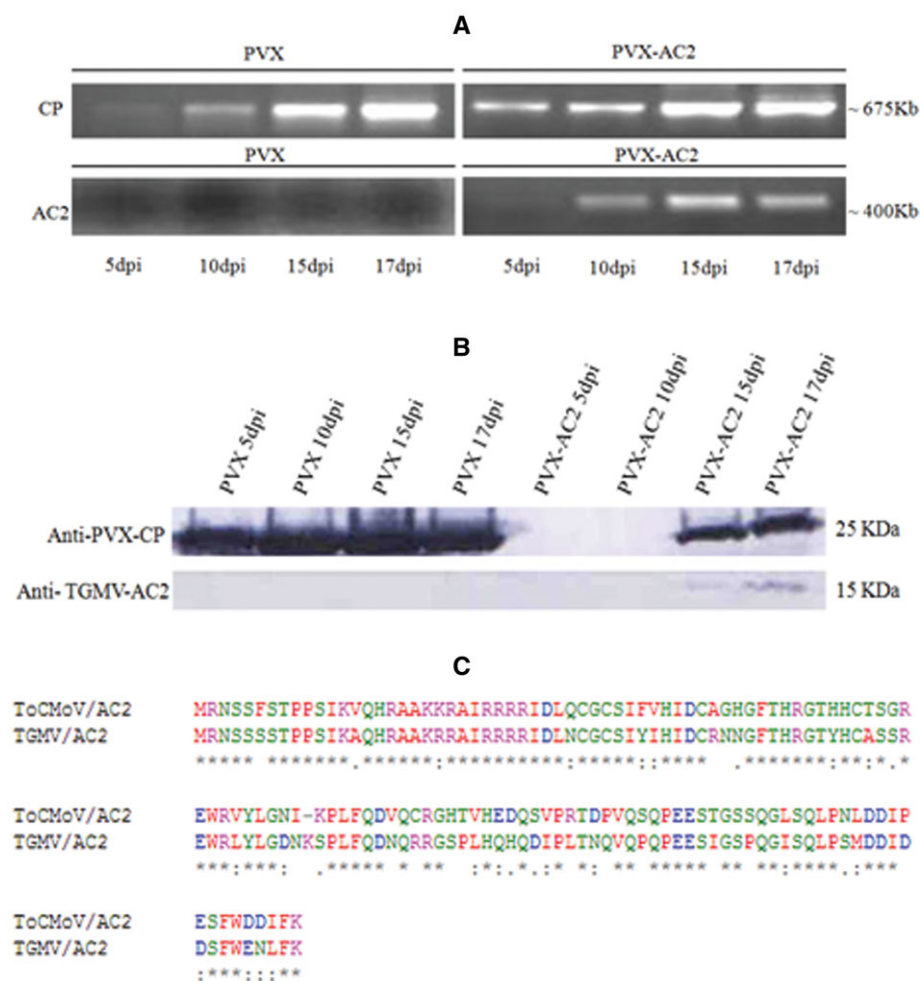


Figure 2. Expression of CP (PVX coat protein) and AC2 genes/proteins in *N. benthamiana* plants infected with PVX-AC2 and PVX vectors. (A) RT-PCR analysis of the expression levels of CP and AC2 genes at 5, 10, 15, and 17 days after inoculation. (B) Western blot analysis of the expression levels of CP and AC2 proteins at 5, 10, 15, and 17 days after inoculation. (C) Alignment of TGMV-AC2 and TocMoV-AC2 protein sequences, showing an amino acid identity of 70%.

detection observed may also be due to the lower specificity of the antibody.

Regarding the plant response, it is probable that even low amounts of AC2 protein trigger host response and cause changes in protein expression. This raises the question about the ideal sampling point for host plant expression analysis. The decision on the stage of plant infection to be analyzed is challenging and debatable, since the exact moment when the plant begins to respond to the pathogen is not known. Moreover, one has to bear in mind the limitations in detecting these changes. At early stages, e.g. the amount of tissue infected is still limited and probably few cells are affected. Moreover, it takes time for the plant to respond and produce visible symptoms. One way to overcome this dilemma is by pooling samples from different points. This strategy has been reported in other differential expression studies [32, 33], and it is certain that, although a broader overview of the biological process can be observed, some loss of information is inevitable. In this study, we have used this strategy and pooled samples from different dpi in an attempt to observe changes from the earlier to the later stages of infection. Total proteins were extracted from these pools and analyzed by 2DE.

The 2D gels analyses revealed approximately 500 protein spots per gel and, as expected, most proteins were observed in the pH range from 4 to 7 and in mass from 15 to 100 kDa (Fig. 3). The gel replicates from the control condition (empty PVX inoculated plants) revealed a correlation coefficient (r^2) ≥ 0.96 , indicating a high reproducibility among the replicates. Similarly, the analysis of the 2D map replicates from the PVX-AC2 inoculated plants showed an $r^2 \geq 0.98$ (Fig. 3). When the 2D maps of both samples (PVX and PVX-AC2) were compared, a mean r^2 of 0.84 was obtained, which suggests that the AC2 protein interfered in the proteomic profile of the host plant.

When the protein profile of the PVX-AC2 inoculated plants was compared to the control condition, a total of 42 protein spots showed statistically significant variation above a minimum ratio of 1.5, including 24 up- and 13 downregulated, as well as three proteins exclusive to PVX-AC2 inoculated plants and two only observed in PVX inoculated plants (Figs. 3 and 4). A total of 36 differential protein spots were successfully identified by MS and are shown in Table 1 and Supporting Information Table 1. Interestingly, most of these proteins were upregulated in the presence of the AC2 gene (Fig. 4)

