

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – DARCY RIBEIRO

**ABORDAGEM PROTEÔMICA NA INVESTIGAÇÃO DOS
MECANISMOS DE DEFESA EM MARACUJÁ**

VIVIANE ABRANTES PERDIZIO

Campos dos Goytacazes - RJ

4 de julho de 2016

VIVIANE ABRANTES PERDIZIO

**ABORDAGEM PROTEÔMICA NA INVESTIGAÇÃO DOS
MECANISMOS DE DEFESA EM MARACUJÁ**

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutorado em Biociências e Biotecnologia.”

Orientadora: Dra. Tânia Jacinto Freitas da Silva

Campos dos Goytacazes – RJ

4 de julho de 2016

VIVIANE ABRANTES PERDIZIO

ABORDAGEM PROTEÔMICA NA INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE DEFESA EM MARACUJÁ

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutorado em Biociências e Biotecnologia.”

Tese aprovada em 4 de julho de 2016 por:

Dra. Claudia Ribeiro da Silva - UERJ

Dra. Fernanda Abreu Santana – UENF

Dra. Tatiana Santos Barroso - UENF

Dra. Tânia Jacinto – UENF (Orientadora)

Campos dos Goytacazes – RJ

4 de julho de 2016

” Andar com fé eu vou,
que a fé não costuma faiá”

Gilberto Gil

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai Oxalá e a todas entidades de luz que me acompanharam nessa jornada.

Aos meus pais Heloisa e José Luiz e ao meu irmão Vinicius pelo apoio incondicional ao longo desses anos morando longe.

A Dra. Claudia Ribeiro, Dra. Fernanda Santana e a Dra. Tatiana Barroso por aceitarem o convite para participar da banca, sendo um capítulo tão importante da minha vida.

À Dra. Beatriz Ferreira que aceitou ser a revisora da tese, e acompanha o desenvolvimento do trabalho desde a graduação.

À Dra. Tânia Jacinto pela orientação. Quase dez anos de convivência, nem sempre pacífica, mas que ao longo dos anos foi se mostrando importante para o meu amadurecimento tanto pessoal quanto profissional.

À Dra. Olga Machado e a técnica Jucélia Araújo pela ajuda nos experimentos de isofocalização.

Ao Dr. Vanildo Silveira por permitir a utilização dos equipamentos da Unidade de Biologia Integrativa.

À Ellen e Ricardo por sempre me socorrem quando apareciam algumas dúvidas, seja em estatística, seja no ImageMaster.

Ao Dr. Jonas Perales, Dr. André Ferreira, a técnica Monique Nunes, a técnica Joelma Saldanha, a técnica Viviane Tostes e todos os outros integrantes do Laboratório de Tóxicologia da Fundação Oswaldo Cruz. Onde fui muito bem recebida e auxiliada para a realização dos experimentos de espectrometria de massas.

A todos os colegas de bancada que fiz ao longo desses anos (Bruno, Sylvio, Clara, Carla, Christiane, Stéfanie, Keitty, Thiara, Tereza, Auana, Maryna, Nina, Gabriel) e em especial a Dâlvania Pinho Domingues.

A todos do Laboratório de Biotecnologia, em especial à técnica Patrícia Cezário, técnica Rivea Rodrigues e a técnica Telma Aguiar, pelo apoio e os conselhos tanto pessoais, quanto profissionais.

A CAPES, CNPq e a FAPERJ por possibilitarem financeiramente a realização desse trabalho.

Sumário

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Objeto de Estudo: Maracujá.....	5
1.2. Defesa Vegetal.....	6
1.3. Proteômica	11
PRIMEIRO CAPÍTULO	13
PROTEOMICA COMPARATIVA DE FOLHAS DE MARACUJÁ TRATADAS COM METIL JASMONATO	13
1. Objetivo.....	20
2. Materiais e Métodos	20
2.1. Material vegetal	20
2.2. Tratamento com MeJa	20
2.3. Extração de Proteínas	20
2.4. Quantificação proteica.....	21
2.5. Eletroforese, coloração e análise de imagem.....	21
2.6. Digestão de proteínas <i>in-gel</i> , MALDI TOF-TOF.....	22
2.7. Rede de interação de proteínas STRING.....	23
3. Resultados e Discussão.....	23
4. Conclusão	42
SEGUNDO CAPÍTULO	44
MAPEAMENTO PROTEOMICO DA POLPA DE MARACUJÁ	44
1. Objetivo.....	45
2. Materiais e Métodos	45
2.1. Material Vegetal	45
2.2. Extração de proteínas	45
2.3. Quantificação proteica.....	45
2.4. Eletroforese, coloração e análise de imagem.....	46
2.5. Digestão de proteínas <i>in-gel</i> , MALDI TOF-TOF.....	46
3. Resultados e Discussão.....	47
4. Conclusão	55
Referencias.....	57

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Passiflora edulis</i> Sims, conhecido popularmente como maracujá azedo.	6
Figura 2. Co-evolução entre planta e patógeno.	7
Figura 3. Folhas de maracujá atacadas por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	8
Figura 4. Os papéis da interconexão entre peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂), óxido nítrico (NO) e ácido salicílico (AS) na ativação e coordenação de múltiplas reações de defesa da planta.	9
Figura 5. Rota de Biossíntese do Ácido Jasmônico.	10
Figura 6. Géis representativos de proteínas de folhas tratadas com MeJa em 24 e 48 h.	19
Figura 7. Exemplos de spots expressos diferencialmente em folhas expostas ao MeJa.....	20
Figura 8. Categorização funcional de proteínas identificadas em folhas de maracujá..	37
Figura 9. Análise das interações entre proteína-proteína de proteínas identificadas em folhas de maracujá após o tratamento com MeJa.....	38
Figura 10. Gel representativo de proteínas totais da polpa de maracujá utilizando uma faixa de pH 3-10.....	48
Figura 11. Gel representativo de proteínas da polpa de maracujá utilizando uma faixa de pH 4-7.	49
Figura 12. Categorização funcional das proteínas identificadas em polpa de maracujá, baseadas no Blast2GO.	544

Índice de Tabela

Tabela 1 Proteínas diferencialmente expressas em folhas de maracujá identificadas por MALDI-TOF-TOF	22
Tabela 2 Abreviação dos nomes das proteínas identificadas que possuem interação proteína-proteína por STRING 10	39
Tabela 3 Proteínas diferencialmente expressas em polpa de maracujá identificadas por MALDI TOF-TOF	50

Abreviaturas

- ACX** - Acil-coenzima A-oxidase
- AJ** – Ácido jasmonico
- AS** – Ácido salicílico
- α -LeA** - α -linoleico
- AOS** – Aleno óxido sintase
- AOC** - Aleno óxido ciclase
- APX** - Ascorbato peroxidase
- DHA** - Dehidroascorbato
- ETI** - *Effector-Triggered Immunity*
- Hamps** - *Herbivory associated molecular patterns*
- LeA** - Ácido linolênico
- LOX** - Lipoxigenase
- MDA** - Monodehidroascorbato
- MALDI** - Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
- MeJa** - Metil Jasmonato
- OPDA** - Ácido AJ- oxofitodienoico
- PAMPs** - *Pathogen Associated Molecular Patterns*
- PRRs** - *Pattern Recognition Receptors*
- RH** - Resposta de Hipersensibilidade
- RSA** - Resistência Sistêmica Adquirida
- TOF-TOF** – *Time of fly*, em sequência
- 13-HPOTE**- Ácido 13-(s) – hidroperoxioctadecatrienoide

RESUMO

O maracujá é uma frutífera da família Passifloraceae, pertencendo ao gênero *Passiflora*, possuindo aproximadamente 150 espécies nativas brasileiras. Dentre elas, a mais comercializada é a espécie *Passiflora edulis* Sims, comumente conhecida como maracujá azedo ou maracujá amarelo. Devido o Brasil apresentar um clima tropical, o cultivo dessa fruta é observado em todo território nacional, o que faz o país ser um dos maiores produtores mundiais. Contudo, essa planta sofre com inúmeros ataques de patógenos e insetos. Logo, estudos relacionados aos mecanismos de defesa dessa planta para suportar esses ataques são de suma importância, uma vez que eles atuam diretamente reduzindo a produção de frutos dessa planta. Com o objetivo de estudar os mecanismos de defesa desta cultura tropical, uma abordagem proteômica foi utilizada para investigar os perfis de proteínas (2D-PAGE) de folhas expostas ao metil-jasmonato (MeJa) durante 24 e 48 h. Nossa análise proteômica foi estendida às proteínas acumuladas naturalmente na polpa da fruta, concentrando-se naquelas possivelmente relacionadas a condições de estresse. A partir de 326 spots diferencialmente expressos em folhas um total de 76 proteínas foram identificadas pela tecnologia de espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF). Destas, 9 proteínas foram induzidas após ao tratamento com MeJa, enquanto a maioria das proteínas (67) diminuíram. Uma proteína apresentou padrão diferente de resposta durante o tempo testado, a Glutathione S-Transferase, a qual sua tradução não é observada no tempo de 24h, porém ao final de 48h ela apresenta um nível de acumulação maior inclusive ao apresentado pelas plantas controles. Proteínas identificadas em folhas, incluem aquelas associadas com a resposta ao estresse, à morte celular, metabolismo e formação de pétala e sépala. Em polpa, um total de 128 proteínas foram detectadas por 2D-PAGE, sendo identificadas 71. Dezoito por cento das proteínas foram relacionadas com a resposta ao stress, sendo esta a segunda categoria mais abundante, outras proteínas foram relacionadas com o processo metabólico. Logo, conclui-se que a utilização de MeJa no tratamento de folhas de maracujá modula diversas proteínas com distintas funções, como as de defesa vegetal; sendo essas também encontradas na polpa da fruta, principalmente ligadas a resposta a hipersensibilidade.