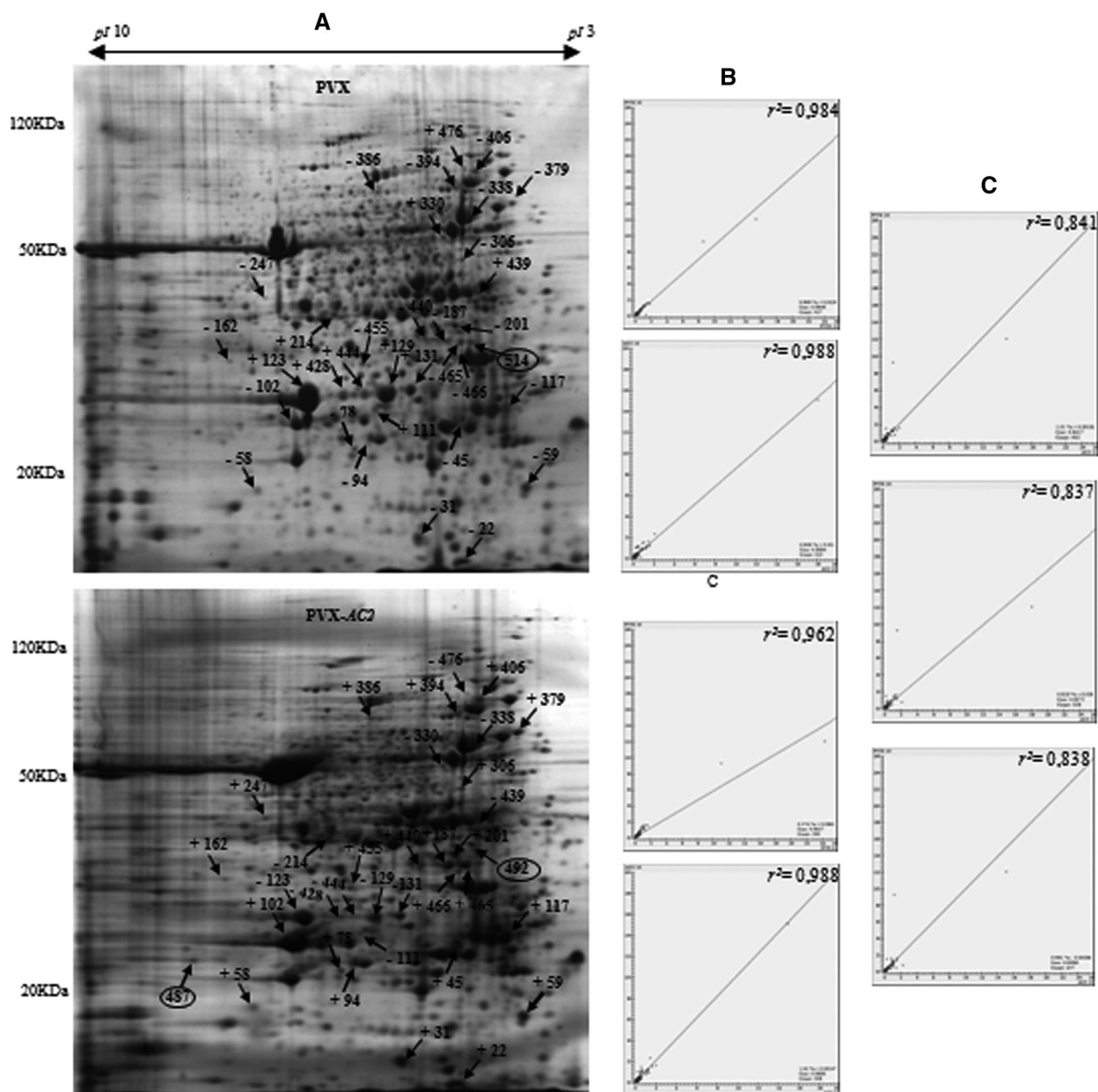


Figure 3. 2D maps of *N. benthamiana* plants inoculated with PVX and PVX-AC2 (A), as indicated, and scatter plot analysis of protein spots generated by the ImageMaster 2D Platinum 7.0 program (GE Healthcare) (B–D). Arrows indicate the differentially expressed proteins: (+) upregulated, (–) downregulated. Circled spots indicate putative exclusive proteins. (B) Comparison between the PVX gel replicates ($r^2 \geq 0.96$). (C) Comparison between the PVX-AC2 gel replicates ($r^2 \geq 0.98$). (D) Comparison between PVX and PVX-AC2 gel replicates.

and their identities indicate that different biological processes could be affected. An attempt to categorize the proteins identified was performed based on the literature and their biological roles are discussed below. Additionally, a metabolic pathway diagram depicting the influence of AC2 on host proteins was generated using SRI International Pathway Tools (version 15.5) based on the protein EC number (Supporting Information Fig. 3).

3.1 Viral proteins expressed in PVX-AC2 and PVX infected plants

Several spots corresponding to PVX viral proteins, such as TGB1 (25 kDa viral movement) (spot 102) and the CP (spots 131, 129, 123, 428, and 444) were identified in the 2D gel maps of PVX and PVX-AC2 inoculated plants (Figs. 3 and 4). The 25 kDa protein (TGB1) presented higher expression

Differentially expressed proteins

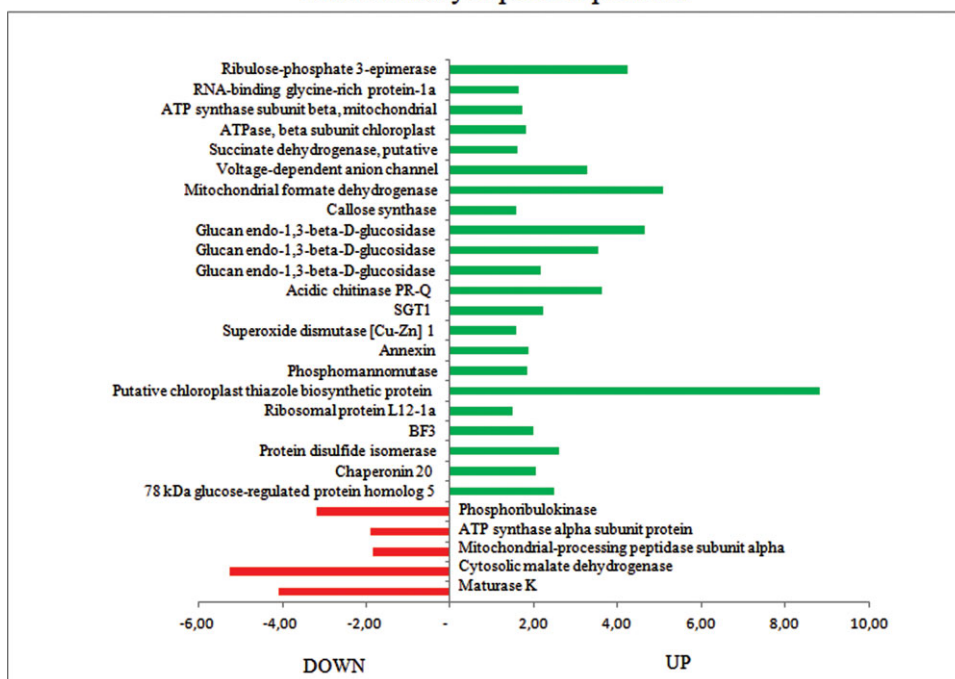


Figure 4. Diagram showing proteins that were up- (green bars) and downregulated (red bars) in *N. benthamiana* plants inoculated with PVX-AC2. The X axis represents the expression ratio detected in PVX-AC2 when compared to PVX (PVX-AC2/PVX).

(2.73-fold increase) in the plants inoculated with PVX-AC2. This protein was shown to be important for viral movement from cell to cell, via plasmodesma, in different host plants [34, 35] and can prevent the signaling of gene silencing [36]. In addition to the TGB1 protein, the coat protein is also required to facilitate viral movement in the host cells [37]. However, in our study, the expression of the coat protein was lower in plants inoculated with the PVX-AC2 construction (Table 1). Similar findings have been reported earlier by Chapman et al. [15], and according to these authors, although there was a lower accumulation of coat protein mRNA in PVX-GUS infected plants, PVX-GUS did infect the plant systemically, as was observed in our study for PVX-AC2 (Fig. 1).

Several spots of approximately 28 kDa with distinct isoelectric point were identified as coat protein (Table 1). It is well known that this protein undergoes several posttranslational modifications such as glycosylation and phosphorylation, affecting the physical and chemical structure of the protein surface [38, 39], which may account for the presence of several spots from the same protein with different pIs. Additionally, an anomalous behavior of the PVX CP electrophoresis mobility in SDS-PAGE was previously observed [40].

The fact that AC2 was not observed in the 2D gels can be explained by the molecular mass of this protein, which is 14.6 kDa (theoretical). Our gels had a concentration of 13% acrylamide, and therefore the limit for spot detection was around 15 kDa.

3.2 AC2 interferes in the photosynthetic processes and energy production

A successful viral infection is highly dependent on creating a suitable environment for viral multiplication and movement, which involves using the cellular machinery of the host and at the same time counteracting host defense responses. Viruses regulate several processes in the host cell such as transcription, translation, and posttranslational modifications in order to fulfil this task. Therefore, the study of host proteins modulated during successful viral infection represents an important approach in identifying potential targets for engineering viral resistance.

In the present study, it was observed that the presence of the AC2 protein produced a cellular imbalance, mainly of proteins involved in the metabolic and photosynthetic processes, which are also commonly affected during viral infections. Two proteins involved in photosynthesis (Ribulose-phosphate 3-epimerase and RNA-binding glycine-rich protein-1a) were upregulated, although usually biotic stresses negatively regulate genes related to photosynthesis [41]. Two other proteins were downregulated including phosphoribulokinase, which showed a fold change of -4.08 (spot 439) and the oxygen-evolving protein 1 (PSBO), a subunit of the chloroplast photosynthetic complex II that was exclusive to PVX infected plants. Phosphoribulokinase is involved in the regulation of the sugar flow in the Calvin cycle [42], and is regulated under stress conditions [43]. Similar results were also observed by Soitamo

Table 1. Protein identifications of differential spots from 2DE analysis by MALDI-TOF MS and MS/MS

Spot number	Protein identification	Organism	Accession # (NCBI nr) ^{a)}	Fold change ^{b)} (PVX-AC2/PVX)
Viral movement and assembly				
102	25 kDa movement protein	Potato virus X	gi 138400	2.73
131	Coat protein	Potato virus X	gi 61430	-1.79
129	Coat protein	Potato virus X	gi 61430	-5.02
123	Coat protein	Potato virus X	gi 61430	-6.95
428	Coat protein	Potato virus X	gi 61430	-5.20
444	Coat protein	Potato virus X	gi 61430	-12.35
Photosynthesis and energetic metabolism				
94	Ribulose-phosphate 3-epimerase	Solanum tuberosum	gi 2499728	4.24
22	RNA-binding glycine-rich protein-1a	Nicotiana sylvestris	gi 469070	1.63
439	Phosphoribulokinase	Mesembryanthemum crystallinum	gi 125578 gi 15222551	-4.08
514	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic (OEE1)	Nicotiana tabacum	gi 11134054	Exclusive (PVX)
476	ATP synthase, alpha subunit chloroplast	Nicotiana sylvestris	gi 78102516	-5.26
394	ATPase, beta subunit chloroplast	Nicotiana rustica	gi 114557	1.82
338	ATP synthase, beta subunit mitochondrial	Nicotiana plumbaginifolia	gi 114421	1.73
330	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha	Solanum tuberosum	gi 266567	-1.83
386	Succinate dehydrogenase, putative	Ricinus communis	gi 587562 gi 255579273	1.62
162	Voltage-dependent anion channel	Nicotiana tabacum	gi 161788874	3.28
247	Mitochondrial formate dehydrogenase	Nicotiana attenuata	gi 116739352	5.10
78	Callose synthase	Solanum lycopersicum Arabidopsis thaliana	gi 350538487 gi 334184624	1.59
Defense and oxidative stress				
465	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	Nicotiana tabacum	gi 100324	4.66
187	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	Nicotiana tabacum Solanum tuberosum	gi 100324 gi 3395595	3.55
440	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase	Nicotiana tabacum	gi 100324	2.15
117	Acidic chitinase PR-Q	Nicotiana tabacum	gi 116342 gi 19773	3.63
487	27 kDa pathogenesis-related protein (NtPRp27)	Nicotiana tabacum	gi 5360263	Exclusive (PVX-AC2)
306	Suppressor of G2 allele of Skp1 (SGT1)	Nicotiana benthamiana	gi 58760268	2.22
492	Epoxide hydrolase	Nicotiana benthamiana	gi 29468339 gi 189306755	Exclusive (PVX-AC2)
31	Superoxide dismutase (Cu-Zn)	Nicotiana Plumbaginifolia	gi 134616 gi 134612	1.58
201	Annexin	Nicotiana tabacum	gi 2467253	1.88
455	Phosphomannomutase	Nicotiana tabacum	gi 122194125	1.85
466	Putative chloroplast thiazole biosynthetic protein	Nicotiana tabacum	gi 30013665	8.83
Transcription and translation				
214	Cytosolic malate dehydrogenase	Nicotiana tabacum	gi 10798652	-1.90
59	Ribosomal protein L12-1a	Nicotiana tabacum	gi 20020	1.49
58	Basic transcription factor (BTF3)	Nicotiana benthamiana	gi 90823167	2.00
111	Maturase K, chloroplast	Chamerion angustifolium	gi 379039935	-3.17
Chaperones				
379	Protein disulfide isomerase	Nicotiana benthamiana	gi 257222620	2.59
451	Chaperonin 20	Arabidopsis thaliana	gi 15242045	2.05
406	78 kDa glucose-regulated protein homolog 5	Nicotiana tabacum	gi 729623	2.48

a) More than one accession cited indicates different hits for peptides identified from the same protein.