Palavras-chave: defesa celular; jasmonato; maracujá; proteômica; resposta a estresse

ABSTRACT

Passion fruit is a fruit of the Passifloraceae family, genus *Passiflora*, with approximately 150 Brazilian native species. Among them, the most commercialized is *Passiflora edulis* Sims species. Because Brazil experiences a tropical climate, the cultivation of this fruit is observed throughout the country, which makes the country is one of the largest producers. However, this plant suffers from numerous pathogens and insect attacks. Therefore, studies related to this plant defense mechanisms to support these attacks are of paramount importance, since they act directly reducing the production of fruit of this plant. In order to study defense mechanisms of tropical crop, a proteomic approach was used to investigate the protein profiles (2D-PAGE) sheets exposed to methyl jasmonate (MeJA) for 24 and 48 h. Our proteomic analysis was extended to proteins accumulated naturally in fruit pulp, concentrating on those possibly related to stress conditions. From 326 spots differentially expressed in leaves a total of 76 proteins were identified by mass spectrometry technology (MALDI-TOF-TOF). Of these, 9 proteins were induced after treatment with MeJA, while most proteins (67) decreased. A standard protein showed different response during the time tested, Glutathione S-Transferase, which the translation is not observed in the time of 24 hours, but at the end of 48 hours it has a higher accumulation level even when presented by the control plants. Proteins identified in leaves include those associated with the stress response, cell death, metabolism and sepal and petal formation. In pulp, a total of 128 proteins were detected by 2D-PAGE, identified 71. Eighteen percent of the proteins were linked to the stress response, which is the second most abundant class, other proteins have been linked to the metabolic process. Therefore, it is concluded that the use of MeJA in of passion fruit leaves modulate diverse proteins with diverse functions, as of vegetal defense; These are also found in the fruit pulp, mainly linked to the response to hypersensitivity

Keywords: cell defense; jasmonate, passion fruit; proteomic; stress related

1. INTRODUÇÃO

1.1. Objeto de Estudo: Maracujá

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae, gênero *Passiflora*, e é caracterizado por uma ampla diversidade morfológica, compreendendo cerca de 530 espécies, sendo que, aproximadamente, 150 são nativas do Brasil (Cervi, 1997; Rodrigues *et al.*, 2013). O maracujá se destaca entre as frutíferas por apresentar um aroma e sabor exótico, além de ser uma fonte de vitamina C, cálcio e fósforo, e, por possuir compostos bioativos com propriedades terapêuticas, tais como glicosídeos, alcaloides e compostos fenólicos (Dhawan *et al.*, 2004). Essa frutífera encontra condições ideais ao seu cultivo em clima tropical, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais, com 1 milhão de toneladas, tendo uma produtividade média de 14 ton/ha/ano (IBGE, 2015).

Os cultivos comerciais no país se baseiam apenas na espécie *Passiflora edulis* Sims (figura 1), mais conhecida como maracujá amarelo ou azedo, sendo 95% dos pomares constituídos dessa espécie, a qual a maior parte da produção é destinada ao mercado de suco *in natura* (Meletti *et al.*, 2001). O mercado internacional demonstra ter bastante interesse em frutas tropicais, incluindo o maracujá, uma vez que possui grande apelo comercial, não só pelo seu sabor peculiar, como também por possuir propriedades funcionais a alimentação humana (Andrigueto *et al.*, 2002).

A colheita é realizada com o fruto ainda verde próximo ao pedúnculo, possuindo coloração uniforme, boa aparência e tamanho grande (Coelho *et al.*, 2011). Para a indústria de polpa, os frutos devem apresentar bom rendimento de polpa, alta acidez, coloração do suco amarelo dourado e alto teor de sólidos solúveis totais. Já para o mercado de frutas frescas, os frutos devem ser grandes e ovais (Zaccheo *et al.*, 2012), porém possuem uma vida útil pós-colheita curta, apresentando redução da composição de açúcares do conteúdo de sua polpa por volta de 10 dias (Trentin *et al.*, 2012).

Contudo, não é só a pós-colheita que preocupa os agricultores. O maracujá sofre diversos danos devido a ataque de muitos predadores, dos quais se destacam larvas de lepidópteros que atuam diretamente nas folhas; abelhas marapuás ou melíferas, que atacam diretamente as flores (figura 1A) e as moscas-das-frutas, que vão interagir com os frutos. Esses insetos atuam reduzindo a área foliar, abrindo brechas para outros patógenos atacarem; a queda das flores; e a murcha dos frutos antes de sua maturação (Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2016). Para contornar essas adversidades ambientais, as plantas possuem diversas estratégias de defesa; tanto a nível estrutural, como a nível molecular.



Arquivo pessoal

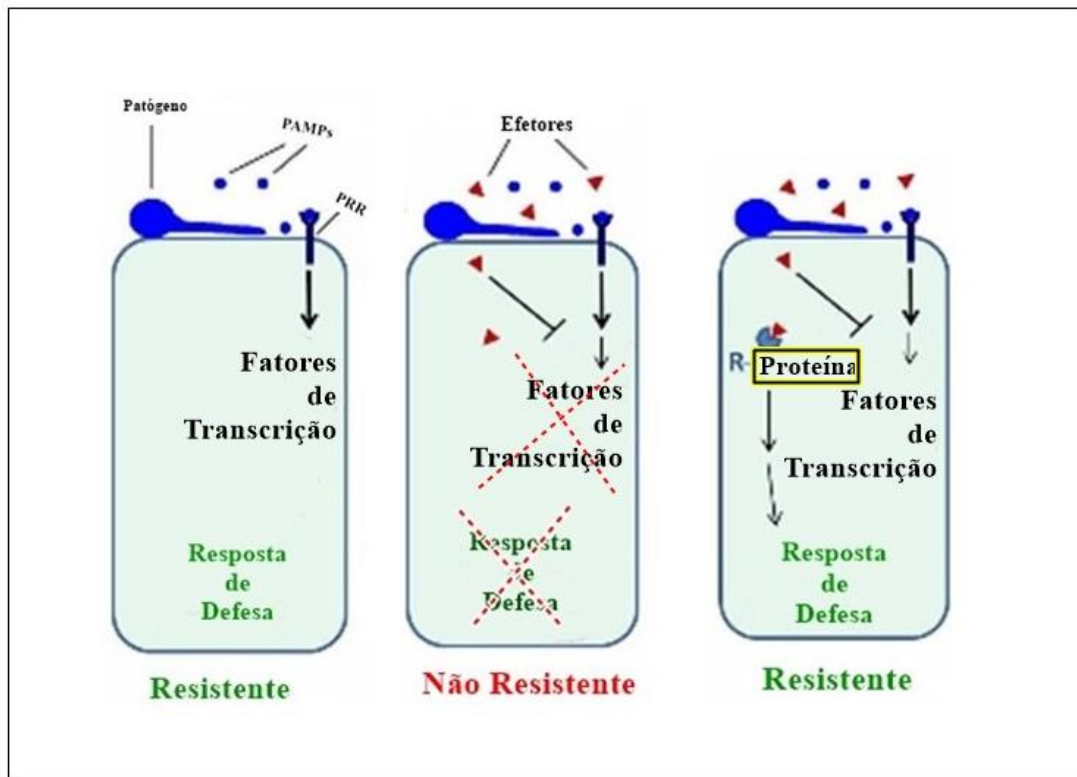
Figura 1. *Passiflora edulis sims*, conhecido popularmente como maracujá azedo. A figura A demonstra as flores dessa espécie, e B o fruto.

1.2. Defesa Vegetal

As plantas respondem a estímulos ambientais através da ativação de redes de moléculas de sinalização, que por sua vez desencadeiam a vias complexas de transdução que conduzem a uma resposta fisiológica apropriada. Entre as moléculas de sinalização fundamentais, jasmonatos são conhecidos por modular o comportamento biológico em direção a estímulos bióticos / abióticos, bem como o desenvolvimento. Tal característica tornou os jasmonatos excelentes ferramentas para induzir diferentes tipos de respostas fisiológicas em sistemas vegetais (Dueckershoff *et al.*, 2008; Botelho-Júnior *et al.*, 2014).

Como a planta é um ser vivo sésil, para que ela possa se defender de diversos tipos de ataque, ela necessita de mecanismos específicos de resposta. No caso para a Resposta de Hipersensibilidade, esse mecanismo começa com o reconhecimento dos PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) através de receptores específicos, os PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). No entanto, os patógenos conseguiram contornar esse tipo reconhecimento, suprimindo o reconhecimento dos PAMPs (Dröge, 2002). Porém, como tudo na natureza tende a se adaptar e co-evoluir, as plantas adquiriram receptores adicionais conhecidos por R (figura 2). Esses receptores, reconhecem moléculas efetoras desses

patógenos e desencadeiam uma resposta chamada ETI (*Effector-Triggered Immunity*), que atuam na Resposta de Hipersensibilidade (figura 2) em plantas (Pandey *et al.*, 2016).



Adaptado de Dalio, 2013

Figura 2. Co-evolução entre planta e patógeno. Observamos que mesmo após o patógeno ludibriar a planta através de efetores, a planta conseguiu promover mecanismos adicionais, os receptores R, para que conseguisse burlar o patógeno e assim promover a resposta de defesa.

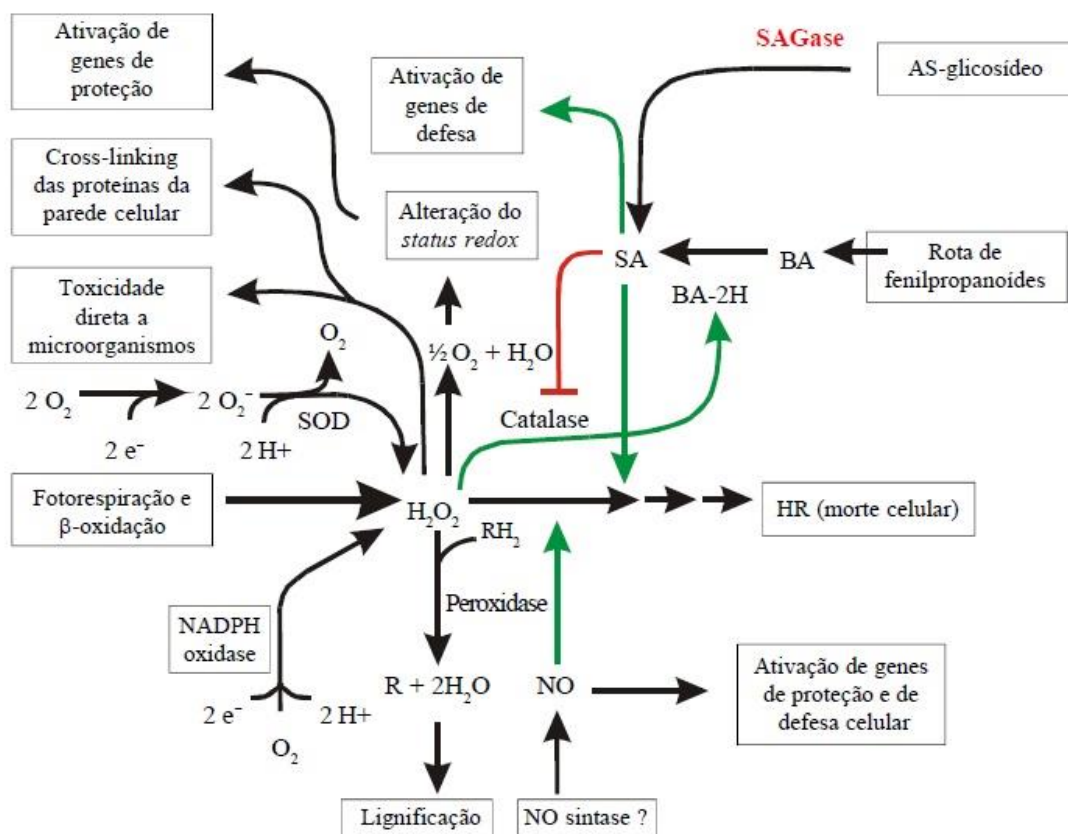
Ao perceber que está sendo atacada, através dos receptores, a planta desencadeia uma resposta local a infecção. Esse ato promove uma grande liberação de oxigênios reativos que vão atuar na RH (figura 3) e na Resistência Sistêmica Adquirida (RSA). A RH se caracteriza como uma necrose no tecido atacado, tendo como objetivo conter e matar o patógeno. Juntamente a esse processo, os PAMPs e ETIs aumentam a concentração de cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma, e esse aumento leva à produção de ácido salicílico (AS) e do ácido jasmonico (AJ) (Cavalcante *et al.*, 2013).