b) The “-” signal indicates downregulation.

et al. [44] who showed that transgenic tobacco plants expressing AC2 from ACMV, had several photosynthesis genes downregulated, including PSBO. They suggest that these alterations in sugar metabolism-related gene expression imply a carbon metabolism imbalance. Soitamo et al. [45] analyzed transgenic tobacco plants, which constitutively expressed the helper component-proteinase (HC-Pro), an RNA-silencing suppressors derived from potyviral genome. These authors also showed the downregulation of photosynthetic proteins such as chlororespiration and cyclic electron transport proteins. It seems that, similarly to HC-Pro, the presence of the AC2 protein also resulted in a carbon metabolism imbalance in *N. benthamiana* plants.

Other proteins involved in electron transport in chloroplast and mitochondria were also identified in the present study. Interestingly, the α subunit of the chloroplast ATPase was downregulated in PVX-AC2 plants (spot 476; -5.26-fold), while the β subunit was upregulated (spot 394; 1.82-fold). The chloroplast ATP synthase is formed by nine subunits, three of which are encoded in the nucleus (atpC, atpD, and atpG) while the other six by two separate operons in the chloroplast: the atpB–atpE (atpB/E) operon and the atpI–atpH–atpF–atpA cluster [46]. Differences in expression of the α and β ATPase subunits have been reported during the interaction of tomato plants resistant and susceptible to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) [47]. It was shown that the α subunit of ATP-synthase was only observed in the resistant interaction, while the β subunit was upregulated in the susceptible interaction [47]. An additional role for the ATPase β subunit has been recently demonstrated by [48]. These authors isolated a mitochondrial ATP synthase β subunit responsive to fumonisin B1 (FB1), a mycotoxin secreted by fungi from the genus *Fusarium* that initiated programmed cell death in *Arabidopsis* [49], and propose that this subunit is a novel plant cell death regulator. Although these studies were performed with mitochondrial ATPase β subunit, chloroplast ATPase β subunit was also identified as responsive to FB1. It is possible that the differences found in the expression patterns of α and β chloroplast ATPase subunits in this study may be due to a possible multifunctionality of these subunits.

Regarding the mitochondria ATP synthase, the β subunit was upregulated (spot 338; 1.73-fold, respectively). Our results showed that three mitochondrial proteins identified in PVX-AC2 plants are involved in oxidative phosphorylation: mitochondrial processing peptidase (α -MPP) (spot 330; -1.83-fold), β subunit of ATP synthase, and succinate dehydrogenase (spot 386; 1.62-fold). Two other proteins showed upregulation in PVX-AC2 infected plants: voltage-dependent anion channel (spot 162; 3.28-fold) and mitochondrial formate dehydrogenase (spot 247; 5.1-fold).

It has been reported in planta that β C1 silencing suppressor protein from the begomovirus-associated DNA- β satellite was able to regulate host genes involved in photosynthesis and

respiratory processes [50]. We have observed similar results in this study for the AC2 protein of ToCMoV, which regulated the expression of different chloroplast and mitochondria proteins. The accumulation of the mitochondrial protein voltage-dependent anion channel, succinate dehydrogenase, and mitochondrial formate dehydrogenase were higher in PVX-AC2 infected plants, which showed a higher severity in the symptoms. Several studies have shown that the expression of these proteins is altered under stress conditions as a defense response [51, 52] and may be associated to symptom development.

On the other hand, α -MPP was downregulated in PVX-AC2 infected plants. This subunit is one of the components that forms the mitochondrial processing peptidase [53] and under stress conditions, the levels of this protein can be altered, resulting in the increase of protein synthesis and energy production in the mitochondria of infected plants [54].

In general, it is interesting to observe that the ToCMoV AC2 protein was able to affect important proteins involved in cellular respiration, revealing a possible function in modulating the mitochondrial proteome. These results give some insight as to the processes affected by begomovirus-host interactions.

Besides proteins associated to photosynthesis and energy production, we also identified a callose synthase (spot 78; 1.59-fold), a cellular metabolism protein. An increased accumulation of callose has been previously observed around TMV-induced lesions in β -1,3-glucanase-deficient tobacco plants, which resulted in decreased susceptibility to TMV [55]. In soybean, repression of callose synthase at 7 days after inoculation and later upregulation at 14 days postinoculation was observed, which may be associated with a delayed resistance response [56]. The molecular mass observed for the identified callose synthase (23 kDa) presented a significant difference to the theoretical mass (226 kDa). It has been suggested that callose synthase represents a multisubunit enzyme complex, with polypeptides varying between 25 and 92 kDa [57].

Taken together, these results suggest that the presence of the AC2 protein was able to cause an imbalance in cellular homeostasis, interfering in chloroplast and mitochondria functioning. The up- or downregulation of several genes and proteins is dependent on sampling time (days after infection) and many of them may be involved in symptom development. In the present study, leaves of different sampling points were pooled together and therefore this fluctuation in protein detection was probably minimized.

Previous studies in virus-infected plants have shown that disease symptoms are correlated with increased glycolysis, respiration, and starch accumulation, decreased photosynthesis and reduced protein synthesis [56, 58]. In this study, we show that ToCMoV AC2 expressed from a PVX viral vector is capable of interfering in important cellular processes in the host plant, indicating that a similar situation may occur in ToCMoV infection, highlighting the importance of this protein in viral infection.