Halfeld-Vieira & Nechet, 2006

Figura 3. Folhas de maracujá atacadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. A. início da infecção onde observa-se o início de um clorose na folha. B. a resposta de hipersensibilidade, onde observa-se a necrose local no tecido infectado.

Os oxigênios reativos formados após o ataque, acumulados em grande quantidade, tornam-se tóxicos à célula, reagindo e provocando redução de atividades enzimáticas, aumentando a permeabilidade da membrana plasmática, e ainda interagindo com o DNA, ocasionando mutações. Como forma de controlar esses excessos, a planta criou mecanismos para a detoxificação das células, baseados em enzimas. Essas proteínas removem os oxigênios reativos, cada uma de uma forma distinta (figura 4). O primeiro exemplo dessas proteínas é a superóxido desmutase, ela catalisa a desmutação do O_2^- e HO_2^+ a H_2O_2 e podem estar ligadas a um metal (Cu/Zn, Fe e Mn); em seguida o ciclo do ascorbato/glutationa, onde o H_2O_2 é reduzido e removido da célula pela ascorbato peroxidase (APX) através do ascorbato redutor, formando o radical monodehidroascorbato (MDA), que por sua vez irá dismutar para dehidroascorbato (DHA) e ascorbato. Uma outra enzima é a catalase, que é responsável em converter H_2O_2 em H_2O e O_2 , sendo inibida por ácido salicílico (Resende *et al.*, 2003)



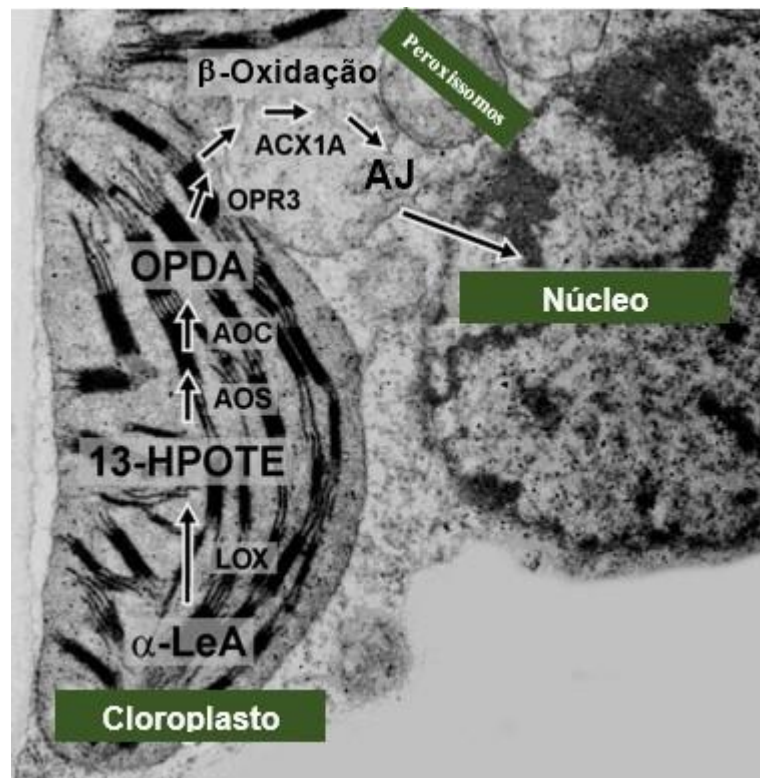
Adaptado de Hammond-Kosack & Jones, 2000.

Figura 4. Os papéis da interconexão entre peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico (NO) e ácido salicílico (AS) na ativação e coordenação de múltiplas reações de defesa da planta. BA: ácido benzóico; BA-2H: ácido benzóico 2-hidrolase; SA: ácido salicílico; SAGase: ácido salicílico glicosiltransferase; SOD: superóxido dismutase.

Não é apenas por patógenos que as plantas são atacadas, elas sofrem vários prejuízos provocados por insetos. Assim, como possuem receptores que reconhecem os patógenos, elas também possuem mecanismos para a detecção de herbívoros. Os padrões moleculares associados a herbívoros, Hamps (*Herbivory associated molecular patterns*), possuem uma atuação parecida com as dos PAMPs, onde as plantas distinguem o ataque e assim ativam uma resposta de defesa mais específica. Essa resposta desencadeia a biossíntese do jasmonato; que por sua vez controla a biossíntese de metabólitos de defesa, que promovem a resistência da planta ao ataque de herbívoros (Kästner *et al.*, 2014).

Após os receptores reconhecerem os Hamps, há o recrutamento de sisteminas, e essas por sua vez, ativam fosfolipases do tipo 2, que atuam liberando ácidos graxos poli-

insaturados da membrana do cloroplasto. Esses ácidos graxos conhecidos como ácido linolênico (LeA) e α -linoleico (α -LeA) possuem a composição de 18 carbonos, originando um dos nomes de como essa via biossintética é conhecida, Via do Octadecanóide. Quando essas moléculas se encontram livres da membrana, ocorre a atuação da enzima lipoxigenase (LOX). Essa proteína é classificada como de importância vital para a síntese de ácido jasmônico nas primeiras horas de ferimento (Schommer *et al.*, 2008; Glauser *et al.*, 2009). Essa via é também conhecida como Via das Oxilipinas, e ela continua após a atuação da LOX na formação de hidroperóxidos, para a formação ao final de AJ, o hidroperóxido sofre a ação da aleno óxido sintase (AOS) (Feussner & Wasternack, 2002). Em sequência ocorre a atuação da aleno óxido ciclase (AOC), realizando reações subsequentes gerando o OPDA (ácido AJ- oxofitodienpoico), que é transferido para o peroxissoma, através de transportadores de membranas peroxissomal. Dentro dessa organela, o composto sofre a ação de uma redutase OPR (OPDA redutase), e depois de três rodadas de β -oxidação realizada pela acil-coenzima A-oxidase (ACX), o AJ é sintetizado e segregado ao citosol (figura 5).



Adaptado de Wasternack, 2007

Figura 5. Rota de Biossíntese do Ácido Jasmônico. A figura mostra através de uma microscopia, a localização e os processos da Via das Oxilipinas até a formação do ácido jasmônico e sua atuação no núcleo da célula.

Após sua síntese e seu encaminhamento para o citosol, o ácido jasmonico é encaminhado para diversos processos fisiológicos distintos, dentre eles a ativação de inibidores de proteinase. Esses inibidores vão atuar diretamente no intestino dos insetos, promovendo a redução do seu desenvolvimento como demonstrado por Botelho-Júnior *et al.*, (2014), reduzindo assim suas capacidades de predação.

Logo, para uma análise mais ampla de todas as proteínas envolvidas e suas funções biológicas a utilização de técnicas de proteômica é a mais indicada. Essa técnica permite analisar um grande número de proteínas, através da obtenção de mapas proteicos, que são comparados ao longo dos diversos tratamentos, além de permitir identificar em quais funções biológicas essas proteínas estão inseridas.

1.3. Proteômica

Proteoma é o termo coletivo para todas as proteínas traduzidas a partir do material genético da célula em um tecido específico. A expressão proteômica está no estabelecimento de mapas quantitativos do acúmulo de proteínas sob a sua função fisiológica ou nas condições de desenvolvimento do ser em estudo. Por outro lado, temos a proteômica funcional, que se concentra no papel individual de cada proteína e suas interações com outros ligantes, incluindo outras proteínas (Barrett *et al.*, 2005; Sugiyama, 2015).

Atualmente, essa abordagem é de grande prestígio na estratégia de analisar a complexidade de proteínas, em detrimento a estímulos do ambiente, desenvolvimento de tecidos específicos ou até mesmo da composição proteica de uma parte do organismo. Essa análise em tecidos e órgãos vegetais pode ser dificultada devido a grande quantidade de interferentes presentes nesses tecidos, como compostos fenólicos, pigmentos, compostos da parede celular entre outros (Fang *et al.*, 2015). Porém isso não inviabiliza o estudo, como demonstrado na área de defesa vegetal, onde a análise proteômica é dada em estudos que evidenciam as alterações dos perfis proteicos de plantas após um determinado estímulo, como ataque de patógenos e herbívoros. Experimentos realizados por Liao *et al.*, (2009), identificaram diferentes proteínas em folhas de arroz, envolvidas na resposta de defesa vegetal contra eliciadores. Já Alvarez *et al.*, (2009), descreveram diferentes proteínas que sofreram redox após o tratamento com metil jasmonato em *Arabidopsis*.

A eletroforese bidimensional (2D-PAGE) continua a ser uma importante técnica utilizada para separação de proteínas e muito utilizada em trabalhos envolvendo plantas. As proteínas obtidas dos extratos do material de interesse são separadas com base no ponto isoelétrico e

massa molecular de cada uma das proteínas. Em seguida elas são detectadas, por diferentes métodos de coloração como prata, coomassie blue ou com compostos fluorescentes. Dependendo do tamanho do gel e do gradiente de pH, é possível observar mais de 5000 proteínas (Bodzon-Kulakowska *et al.*, 2007, Witzel *et al.*, 2015). Outro fator importante para o estudo de proteoma são os espectrômetros de massa, responsáveis pelo seqüenciamento das proteínas fragmentadas por digestão enzimática. Após a obtenção dos fragmentos trípticos e sua leitura pelo espectrômetro, a sequência obtida é comparada com as sequências encontradas nos bancos de dados, facilitando, assim, a identificação da proteína de interesse. Logo, escolheu-se essa metodologia para realizar os estudos das proteínas foliares moduladas em resposta ao tratamento com MeJa e a composição proteica da polpa de maracujá, uma vez que ela já foi estabelecida por Perdizio *et al.* (2015) e se mostrou muito eficaz ao analisar o perfil total de proteínas presentes nos tecidos foliares de maracujá.

**PROTEOMICA COMPARATIVA DE FOLHAS DE MARACUJÁ TRATADAS
COM METIL JASMONATO**

1. Objetivo

- Identificar as proteínas moduladas em resposta ao tratamento com MeJa nos períodos de 24 e 48h;
- Analisar a quais ramos da defesa vegetal as proteínas identificadas se encontram;
- Analisar quais funções biológicas sofrem alterações em resposta ao tratamento com MeJa nos períodos de 24 e 48h.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material vegetal

As sementes foram adquiridas de frutos comprados em mercado local, na região de Campos dos Goytacazes. Elas foram germinadas em vermiculita, até o surgimento dos cotilédones. Após, foram transferidas para solo (Substrato Orgânico Mococa - SP), onde permanecem por cerca de vinte dias, em câmara de crescimento com fotoperíodo de 17 horas de luz, com intensidade de $300 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 28°C (Botelho-Júnior *et al.*, 2014).

2.2. Tratamento com MeJa

Para a exposição aos vapores de MeJa, as plantas de maracujá foram mantidas em recipientes de vidro, devidamente lacrados, com $3 \mu\text{L}$ de MeJa 95% em algodão conforme metodologia descrita por Farmer & Ryan (1990). Os recipientes com as plantas são mantidos, nas primeiras 24 horas sob iluminação constante. Para os tratamentos de 48h, após as primeiras 24h, a planta retorna para a condição da câmara de crescimento

2.3. Extração de Proteínas

Foram realizadas três extrações para cada tratamento (controle, 24 e 48h). As folhas foram maceradas em N_2 líquido até se tornar um pó fino, 10% (p/p) PVPP foi adicionado as proteínas extraídas em banho de gelo com 3 mL de tampão de extração (0,5 M de Tris-HCl pH 7,5, 50 mM de EDTA, 2% β -mercaptoetanol 0,7 M e sacarose) para cada grama de folha fresca. Após centrifugação a 10.000 g (4°C) durante 15 min, o sobrenadante foi recolhido e um volume igual de fenol saturado com água foi adicionado (Perdizio *et al.*,

2015). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g (4 ° C) e a camada de fenol foi recolhida. Em seguida, a fase fenólica foi extraída mais duas vezes com o tampão de extração descrito acima. A precipitação das proteínas foi realizada através da adição de cinco volumes (v / v) de acetato de amônio 0,1 M em metanol em 16h de incubação a -20°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g (4 ° C) durante 5 minutos. Os sedimentos foram lavados três vezes com 0,1 M de acetato de amônio em metanol e uma vez com acetona 100%. Os precipitados foram secos a temperatura ambiente e solubilizados em tampão para focalização isoeletrica (7 M de ureia, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 1% p / v de DTT, 2% de anfólitos, pH 4-7 e 0,2% de azul de bromofenol). Os materiais insolúveis foram removidos por centrifugação. Os sobrenadantes foram coletados para quantificação de proteínas e análise 2D.

2.4. Quantificação proteica

As concentrações de proteína foram determinadas utilizando 2-D kit Quant (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

2.5. Eletroforese, coloração e análise de imagem

Para cada extração foram realizados três géis 2D-PAGE, totalizando ao final do experimento 21 géis. Os quais foram obtidos da seguinte maneira. Quantidades iguais de proteína (500 µg) foram utilizadas na focalização isoeletrica (primeira dimensão). A focalização (tiras de IPG, 18 cm de comprimento, de pH 4-7, Immobiline™ DryStrip GE Healthcare) foi realizada utilizando IPGfor (GE Healthcare) seguindo os parâmetros: (1) 50 V (600 Vh); (2) 200 V (200 Vh); (3) 500 V (500 Vh); (4) 1000 V (1000 Vh); (5) gradiente de 4000 V (5000 Vh); (6) gradiente de 8000 V (6000 Vh); (7) 8000 V (54000 Vh); (8) 100 V (600 Vh). Em seguida, as proteínas foram reduzidas com 1% p / v de DTT, durante 15 min e alquiladas com 2,5% p / v de iodoacetamida em 10 mL de tampão de equilíbrio (6 M de ureia, 30% glicerol, 2% de SDS, e 50 mM de Tris-HCl, pH 8,8) durante 15 min. As tiras foram transferidas para géis com malha de 10% de poli(acrilamida), conforme descrito por Laemmli (1970). O SDS-PAGE (a segunda dimensão) foi realizada utilizando Protean II xi (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), com tampão para electroforese (250 mM Tris pH 8,4, 1,92 M de glicina e SDS a 1%) utilizando 25 mA por gel durante 6 h. Os géis foram corados com Coomassie coloidal azul (Schuster *et al.*, 1983). Em seguida foram digitalizados utilizando ImageScanner (GE Healthcare) e os dados foram analisados através do software ImageMaster 2D-Platinum, versão 7.0

(GE Healthcare) para discriminar os pontos (spots) de interesse. Os spots foram normalizados através do valor de ANOVA com $p \leq 0,05$. Os spots diferencialmente expressos foram analisados através de comparação entre os géis, onde os volumes individuais dos spots foram obtidos, seguindo as instruções do programa. O volume total válido expressa a abundância relativa dos spots (% vol), e os valores obtidos para controle, 24 e 48h de tratamento foram comparados utilizando o teste estatístico Student Newman-Keuls (SNK) (significância $p > 0,05$) utilizando o software estatístico R (Core, 2014) e o pacote easyanova (Arnhold, 2013), além de considerar valores a partir de 1,5 para a variação de volume entre os spots, permitindo identificar quais spots foram induzidos e quais foram reprimidos.

2.6. Digestão de proteínas *in-gel*, MALDI TOF-TOF

Os spots selecionados foram recolhidos e incubados em 25 mM de bicarbonato de amónio (Sigma-Aldrich), contendo 50% (v / v) de acetonitrila durante 16 h. Após descoloração, eles foram lavados com água deionizada e cobertos com 100% de acetonitrila; subsequentemente, foram secos em Speed-Vac (Savant Instruments, Inc., Farmingdale, NY) durante 15 min. Mais tarde, os spots foram re-hidratados em 50 mM de bicarbonato de amónio com tripsina 33 ng / μL (Promega, Madison, WI, EUA 228) durante 1 h em gelo. O excesso de solução foi removido e as amostras foram incubadas a 37 °C durante 20 h. Após, os péptidos foram extraídos com 30 μL de ácido fórmico a 5%, acetonitrila 50%. As amostras foram incubadas em ultrassom durante 10 min. Este processo foi repetido duas vezes, e em seguida foram concentradas em SpeedVac, para cerca de 10 μL . Posteriormente, realizou-se a dessalinização utilizando Zip-Tip (resina C18: P10 Millipore Corporation, Bedford, MA). Os péptidos foram eluídos a partir da coluna com 60% de acetonitrila 0,1% de ácido trifluoroacético. As soluções das amostras (0,3 μL) foram misturadas com um volume igual de uma solução da matriz de MALDI (R-ciano-4-hidroxicinâmico ácido (Aldrich, Milwaukee, WI) em 50% de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1%) na placa alvo e deixada secar à temperatura ambiente. Os dados de MS / MS foram adquiridos com uma granada de alumínio ítrio dopado com neodímio (Nd: YAG), com um ritmo de repetição de 200 Hz. Tipicamente, 1600 tiros foram acumulados para espectros no modo S, enquanto 3.000 tiros foram acumulados por espectros no modo de MS / MS. Seis dos sinais mais intensos de íons com uma relação sinal -ruído superior a 15, foram selecionados como precursores para a aquisição de MS

/ MS, com a exclusão dos picos da autólise da tripsina comum e os sinais iônicos da matriz. A calibração externa no modo de MS foi realizada utilizando uma mistura de quatro peptídeos: des-Arg1-Bradiquinina (m / z) 904,468; angiotensina I (m / z 1,296.685); GLU1 fibrinopeptídeo-B (m / z 1,570.677) e de ACTH (18_39) (m / z 2,465.199). Os espectros MS / MS foram calibrados externamente utilizando massas de íons de fragmento conhecidos, observados no espectro MS / MS de angiotensina I. Os resultados de MS / MS foram pesquisados contra o NCBI (base de dados) usando o software Mascot (www.matrixscience.com). Utilizando os parâmetros péptido tol. \pm a 100 ppm, tolerância de massa MS / MS de 0,6 Da carbamidometilação de cisteína (modificação fixo) e oxidação da metionina (modificação variável). As sequências de péptidos foram analisadas e validadas usando o software Scaffold^{3TM} utilizando a probabilidade de identificação do peptídeo de 90%. O banco de dados UniProt (www.uniprot.org) foi utilizado para nomear as proteínas que não tiveram sua nomenclatura indicada pelo Mascot e pelo Scaffold. A classificação funcional das proteínas identificadas foi realizada utilizando o programa Blast2go PROv. 3.1 (www.blast2go.com).

2.7. Rede de interação de proteínas STRING

As análises de interação proteína-proteína foram obtidas através do programa disponível publicamente STRING v. 10 (<http://string-db.org/>). O STRING é um banco de dados de interações conhecidas entre proteínas previsíveis, utilizando os dados obtidos da espectrometria de massas; comparado as proteínas identificadas em plantas controle e as plantas tratadas, traçando as relações entre elas. O modelo de interações utilizados do banco de dados do STRING foi a de *Arabidopsis thaliana*, que incluiu as relações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) apoiados por associações derivadas de quatro fontes: contexto genômico, experimentos de alto rendimento, co-expressão e de conhecimento prévio.

3. Resultados e Discussão

Em trabalhos realizados anteriormente com maracujá foram analisadas diferentes proteínas relacionadas com defesa, mais especificamente enzimas da via de biossíntese do ácido jasmônico, como a lipoxigenase, a óxido aleno sintase (Rangel *et al.*, 2002; Jardim *et al.*, 2010) Siqueira-Júnior *et al.*, 2008; e inibidores de proteases (Botelho-Junior

et al., 2008, Botelho-Junior *et al.*, 2014). Neste trabalho, a fim de aprofundar a compreensão sobre os mecanismos de defesa da planta foram analisadas as proteínas diferencialmente expressas em folha em resposta ao tratamento com MeJa.

A Figura 1, mostra géis representativos (2D-PAGE) de plantas controle e tratadas (24 e 48 h). As imagens digitalizadas dos géis foram examinadas pelo ImageMaster 2D-Platinum, software versão 7.0. Os critérios para definir se a proteína é estatisticamente modulada foram: i) os spots serem observados em três repetições de três experimentos independentes e ii) o volume individual dos spots de géis de plantas tratadas variar pelo menos 1,5 vezes em comparação com os do controle, sendo a figura 2 exemplos desses spots.

Com essa estratégia, foram selecionados num total de 326 spots após a análise pelo software ImageMaster. Eles foram retirados do gel, digeridos com tripsina e sujeitos a análise de espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF). A Tabela 1 mostra que desses 326 spots, foram identificadas 77 proteínas expressas diferencialmente em resposta à exposição a MeJa. Dessas, 9 proteínas foram identificadas como possuindo a capacidade de se acumularem após os tratamentos. São elas, duas lipoxigenases (spots 107 e 309, gi|499141108), uma superóxido desmutase [Fe] (spot 28, gi|159464723), uma cisteína sintase (spot 177, gi|223548214), uma proteína prevista (spot 76, gi|303289148), uma ribulose bifosfato carboxilase/ oxigenase activase (spot 212, gi|672124328), uma proteína relacionada com transporte (spot 170, gi|328879000), uma precursora de hordeína B1 (spot 142, gi|364506288) e uma proteína hipotética ARALYDRAFT_346243 (spot 183, gi|297824445). As quatro proteínas que não foram encontradas em géis de plantas controle foram chamados de "novos" (*New*). Com base no perfil de indução, as proteínas foram quantificadas de acordo com o seu comportamento de expressão: 1 proteína teve sua expressão aumentada durante as primeiras 24 h de tratamento e voltou ao nível basal em 48h (spot 76); 4 proteínas foram induzidas apenas em 48h (spots 28, 177, 142 e 183) e 4 proteínas apresentaram indução em ambos os períodos testados (spots 107, 309, 212, 170).