3.3 AC2 modulates defense-related proteins and oxidative stress in the host plant

Another group of proteins induced by ToCMoV AC2 was the pathogenesis-related proteins (PRs). These proteins are induced by the plant defense system in an attempt to avoid pathogen development and infection [59]. In this study, three PRs were upregulated in PVX-AC2 inoculated plants, including spots identified as glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase (spots 465, 187, and 440) with different isoelectric points (Table 1), acidic chitinase (spot 117; 3.63-fold), and 27 kDa pathogenesis-related protein (NtPRp27) (spot 487; exclusive to PVX-AC2). It has been reported that plants infected with begomovirus increase the levels of PR proteins [60]. The results obtained herein, showed the induction of these proteins in response to PVX-AC2 in the absence of other ToCMoV proteins. Soitamo et al. [44] have likewise shown similar findings in transgenic tobacco plants expressing ACMV AC2, which presented upregulation of defense and oxidative stress associated genes, comprising transcripts involved in the systemic acquired resistance, ROS scavenging, and respiratory burst oxidation.

Interestingly, a suppressor of G2 allele of Skp1, SGT1 (spot 306; 2.22-fold), was also identified in this study, with a higher expression level in plants inoculated with PVX-AC2. This protein is involved in several biological processes such as plant development, defense response [61], protein folding [62], and degradation of target proteins during the interaction with the SCF complex (SKP1, Cullin, F box), which is a multi-protein E3 ubiquitin ligase complex that catalyzes protein ubiquitination and is important for the elimination of misfolded proteins [63]. These results indicate that AC2 may affect the regulatory centre of the ubiquitination process [12] to avoid cytotoxicity, and consequently interfere with the expression of other proteins to favor viral infection. Lozano-Durán et al. [64] used reverse genetics to identify several host genes involved in geminivirus infection, which included an SKP1-like 2 gene. These authors show that AC2 is capable of hindering the activity of SKP1 and other SCF complex proteins, probably conferring a biological advantage for the viral infection, in particular related to the ubiquitination processes of plant proteins.

We have also identified several upregulated proteins involved directly or indirectly in oxidative stress, such as epoxide hydrolase (spot 492; exclusive to PVX-AC2), superoxide dismutase (spot 31; 1.58-fold), annexin (spot 201; 1.88-fold), phosphomannomutase (spot 455; 1.85-fold) and a putative chloroplast thiazole biosynthetic protein (spot 466; 8.83-fold). It is well known that epoxide hydrolase and superoxide dismutase are directly involved in antioxidant activity and are induced as a defense response in order to reduce the effects of oxidative stress [65]. Two metabolism proteins, an annexin and a phosphomannomutase, and one associated to vitamin biosynthesis, the putative chloroplast thiazole biosynthetic protein, have been reported to be indirectly involved with the oxidative process [66, 67]. Annexin has also been impli-

cated in the modulation of callose synthase activity in cotton [68], which may be related to wound healing and stress situations [69]. Callose synthase was also identified in this study, as discussed above, and like annexin, was upregulated in response to AC2.

Interestingly, the upregulation in ROS scavenging proteins show that the effect of AC2 occurs toward creating a suitable environment for virus infection by containing stress to avoid cellular death, which would be unfavorable for viral spread. Indeed, such an antioxidant protein profile could not only ameliorate disease symptoms but also facilitate viral survival. In this way, AC2 seems to prolong cell lifespan facilitating virus multiplication and virus movement in host cells.

3.4 Transcription and translation factors affected by AC2

The modulation of transcription and translation factors by begomovirus AC2 proteins has been previously reported. In this study, we identified a cytosolic malate dehydrogenase (cyMDH) that was downregulated in response to the ToCMoV AC2. Similar results were obtained by Soitamo et al. [44], when analyzing the effect of a silencing suppressor from ACMV in tobacco. cyMDH is an important enzyme in metabolism, which affects the stability and transactivation of a transcriptional factor that controls cellular cycle (arrest), cell death, and DNA repair [70]. Under stress conditions, the level of cyMDH can be altered, favoring plant growth and conferring tolerance to stress [71].

Evidence has shown that the AC2 protein is also able to affect the expression of proteins involved in the transcriptional process, such as the Scarecrow transcription regulators-like SCL6-II and SCL8 [9]. Interestingly, other proteins involved in the transcription and translation processes were also identified in this work, such as the ribosomal protein L12-1a (spot 59; 1.49-fold), the basic transcription factor BTF3 (spot 58; 2.0-fold), and maturase K (spot 111; -3.17-fold).

Maturase K, which was downregulated in PVX-AC2 infected plants, is an enzyme that acts as a posttranslational splicing factor in the chloroplast and the generated proteins are important for the correct functioning of the chloroplast, including photosynthesis [72]. It has been reported that higher levels of maturase K are associated to increased photosynthetic activity [73], which is not usually observed upon pathogen infection.

Our study also revealed the accumulation of the transcription factor BTF3 in PVX-AC2 infected plants. BTF3 was first studied in mammalian cells as one of the basal transcription factors involved in initiation of transcription from class II promoters [74] and have been implicated in apoptosis [75]. In plants, the function of this protein is still not clear. It was observed that BTF3 deficiency in *N. benthamiana* plants preferentially affects chloroplasts and mitochondria [76]. Subunits of BTF3 have also been associated with HR-mediated cell death in *Capsicum annuum* against TMV in a resistant

interaction but not in a susceptible one [77]. The authors suggest that BTF3 regulates the transcription of defense-related genes upon TMV infection [77]. In our model system, the BTF3 could play a similar role triggered by AC2 expression.

3.5 Chaperone accumulation in PVX-AC2 infected plants

Three proteins involved in folding were identified in this study and were upregulated in PVX-AC2 infected plants: disulfide isomerase (spot 379), chaperonin 20 (spot 451), and 78 kDa glucose-regulated protein homolog 5 (BiP 5/GRP 78; spot 406). Interestingly, it has been proposed that BiP might regulate the cytotoxic effects of PVX proteins during virus infection in order to reduce cytotoxicity and consequently necrosis to favor viral multiplication [78]. This response may be important to avoid cellular disturbance and even death in cases in which viral proteins reach high levels. Similarly, our results indicate that AC2 is also able to enhance BiP expression and may contribute to facilitate virus infection and movement in host cells.

It is well known that chaperones are upregulated under stress conditions [79–81] and may form complexes with viral proteins during infection. Krenz et al. [82] reported that the *Arabidopsis thaliana* heat shock protein 70 kDa (HSP70) interacts with the movement protein of the Abutilon mosaic virus, and propose that this interaction is important for viral transport and symptom induction. Lozano-Durán et al. [64] also showed the importance of an HSP70 in Tomato yellow leaf curl Sardinia virus infection. These authors propose that heat shock proteins may be important for rapid protein maturation and turnover during a short virus multiplication cycle. HSP70 has also been reported to be a major interactor of SGT1 [83], which is essential for resistance to viruses [84] and was also identified in our study. The possible interaction between the AC2 protein of ToCMoV with host plant chaperones was not reported previously, however, it may occur and could play a key role in favoring successful viral infection by providing the host protein modification machinery for the virus to replicate in the plant.