Porém o tratamento com MeJa também demonstrou que 67 proteínas sofreram uma redução na sua acumulação, sendo também quantificadas de acordo com o seu comportamento de acumulação: 5 proteínas foram reduzidas em 24h, mas retornaram aos níveis basais ao final de 48h (spots 173, 106, 292, 46 168); 7 proteínas tiveram suas expressões reduzidas apenas em 48h (spots 116, 189, 209, 251, 274, 244, 114); e 55 proteínas tiveram redução em ambos os tempos de tratamento.

Dois spots exibiam contrastante expressão, uma vez que reduziam suas expressões nas primeiras 24h, mas apresentaram indução após o tratamento em 48h. No entanto, apenas uma proteína foi identificada a P320666: glutathiona S-transferase (spot 149, gi|695044643), não tendo sendo caracterizada através do programa Blast2Go, sendo todas as proteínas encontradas localizam-se na tabela 1.

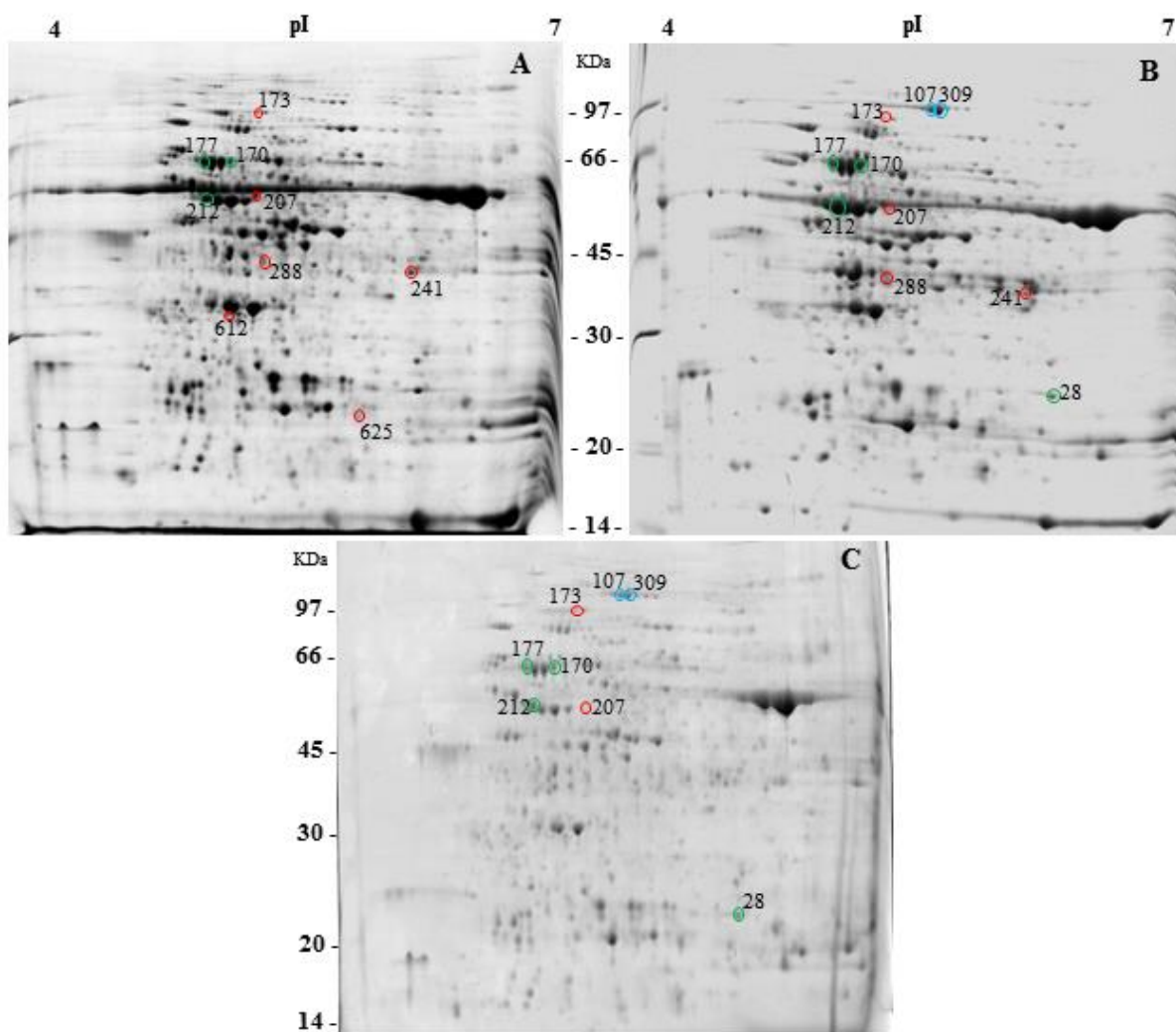


Figura 6. Géis representativos de proteínas foliares de maracujá tratadas com MeJa em 24 e 48 h. As amostras de proteínas totais (500 µg) foram focalizados em tiras de IPG (18 cm), em um gradiente de pH linear de 4-7, e separadas por SDS-PAGE (10%). A. Tratamento controle; B. Extrato de folhas tratadas com MeJa por 24h; C. Extratos foliares de plantas tratadas com MeJa por 48h. Os géis foram corados com Coomassie coloidal azul (Schuster *et al.*, 1983). Círculos azuis indicam spots que foram induzidos após os tratamentos (New); círculos verdes indicam spots que obtiveram uma

maior expressão após o tratamento (Up) e os círculos vermelhos spots que foram reduzidos (Down).

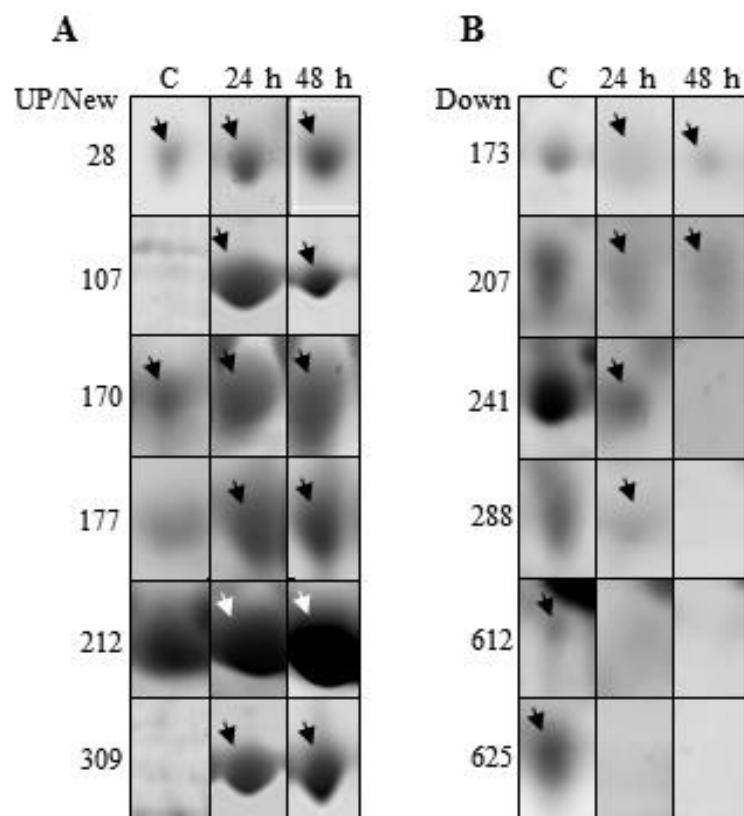


Figura 7. Exemplos de spots expressos diferencialmente em folhas de maracujá expostas ao MeJa. A. Exemplos de proteína acumuladas em resposta ao tratamento com MeJa. B. Proteínas que tiveram seu acúmulo reduzido em resposta ao MeJa.

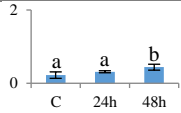
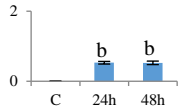
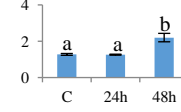
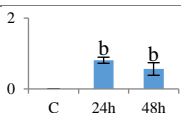
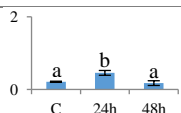
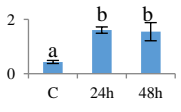
As proteínas induzidas foram classificadas em 5 categorias funcionais: 4 proteínas de defesa vegetal (45%), em vermelho na figura 8A (englobando os spots 28, 107, 177, 309), e os outros 3 na mesma faixa percentual. Morte celular (spot 212), processos metabólicos (spot 212) e transporte (spot 170) contando com 11% cada (Figura 3 A) e 2 proteínas não caracterizadas, (spots 142, 183) com 22%.

As proteínas com acúmulos reduzidos foram classificadas em categorias, com 10 papéis funcionais: Processos metabólicos (36%), sendo a maior categoria, seguida por 18% de fotossíntese, 11 % de resposta ao estresse, 6% processos biológicos, processos de

desenvolvimento e síntese proteica ambos com 3% cada, 2% de transporte sistema imunológico, formação de pétala e sépala e atividade de reserva de nutrientes com 1% cada, além dos 17% das proteínas que não foram categorizadas de acordo com o Blast2Go e apresentam a cor cinza na figura 8B. Ressalta-se que a indução por MeJa provocou a redução global do acúmulo de proteínas, sugerindo a diminuição de certas funções biológicas.

Após as devidas categorizações das proteínas identificadas, foi realizado uma avaliação sobre a integração entre elas através da base de dados STRING. As possibilidades de integração foram mostradas na figura 9, com as abreviaturas encontradas na tabela 2. Observa-se que as proteínas relacionadas com defesa se apresentam isoladas umas das outras, demonstrando que por mais que atuem num mesmo propósito, por serem transcritas através de estímulos diferentes não possuem ligação. Sugerindo que por mais que o metil jasmonato esteja presente em dois tipos de defesa (Via dos Octadecanóides e a Resposta de Hipersensibilidade) as proteínas integrantes desses dois processos identificadas, não possuem qualquer relação entre elas. Contudo, as proteínas relacionadas ao metabolismo e a fotossíntese apresentaram uma integração bastante significativa, o que já era esperado, uma vez que ambos os processos fisiológicos são intimamente relacionados.

Tabela 1- Proteínas diferencialmente expressas em folhas de maracujá identificadas por MALDI-TOF-TOF

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
New/Up								
Defesa Vegetal								
28	Superóxido dismutase [Fe]	gi 159464723	59	1	3%	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	9,3/25915	
107	Lipoxigenase, parcial	gi 499141108	65	1	1%	<i>Phaseolus coccineus</i>	5,7/82206	
177	Cisteína sintase, putativo	gi 223548214	191	3	11%	<i>Ricinus communis</i>	5,5/34435	
309	Lipoxigenase, parcial	gi 499141108	56	1	1%	<i>Phaseolus coccineus</i>	5,7/82206	
Processos Metabólicos								
76	Proteína prevista	gi 303289148	36	1	3%	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	5,6/43432	
Morte Celular								
212	Previsto: ribulose bisfosfato carboxilase / oxigenase Activase 2, cloroplasmático isoforma X1	gi 672124328	517	6	14%	<i>Phoenix dactylifera</i>	5,4/52233	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

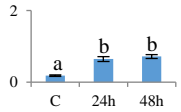
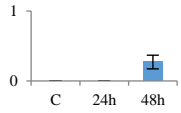
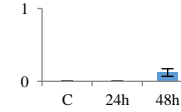
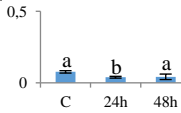
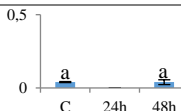
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
Transporte								
170	Proteína relacionada com o transporte	gi 328879000	109	3	16%	<i>Helianthus annuus</i>	9,620420	
Não Caracterizadas								
142	Precursora de hordeína B1, parcial	gi 364506288	40	2	25%	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	8,51811	
183	Proteína hipotética ARALYDRAFT_346243	gi 297824445	60	1	3%	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	5,816271	
Down - 24h								
Processos Biológicos								
173	Previsto: Serina carboxipeptidase 1	gi 357160330	58	1	2%	<i>Brachypodium distachyon</i>	6,354121	
Processos Metabólicos								
106	Proteína prevista	gi 303289148	48	1	2%	<i>Micromonas pusilla CCMP1545</i>	11,075429	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

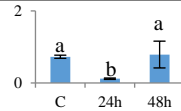
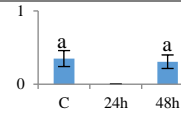
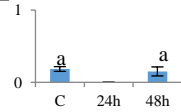
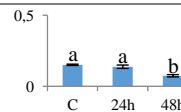
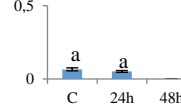
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
292	Aminocilase-1	gi 728837244	137	2	4%	<i>Gossypium arboreum</i>	5,5/51787	
Fotossíntese								
46	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande(cloroplastos), parcial	gi 77798378	685	9	22%	<i>Passiflora ambigua</i>	6,1/50004	
168	Ribulose bisfosfato carboxilase 1,5, parcial	gi 552986	109	2	5%	<i>Zingiber gramineum</i>	6,7/50048	
Down - 48h								
Processos Metabólicos								
116	Provável lactoilglutaciona liase, cloroplasto	gi 659071188	55	1	6%	<i>Cucumis melo</i>	6,4/40298	
189	Ttriosefosfato isomerase	gi 295687231	277	4	14%	<i>Gossypium hirsutum</i>	6,6/33498	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

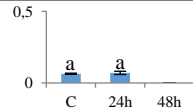
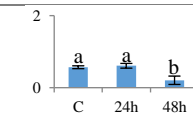
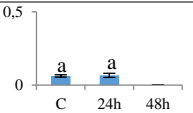
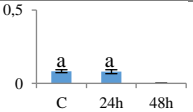
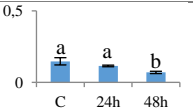
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
209	Ferritina *	gi 115486898	48	1	4%	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	5,4/28165	
251	VITISV_026323 proteína hipotética	gi 147835837	183	3	4%	<i>Vitis vinifera</i>	6,6/81297	
Respostas ao Estresse								
274	Proteína de choque térmico de 70 kDa	gi 19878	65	1	2%	<i>Nicotiana tabacum</i>	5,2/63313	
Transporte								
244	PRUPE_ppa015054mg proteína hipotética	gi 462424594	51	1	2%	<i>Prunus persica</i>	7,5/45247	
Não Caracterizada								
114	Csa_4G055360 proteína hipotética	gi 700198283	45	1	5%	<i>Cucumis sativus</i>	11,8/7298	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

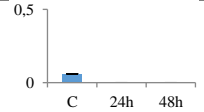
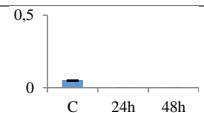
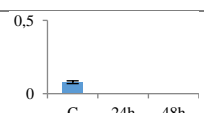
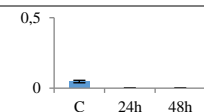
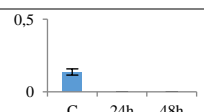
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
Down - 24/48 hrs								
Processos Biológicos								
167	Presequence protease 2 isoforma 2	gi 590686454	129	3	3%	<i>Theobroma cacao</i>	5,2/117281	
648	Proteína prevista	gi 303286980	44	1	1%	<i>Micromonas pusilla CCMP1545</i>	7,2/103716	
732	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de cloroplasto subunidade B, parcial	gi 104763728	71	2	15%	<i>Agave tequilana</i>	5,1/18589	
Processos de Desenvolvimento								
595	Sulfurtransferase *	gi 297839785	76	2	5%	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	5,7/42106	
676	Previsto: Proteína de ligação cloroplasto haste-laço de 41 kDa, cloroplastos	gi 672134633	51	1	2%	<i>Phoenix dactylifera</i>	8,8/44543	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

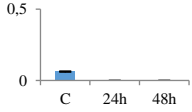
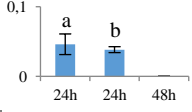
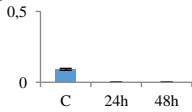
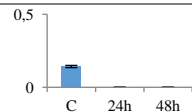
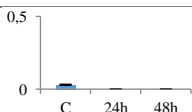
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
Processos do Sistema Imunológico								
675	Peptidil-prolil cis-trans isomerase, cloroplasmático	gi 10720315	60	1	3%	<i>Spinacia oleracea</i>	5,2/50069	
Processos Metabólicos								
232	frutose-1,6-bifosfatase, cloroplasto	gi 585118	321	4	13%	<i>Brassica napus</i>	5,4/44874	
588	S-adenosil-metionina sintase 2	gi 127046	50	1	3%	<i>Dianthus caryophyllus</i>	5,5/43618	
591	Previsto: proteína LYK5-like	gi 695077962	57	1	2%	<i>Musa acuminata subsp. Malaccensis</i>	9,5/48908	
596	OsI_06754 proteína hipotética	gi 125538981	41	1	2%	<i>Oryza sativa</i> Indica Group	6,8/41433	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

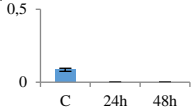
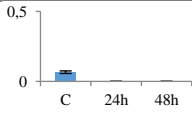
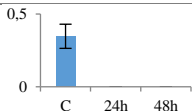
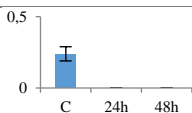
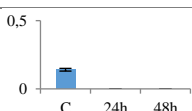

c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
602	Putativo fructokinase-2	gi 703147360	86	2	6%	<i>Morus notabilis</i>	5,3/41777	
606	FRK3	gi 393395652	192	4	2%	<i>Gossypium herbaceum</i>	5,2/42043	
608	EUGRSUZ_D02190 proteína hipotética	gi 629112980	93	1	2%	<i>Eucalyptus grandis</i>	6,0/ 55599	
609	Acetylmornithine deacetylase	gi 159483415	66	1	2%	<i>Hlamydomonas reinhardtii</i>	5,2/ 48392	
612	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase grande subunidade, parcial (cloroplastos)	gi 77798378	723	10	22%	<i>Passiflora ambigua</i>	6,1/50004	
619	Desconhecido	gi 118482305	113	3	8%	<i>Populus trichocarpa</i>	5,4/48920	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

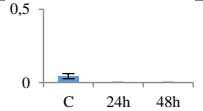
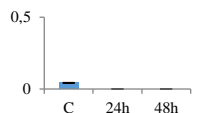
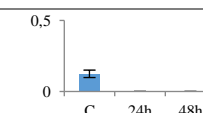
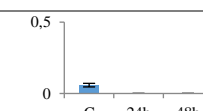
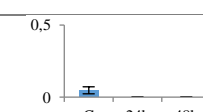
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
695	Proteína prevista	gi 168005736	64	1	2%	<i>Physcomitrella patens</i>	6,0/54338	
712	Piruvato desidrogenase subunidade componente E1 beta-1, mitocondrial *	gi 115477529	61	1	3%	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	5,2/39944	
713	Frutose-bisfosfato-aldolase *	gi 604319978	261	5	15%	<i>Erythranthe guttata</i>	5,4/35453	
745	Cr611	gi 347516612	54	1	6%	<i>Catharanthus roseus</i>	6,0/35912	
774	LOC100793240 proteína descaracterizada	gi 359806866	50	1	2%	<i>Glycine max</i>	5,6/54145	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

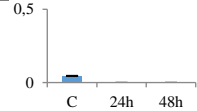
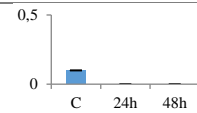
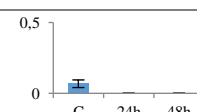
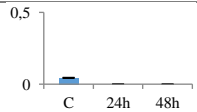
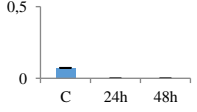
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
785	Produto de proteína sem nome	gi 21283	68	1	5%	<i>Spinacia oleracea</i>	5,535249	
788	Proteína de ligação a RNA de cloroplasto	gi 168274276	66	1	5%	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	4,633785	
807	30S ribossomal S1 proteína, cloroplasto ^c	gi 901791118	55	1	3%	<i>Zostera marina</i>	6,245189	
Atividade Reservatória de Nutrientes								
625	Faseolin, tipo -alfa;precursor	gi 130169	468	7	12%	<i>Phaseolus vulgaris</i>	5,249241	
Formação Pétala / Sépala								
703	Leucina rica em proteína transmembranar repita-quinase como a proteína	gi 15226197	42	1	1%	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,7 / 78307	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

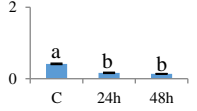
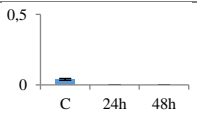
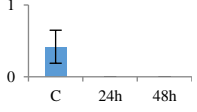
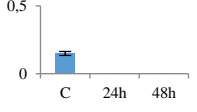
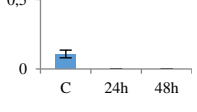
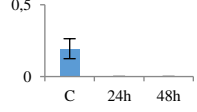
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
Fotossíntese								
207	Ribulose bifosfato carboxilase cadeia grande	gi 131921	210	2	5%	<i>Bursera inaguensis</i>	6,0/51984	
626	carboxilase de ribulose-1,5-bisfosfato / oxigenase subunidade grande	gi 237637006	118	3	7%	<i>Linum tenue</i>	6,2/50862	
652	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande, (cloroplastos), parcial	gi 77798410	471	7	16%	<i>Passiflora odontophylla</i>	6,3/50046	
653	Subunidade de Mg-chelatase, parcial	gi 847873	53	2	6%	<i>Hordeum vulgare subsp. Vulgare</i>	4,8/36530	
705	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase subunidade grande, parcial (cloroplastos)	gi 378925031	778	11	26%	<i>Loewia glutinosa</i>	7,3/49072	
719	Ribulose carboxilase de -1,5-bisfosfato / oxigenase subunidade grande	gi 2149531	108	8	14%	<i>Sphaerocarpos texanus</i>	6,0/49579	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