4 Concluding remarks

As mentioned earlier in our study, a successful viral infection relies on the host plant machinery for viral replication and spread. Although several studies have been performed to investigate host proteins involved in these processes, the identification of the exact role of the host genes and proteins is still a challenging task. In this work, we have used proteomic techniques to better understand the effects of the ToCMoV AC2 pathogenicity factor in the protein expression pattern of the host plant. The AC2 protein was able to significantly alter the global protein profile in *N. benthamiana* leaves, and

consequently affect several critical biological processes. This is the first report of the global effect of the virulence factor ToCMoV AC2 in the protein profile of a host plant. This study revealed that more than 50% of the differentially expressed proteins were upregulated in *N. benthamiana* plants. Moreover, this study highlights the effect of AC2 in the modulation of plant defense processes, by increasing the expression of several oxidative stress-related and PR proteins, as well as its role in modulating the proteome of the photosynthesis and energy production systems. Interestingly, the protein that showed the most pronounced upregulation in response to PVX-AC2 was the putative thiazole biosynthetic protein (spot 466; 8.8-fold change). This protein is associated to thiamine biosynthesis, which is a very important cofactor in several metabolic pathways and has also been associated with enhanced tolerance to oxidative stress [67] and resistance to plant diseases [85]. Based on the results obtained, this new information on the effect of the AC2 protein in the host reveals that this pathogenicity factor has an extremely important role in the interaction between the virus and the plant, which compromises the homeostatic equilibrium of the cell. It is clear that the AC2 protein plays a key role in viral infection and is essential for pathogenicity in tobacco. Based on the results obtained, target proteins can now be selected to direct future studies aiming at the generation of plant lineages tolerant or even resistant to ToCMoV.

This work was sponsored by CNPq, Embrapa/Monsanto Agreement, and INCT-Plant-Pest Interactions. We thank CNPq for providing a scholarship to L.S.T.C. and a fellowship to A.M. The authors thank Marcos Mota do Carmo Costa for assistance in Blas2Go analysis, David Bisaro for the TGMV-AC2 antibody, Cristiano Lacorte for the PVX-Gateway clone and Pedro Henrique Souza for assistance with the plants in the greenhouse. We acknowledge the Laboratory of Mass Spectrometry of Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia for the support in the mass spectrometry analysis.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Varma, A., Malathi, V. G., Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Ann. Appl. Biol.* 2003, *142*, 145–164.
- [2] Faria, J. C., Bezerra, I. C., Zerbini, F. M., Ribeiro, S. G., Lima, M. F., Situação atual das geminiviroses no Brasil. *Fitopatol Bras* 2000, *25*, 125–137.
- [3] Albuquerque, L. C., Varsani, A., Fernandes, F. R., Pinheiro, B. et al., Further characterization of tomato-infecting begomoviruses in Brazil. *Arch. Virol.* 2012, *157*, 747–752.
- [4] Castillo-Urquiza, G. P., Beserra, J. E., Jr., Bruckner, F. P., Lima, A. T. et al., Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Arch. Virol.* 2008, *153*, 1985–1989.

- [5] Wang, H., Hao, L., Shung, C. Y., Sunter, G., Bisaro, D. M., Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* 2003, *15*, 3020–3032.
- [6] Yang, X., Baliji, S., Buchmann, R. C., Wang, H. et al., Functional modulation of the geminivirus AL2 transcription factor and silencing suppressor by self-interaction. *J. Virol.* 2007, *81*, 11972–11981.
- [7] Sunter, G., Bisaro, D. M., Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is needed for coat protein expression. *Virology* 1991, *180*, 416–419.
- [8] Sunter, G., Bisaro, D. M., Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* 1992, *4*, 1321–1331.
- [9] Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Akbergenov, R. et al., Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.* 2005, *79*, 2517–2527.
- [10] Baliji, S., Lacatus, G., Sunter, G., The interaction between geminivirus pathogenicity proteins and adenosine kinase leads to increased expression of primary cytokinin-responsive genes. *Virology* 2010, *402*, 238–247.
- [11] Hao, L., Wang, H., Sunter, G., Bisaro, D. M., Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell* 2003, *15*, 1034–1048.
- [12] Lozano-Duran, R., Bejarano, E. R., Geminivirus C2 protein might be the key player for geminiviral co-option of SCF-mediated ubiquitination. *Plant Signal. Behav.* 2011, *6*, 999–1001.
- [13] Raja, P., Sanville, B. C., Buchmann, R. C., Bisaro, D. M., Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J. Virol.* 2008, *82*, 8997–9007.
- [14] Sunter, G., Sunter, J. L., Bisaro, D. M., Plants expressing tomato golden mosaic virus AL2 or beet curly top virus L2 transgenes show enhanced susceptibility to infection by DNA and RNA viruses. *Virology* 2001, *285*, 59–70.
- [15] Chapman, S., Kavanagh, T., Baulcombe, D., Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *Plant J.* 1992, *2*, 549–557.
- [16] Lacorte, C., Ribeiro, S. G., Lohuis, D., Goldbach, R., Prins, M., Potatovirus X and Tobacco mosaic virus-based vectors compatible with the Gateway cloning system. *J. Virol. Methods* 2010, *164*, 7–13.
- [17] Amin, I., Patil, B. L., Briddon, R. W., Mansoor, S., Fauquet, C. M., Comparison of phenotypes produced in response to transient expression of genes encoded by four distinct begomoviruses in *Nicotiana benthamiana* and their correlation with the levels of developmental miRNAs. *Viol. J.* 2011, *8*.
- [18] Hong, Y., Saunders, K., Stanley, J., Transactivation of dianthin transgene expression by African cassava mosaic virus AC2. *Virology* 1997, *228*, 383–387.
- [19] Luna, A. P., Morilla, G., Voinnet, O., Bejarano, E. R., Functional analysis of gene-silencing suppressors from tomato yellow leaf curl disease viruses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2012, *25*, 1294–1306.
- [20] Goodin, M. M., Zaitlin, D., Naidu, R. A., Lommel, S. A., *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008, *21*, 1015–1026.
- [21] Senthil-Kumar, S., Mysore, K. S., New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends Plant Sci.* 2011, *16*, 656–665.
- [22] Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D., An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 2003, *33*, 949–956.
- [23] Ribeiro, S. G., *Diversity and Host Interactions of Emerging Tomato Begomoviruses in Brazil*, Starprint Gráfica e Editora, Brasília 2006.
- [24] Ribeiro, S. G., Martin, D. P., Lacorte, C., Simões, I. C. et al., Molecular and biological characterization of *Tomato chlorotic mottle virus* suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. *Phytopathology* 2007, *97*, 702–711.
- [25] Bucher, E., Hemmes, H., de Haan, P., Goldbach, R., Prins, M., The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J. Gen. Virol.* 2004, *85*, 983–991.
- [26] Mot, R. D., Vanderleyden, J., Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* 1989, *35*, 960–967.
- [27] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996, *68*, 850–858.
- [28] Vanitharani, R., Chellappan, P., Pita, J. S., Fauquet, C. M., Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 2004, *78*, 9487–9498.
- [29] Selth, L. A., Randles, J. W., Rezaian, M. A., Host responses to transient expression of individual genes encoded by *Tomato leaf curl virus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2004, *17*, 27–33.
- [30] Wang, H., Buckley, K. J., Yang, X. J., Buchmann, R. C., Bisaro, D. M., Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J. Virol.* 2005, *79*, 7410–7418.
- [31] Voinnet, O., Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* 2005, *6*, 206–220.
- [32] Rawat, N., Himabindu, K., Neeraja, C. N., Nair, S., Bentur, J. S., Suppressive subtraction hybridization reveals that rice gall midge attack elicits plant-pathogen-like responses in rice. *Plant Physiol. Biochem.* 2012, *63*, 122–130.
- [33] Guimarães, P. M., Brasileiro, A. C., Morgante, C. V., Martins, A. C. et al., Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. *BMC Genomics* 2012, *13*, 387.
- [34] Howard, A. R., Heppler, M. L., Ju, H. J., Krishnamurthy, K. et al., Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves. *Virology* 2004, *328*, 185–197.