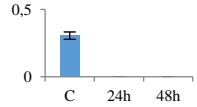
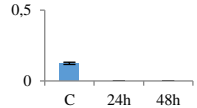
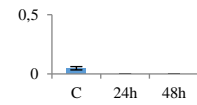
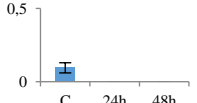
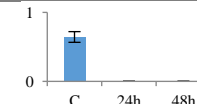
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
723	Ribulose bisfosfato carboxilase 1,5-, parcial	gi 10945641	117	3	7%	<i>Polyosma cunninghamii</i>	6,2/51933	
725	Proteína prevista	gi 255073331	44	1	2%	<i>Micromonas sp. RCC299</i>	7,5/55799	
768	Desconhecido	gi 116782547	54	1	3%	<i>Picea sitchensis</i>	9,1/34703	
880	Fotossistema II oxigênio em evolução proteína complexo 2, precursor	gi 224062595	80	2	7%	<i>Populus trichocarpa</i>	7,6/28344	
Biossíntese de Proteínas								
624	Fator tradução alongamento -TU, parcial	gi 2546954	670	6	23%	<i>Glycine max</i>	5,0/37953	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

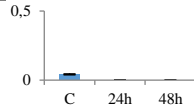
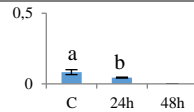
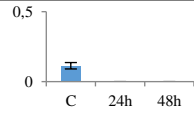
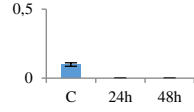
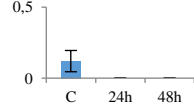
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
762	Factor de iniciação da tradução eIF-4A1	gi 14594802	98	2	8%	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7,642108	
Respostas ao Estresse								
288	ACC oxidase, parcial	gi 4164153	89	2	7%	<i>Passiflora edulis</i>	5,529543	
594	PRUPE_ppa015054mg proteína hipotética	gi 596299591	50	1	2%	<i>Runus persica</i>	7,545959	
654	Proteína de choque térmico, putativo	gi 255582806	579	8	14%	<i>Ricinus communis</i>	5,080189	
656	M569_13176 proteína hipotética	gi 527190343	914	11	17%	<i>Genlisea aurea</i>	5,080387	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

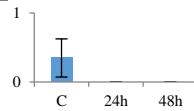
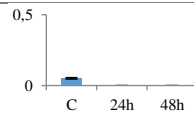
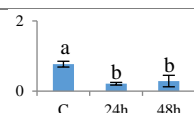
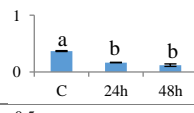
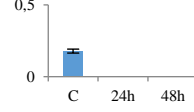
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
727	VITISV_011122 proteína hipotética	gi 147806440	43	1	2%	<i>Vitis vinifera</i>	5,0/54298	
810	Proteína de choque térmico cognato 70 kDa, putativo	gi 108864705	49	1	2%	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	4,9/65881	
Não Caracterizada								
127	Proteína hipotética conservada	gi 255588356	45	1	41%	<i>Ricinus communis</i>	9,1/8119	
144	AMTR_s01527p00007970 proteína hipotética	gi 548834493	49	1	1%	<i>Amborella trichopoda</i>	5,6/54171	
600	Proteína 14-3-3	gi 291162643	100	3	13%	<i>Dimocarpus longan</i>	4,7/29518	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

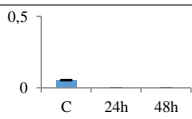
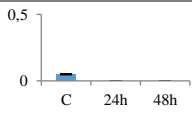
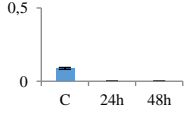
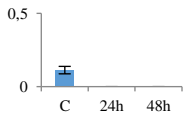
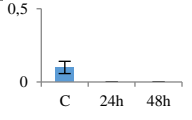
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundância ^e
614	OsJ_04535 proteína hipotética	gi 125573095	57	1	8%	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	10,3629680	
704	Previsto: proteína não caracterizada At4g15970	gi 685326486	51	1	4%	<i>Brassica rapa</i>	5,643432	
769	OsJ_04535 proteína hipotética	gi 125573095	58	1	8%	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	10,329680	
770	Previsto: proteína não caracterizada At4g15970	gi 685326486	51	1	4%	<i>Brassica rapa</i>	5,643432	
812	Previsto: demethylase específicos de lisina JM25-like isoforma X1	gi 695078602	50	1	1%	<i>Musa acuminata subsp. malaccensis</i>	6,4111140	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

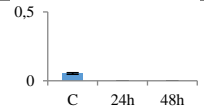
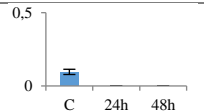
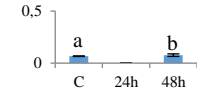
c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 1 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d	Abundancia ^e
875	Desconhecido	gi 116785879	76	1	5%	<i>Picea sitchensis</i>	7,5/26381	
882	OsJ_04535 proteína hipotética	gi 125573095	64	1	8%	<i>Oryza sativa Japonica</i> Group	10,3/29680	
Down – 24/up – 48h								
<i>Não caracterizada</i>								
149	P320666: glutationa-S-transferase DHAR3, cloroplasmático	gi 695044643	103	2	8%	<i>Musa acuminata</i> subsp. Malaccensis	7,6/28889	

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

e- As letras (a,b) representam mudanças nos níveis de abundância pelo test SNK

* - Nomes identificados por Uniprot

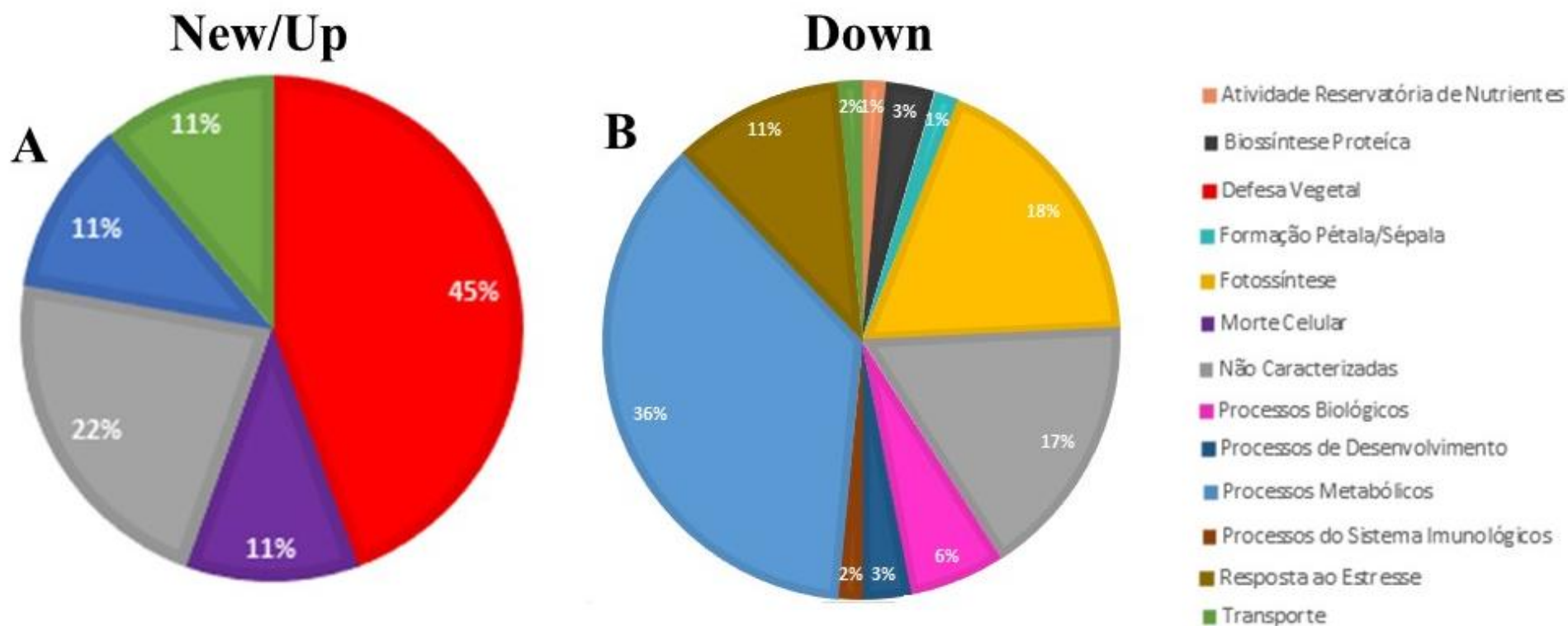


Figura 8. Categorização funcional de proteínas identificadas em folhas de maracujá. Proteínas que foram acumuladas em maior quantidade (A) e (B) as proteínas que tiveram redução no seu nível de tradução. Os gráficos mostram os diferentes níveis de acumulação e as funções fisiológicas que sofreram alterações em detrimento ao tratamento com MeJa nos períodos de 24 e 48h.