- [35] Krishnamurthy, K., Mitra, R., Payton, M. E., Verchot-Lubicz, J., Cell-to-cell movement of the PVX 12K, 8K, or coat proteins may depend on the host, leaf developmental stage, and the PVX 25K protein. *Virology* 2002, *300*, 269–281.
- [36] Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D. C., A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 2000, *103*, 157–167.
- [37] Verchot-Lubicz, J., A new cell-to-cell transport model for Potexviruses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2005, *18*, 283–290.
- [38] Atabekov, J. G., Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V. et al., Translational activation of encapsidated potato virus X RNA by coat protein phosphorylation. *Virology* 2001, *286*, 466–474.
- [39] Karpova, O. V., Arkhipenko, M. V., Zaiakina, O. V., Nikitin, N. A. et al., [Translational regulation of potato virus X RNA-coat protein complexes: the key role of a coat protein N-terminal peptide]. *Mol. Biol. (Mosk)* 2006, *40*, 703–710.
- [40] Koenig, R., Anomalous behavior of the coat proteins of potato virus X and cactus virus X during electrophoresis in dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels. *Virology* 1972, *50*, 263–266.
- [41] Bilgin, D. D., Zavala, J. A., Zhu, J., Clough, S. J. et al., Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell Environ.* 2010, *33*, 1597–1613.
- [42] Hariharan, T., Johnson, P. J., Cattolico, R. A., Purification and characterization of phosphoribulokinase from the marine chromophytic alga *Heterosigma carterae*. *Plant Physiol.* 1998, *117*, 321–329.
- [43] Chen, X., Yu, T., Xiong, J., Zhang, Y. et al., Molecular cloning and expression analysis of rice phosphoribulokinase gene that is regulated by environmental stresses. *Mol. Biol. Rep.* 2004, *31*, 249–255.
- [44] Soitamo, A. J., Jada, B., Lehto, K., Expression of geminiviral AC2 RNA silencing suppressor changes sugar and jasmonate responsive gene expression in transgenic tobacco plants. *BMC Plant Biol.* 2012, *12*, 204.
- [45] Soitamo, A. J., Jada, B., Lehto, K., HC-Pro silencing suppressor significantly alters the gene expression profile in tobacco leaves and flowers. *BMC Plant Biol.* 2011, *11*, 68.
- [46] Hennig, J., Herrmann, R., Chloroplast ATP synthase of spinach contains nine nonidentical subunit species, six of which are encoded by plastid chromosomes in two operons in a phylogenetically conserved arrangement. *Mol. Gen. Genet.* 1986, *203*, 117–128.
- [47] Adi, M., Jens, P., Brotman, Y., Mikhail, K. et al., Stress responses to *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) infection of resistant and susceptible tomato plants are different. *Metabolomics* 2012, *S1*, 006.
- [48] Chivasa, S., Tomé, D. F., Hamilton, J. M., Slabas, A. R., Proteomic analysis of extracellular ATP-regulated proteins identifies ATP synthase beta-subunit as a novel plant cell death regulator. *Mol. Cell Proteomics* 2011, *10*, M110.003905.
- [49] Chivasa, S., Ndimba, B. K., Simon, W. J., Lindsey, K., Slabas, A. R., Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability. *Plant Cell* 2005, *17*, 3019–3034.
- [50] Andleeb, S., Amin, I., Bashir, A., Briddon, R. W., Mansoor, S., Transient expression of β C1 protein differentially regulates host genes related to stress response, chloroplast and mitochondrial functions. *Viro. J.* 2010, *7*, 373.
- [51] David, P., des Francs-Small, C. C., Sévignac, M., Thareau, V. et al., Three highly similar formate dehydrogenase genes located in the vicinity of the B4 resistance gene cluster are differentially expressed under biotic and abiotic stresses in *Phaseolus vulgaris*. *Theor. Appl. Genet.* 2010, *121*, 87–103.
- [52] Kusano, T., Tateda, C., Berberich, T., Takahashi, Y., Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death. *Plant Cell Rep.* 2009, *28*, 1301–1308.
- [53] Glaser, E., Sjöling, S., Tanudji, M., Whelan, J., Mitochondrial protein import in plants. Signals, sorting, targeting, processing and regulation. *Plant Mol. Biol.* 1998, *38*, 311–338.
- [54] Satoh, K., Kondoh, H., Sasaya, T., Shimizu, T. et al., Selective modification of rice (*Oryza sativa*) gene expression by rice stripe virus infection. *J. Gen. Virol.* 2010, *91*, 294–305.
- [55] Beffa, R. S., Hofer, R. M., Thomas, M., Meins, F., Decreased susceptibility to viral disease of [beta]-1,3-glucanase-deficient plants generated by antisense transformation. *Plant Cell* 1996, *8*, 1001–1011.
- [56] Babu, M., Gagarinova, A. G., Brandle, J. E., Wang, A., Association of the transcriptional response of soybean plants with soybean mosaic virus systemic infection. *J. Gen. Virol.* 2008, *89*, 1069–1080.
- [57] Verma, D. P., Hong, Z., Plant callose synthase complexes. *Plant Mol. Biol.* 2001, *47*, 693–701.
- [58] Herbers, K., Tacke, E., Hazirezaei, M., Krause, K.-P. et al., Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. *Plant J.* 1997, *12*, 1045–1056.
- [59] van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M., Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006, *44*, 135–162.
- [60] McKenzie, C. L., Shatters, R. G., Doostdar, H., Lee, S. D. et al., Effect of geminivirus infection and *Bemisia* infestation on accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 2002, *49*, 203–214.
- [61] Meldau, S., Baldwin, I. T., Wu, J., For security and stability: SGT1 in plant defense and development. *Plant Signal. Behav.* 2011, *6*, 1479–1482.
- [62] Zhang, M., Botër, M., Li, K., Kadota, Y. et al., Structural and functional coupling of Hsp90- and Sgt1-centred multi-protein complexes. *EMBO J.* 2008, *27*, 2789–2798.
- [63] Ye, C. M., Kelly, V., Payton, M., Dickman, M. B., Verchot, J., SGT1 is induced by the potato virus X TGBp3 and enhances virus accumulation in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant* 2012, *5*, 1151–1153.
- [64] Lozano-Durán, R., Rosas-Díaz, T., Luna, A. P., Bejarano, E. R., Identification of host genes involved in geminivirus infection using a reverse genetics approach. *PLoS One* 2011, *6*, e22383.

- [65] Newman, J. W., Morisseau, C., Hammock, B. D., Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog. Lipid. Res.* 2005, *44*, 1–51.
- [66] Zhou, L., Duan, J., Wang, X. M., Zhang, H. M. et al., Characterization of a novel annexin gene from cotton (*Gossypium hirsutum* cv CRI 35) and antioxidative role of its recombinant protein. *J. Integr. Plant Biol.* 2011, *53*, 347–357.
- [67] Tunc-Ozdemir, M., Miller, G., Song, L., Kim, J. et al., Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2009, *151*, 421–432.
- [68] Andrawis, A., Solomon, M., Delmer, D. P., Cotton fiber annexins: a potential role in the regulation of callose synthase. *Plant J.* 1993, *3*, 763–772.
- [69] Konopka-Postupolska, D., Clark, G., Hofmann, A., Structure, function and membrane interactions of plant annexins: an update. *Plant Sci.* 2011, *181*, 230–241.
- [70] Levine, A. J., Hu, W., Feng, Z., The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ.* 2006, *13*, 1027–1036.
- [71] Yao, Y. X., Dong, Q. L., Zhai, H., You, C. X., Hao, Y. J., The functions of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene in growth and tolerance to cold and salt stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 2011, *49*, 257–264.
- [72] Barthet, M. M., Hilu, K. W., Expression of matK: functional and evolutionary implications. *Am. J. Bot.* 2007, *94*, 1402–1412.
- [73] Garavaglia, B. S., Thomas, L., Zimaro, T., Gottig, N. et al., A plant natriuretic peptide-like molecule of the pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. citri causes rapid changes in the proteome of its citrus host. *BMC Plant Biol.* 2010, *10*, 51.
- [74] Zheng, X. M., Moncollin, V., Egly, J. M., Chambon, P., A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). *Cell* 1987, *50*, 361–368.
- [75] Brockstedt, E., Otto, A., Rickers, A., Bommert, K., Wittmann-Liebold, B., Preparative high-resolution two-dimensional electrophoresis enables the identification of RNA polymerase B transcription factor 3 as an apoptosis-associated protein in the human BL60–2 Burkitt lymphoma cell line. *J. Protein Chem.* 1999, *18*, 225–231.
- [76] Yang, K. S., Kim, H. S., Jin, U. H., Lee, S. S. et al., Silencing of NbBTF3 results in developmental defects and disturbed gene expression in chloroplasts and mitochondria of higher plants. *Planta* 2007, *225*, 1459–1469.
- [77] Huh, S. U., Kim, K. J., Paek, K. H., Capsicum annuum basic transcription factor 3 (CaBtf3) regulates transcription of pathogenesis-related genes during hypersensitive response upon tobacco mosaic virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, *417*, 910–917.
- [78] Ye, C., Dickman, M. B., Whitham, S. A., Payton, M., Verchot, J., The unfolded protein response is triggered by a plant viral movement protein. *Plant Physiol.* 2011, *156*, 741–755.
- [79] Lu, D. P., Christopher, D. A., Endoplasmic reticulum stress activates the expression of a sub-group of protein disulfide isomerase genes and AtbZIP60 modulates the response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics* 2008, *280*, 199–210.
- [80] Pedrazzini, E., Giovinazzo, G., Bollini, R., Ceriotti, A., Vitale, A., Binding of BiP to an assembly-defective protein in plant cells. *Plant J.* 1994, *5*, 103–110.
- [81] Lee, A. S., The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem. Sci.* 2001, *26*, 504–510.
- [82] Krenz, B., Windeisen, V., Wege, C., Jeske, H., Kleinow, T., A plastid-targeted heat shock cognate 70 kDa protein interacts with the Abutilon mosaic virus movement protein. *Virology* 2010, *401*, 6–17.
- [83] Noël, L. D., Cagna, G., Stuttmann, J., Wirthmüller, L. et al., Interaction between SGT1 and cytosolic/nuclear HSC70 chaperones regulates arabidopsis immune responses. *Plant Cell Online* 2007, *19*, 4061–4076.
- [84] Komatsu, K., Hashimoto, M., Ozeki, J., Yamaji, Y. et al., Viral induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2010, *23*, 283–293.
- [85] Ahn, I. P., Kim, S., Lee, Y. H., Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiol.* 2005, *138*, 1505–1515.