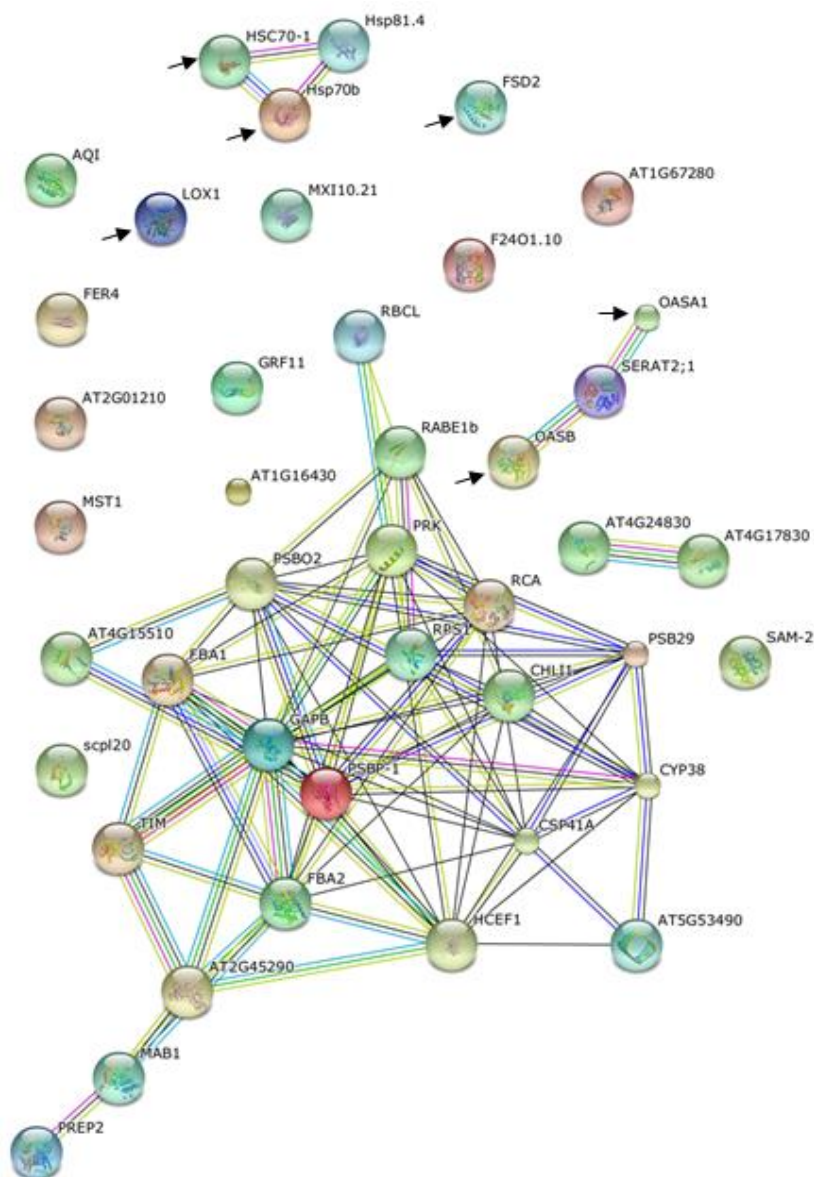


Figura 9. Análise das interações entre proteína-proteína de proteínas identificadas em folhas de maracujá após o tratamento com MeJa. As linhas indicam a associação entre as proteínas. As linhas verdes indicam a evidencia de proteínas na vizinhança, as linhas vermelhas fusão de genes, as azuis escuras co-ocorrência, as pretas co-expressão, as roxas são proteínas com evidencia relação experimental, azuis claras são evidencias encontradas nos bancos de dados e as lavandas são evidencias de homologia. A abreviação do nome das proteínas indentificadas nesse experimento e que batem com as proteínas identificadas em maracujá por espectrometria de massas estão apresentadas na tabela 2. As setas pretas indicam proteínas que foram identificadas como pertencendo a categoria defesa vegetal.

Tabela 2 - Abreviação dos nomes das proteínas identificadas que possuem interação proteína-proteína por STRING 10

Abreviação	Nome da Proteína
<i>Defesa Vegetal</i>	
FSD2	Superóxido desmutase [Fe]
LOX1	Lipoxigenase, parcial
OASA1	Cisteína sintase, putative
OASB	Cisteína sintase, putative
<i>Processos Biológicos</i>	
GAPB	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de cloroplasto subunidade B, parcial
PREP2	Presequence protease 2 isoforma 2
<i>Processo de desenvolvimento</i>	
CSP41A	Previsto: proteína de ligação cloroplasto haste-laço de 41 kDa, cloroplasto
<i>Processo do Sistema Imunológico</i>	
CYP38	Peptidil-prolil cis-trans isomerase, cloroplasmático
<i>Processos Metabólicos</i>	
MAB1	Piruvato desidrogenase subunidade componente E1 beta-1, mitocondrial
TIM	Triosefosfato isomerase
<i>Fotossíntese</i>	
CHLI1	Subunidade de Mg-chelatase, parcial
RBCL	Ribulose bifosfato carboxilase cadeia grande
<i>Resposta ao Estresse</i>	
HSC70-1	Proteína de choque térmico cognato 70 kDa, putativo
Hsp70b	Proteína de choque térmico de 70 kDa

Proteínas relacionadas a resposta ao estresse em resposta a vapores de metil jasmonato já foram relatadas anteriormente em maracujá; como é o caso da lipoxigenase (Rangel *et al.*, 2002 e Jardim *et al.*, 2008); da aleno óxido sintase (Siqueira-Junior *et al.*, 2008) e inibidores de tripsina (Botelho-Júnior *et al.*, 2009; Botelho-Júnior *et al.*, 2014). Essas proteínas estão associadas a resposta de defesa vegetal do tipo induzida direta, onde o herbívoro ao preda a planta dispara um mecanismo de sinalização através de compostos presentes em sua saliva; ativando lipases que atuam na expulsão do ácido linoleico e linolêico da membrana do cloroplasto, iniciando assim a Via das oxilipinas, também conhecida como Via do Octadêcanóide. Essa via culmina com a produção de ácido jasmonico, que juntamente com seus derivados como metil jasmonato (MeJa) atuam em vários processos fisiológicos, sendo a transcrição de inibidores de proteases um processo importante para a defesa direta contra os insetos predadores (Ryan, 1990; Glauser *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2015).

Curiosamente chama a atenção que apenas uma proteína induzida por MeJa tenha sido relatada no presente estudo, a lipoxigenase. Como já descrito por Rangel *et al.* (2002) e Jardim *et al.* (2008), essa proteína é induzidas após a planta ser tratada com metil jasmonato e ao ataque de lagartas, nos tempos de 24 e 48h em maracujá. Este fato é corroborado em nossos experimentos, os quais identificaram duas LOXs (spot 107 com gi|499141108 e 309 com gi|499141108), através do gráfico de abundancia dos spots (tabela 1). Nele, observa-se que ao longo do tempo de tratamento, a proteína apresentou um nível de expressão igual, sinalizando que sua expressão se mantém constante enquanto houver a sinalização de agressão as plantas. Um fato que não podemos deixar de fora é o baixo valor dos Scores. Mesmo utilizando o Scaffold para a validação das proteínas identificadas, essa enzima possui um Score baixo, se comparado as outras proteínas categorizadas como pertencentes a defesa vegetal. Este fato também é observado em *Camellia sinensis* (Score de 91) (Zhou *et al.*, 2014) e trigo (Score de 59) (Guan *et al.*, 2015), isso sugere que por ser uma proteína de alto peso molucular, por volta dos 100 KDa, sua clivagem em peptídeos e subsequentemente sua fragmentação pela espectrometria de massas seja dificultada, acarretando um dado estatístico (Score) baixo.

Era esperado a identificação de outras já relatadas na literatura, como é o caso da aleno óxido sintase, cistatina e de inibidores de tripsina do tipo Kunitz (Siqueira-Júnior *et al.*, 2008; Botelho-Júnior *et al.*, 2014). Este fato corrobora com a importância de se utilizar diferentes tipos de abordagem para estudar um mesmo modelo. No caso da aleno óxido sintase encontramos na literatura que essa proteína apresenta um ponto isoelétrico

entre duas faixas, abaixo do pH 7 como encontrado em *Zea mays* (Xiong *et al.*, 2013), *Oryza sativa L.* (Ma *et al.*, 2015) como também acima da faixa que é o caso apresentando por *Glycine max* (Moura *et al.*, 2014). Com esses dados, podemos supor que a não identificação da aleno óxido sintase pode estar atrelada ao fato dela apresentar um ponto isoelétrico semelhante ao da soja (pH 8,74), logo ela não estaria em nossos experimentos, devido a utilização de uma faixa de pH 4-7, ou ela não foi identificada pela espectrometria de massas. Com a cistatina, acontece outro fenômeno. Na literatura ela é descrita como uma proteína que possui um ponto isoelétrica dentro da faixa de pH que utilizamos, como observado em *Amaranthus hypochondriacu* (pI 5,67) (Maldonado-Cervantes *et al.*, 2014), *Zea mays* (pI 5,66) (Meng *et al.*, 2014) e *Triticum aestivum* (pI 5,95) (Kosová *et al.*, 2013), contudo, como tivemos muitos spots que não tiveram sua identificação realizada, acredita-se que a cistatina poderia está entre eles. Já os inibidores de tripsina podem não terem sido observados, devido a uma limitação da própria técnica. Para clivar a proteína em peptídeos, utilizamos tripsina como enzima e como eles são inibidores da própria enzima, é bem provável que eles não foram clivados, logo não puderam ser fragmentados pelo laser da espectrometria de massas e subsequentemente identificado.

Nossos resultados também demonstraram que apesar das plantas serem tratadas com MeJa, encontramos proteínas relacionadas a defesa vegetal, desencadeada por espécies reativas de oxigênio (EROs). Como é o caso da da superóxido desmutase [Fe] (spot 28, gi|159464723) e cisteína sintase (spot 177, gi|223548214); elas atuam no combate de radicais livres, liberados a partir de ataque de patógenos, conhecida como resposta de hipersensibilidade (HR, do inglês, *hypersensitivity response*). Esse tipo de defesa é desencadeado quando a planta sofre ataques de patógenos (como bactérias por exemplo).

Os resultados apresentados nos permitem observar, que o metil jasmonato está associado a diversos processos fisiológicos, dentre eles o de defesa vegetal. Ele atua em dois processos distintos, tanto na cascata de sinalização para a produção de inibidores de proteases, como no controle de espécies reativas de oxigenio. Esses dois processos são mediados por sinalizações diferentes, o que explica os dados obtidos pelo STRING 10 (figura 9), onde não há qualquer interação entre essas proteínas, mesmo possuindo a mesma função de defesa vegetal.

Outra proteína identificada como induzida foi a ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (spot 212, gi|672124328). Esta proteína foi categorizada com a função de morte celular. Essa função fisiológica está intimamente relacionada com a resposta de hipersensibilidade, uma vez que esse processo desencadeia a necrose do tecido atacado por patógenos (Lau *et al.*, 2006).

Por outro lado, cerca de 67 proteínas tiveram seus acúmulos reduzidos em resposta ao tratamento com MeJa durante os tempos de 24 e 48h. A maioria dessas proteínas foi categorizada aos grupos de metabolismo e a fotossíntese. Esse fenômeno sugere que o desvio do maquinário celular para a expressão de proteína de defesa, faça com que as proteínas ligadas ao metabolismo e outras funções biológicas como relatadas na tabela 1, sofram uma redução da sua acumulação como forma de combater os ataques de patógenos e insetos, ao utilizar todo o maquinário celular para a tradução de proteínas de defesa. Esse tipo de redução de expressão atua diretamente na produção da cultura, uma vez que a frutífera reduz seu maquinário de metabolismo em prol do combate de agentes patológicos. Esse comportamento também foi observado em estudos proteômicos em grapefruit, onde a maioria das proteínas também apresentaram redução no nível de expressão (Li *et al.*, 2013).

Outros estudos com o maracujá usando condições naturais de estresse, como infecções por patógenos e herbivoria podem amplificar e até mesmo complementar os dados proteômicos descritos neste trabalho.

4. Conclusão

- Através das aplicações da abordagem proteômica foi possível a identificação de 76 proteínas diferencialmente reguladas em resposta ao MeJa nos períodos de 24 e 48h.
- Proteínas de defesa como lipoxigenase e de detoxificação celular como a cisteína sintase e a superóxido dismutase [Fe] foram induzidas por MeJa.
- A LOX e as proteínas de detoxificação, por mais que sejam atreladas a função de defesa vegetal, não possuem qualquer interação entre si.

- Outras proteínas além das de defesa também foram induzidas, como uma proteína prevista, ligada a processos metabólicos; ribulose bifosfato, atrelada a morte celular e uma proteína relacionada com o transporte.
- A maioria das proteínas identificadas, 67, sofrem redução no seu acúmulo durante o tratamento com MeJa.
- As funções biológicas de metabolismo e fotossíntese foram as que apresentaram uma maior quantidade de proteína com acúmulo reduzido.
- Foi identificada uma proteína que apresentou um perfil muito diferente das outras. A glutathiona-S-transferase não é traduzida no período de 24h, porém em 48h ela apresenta uma acumulação maior ao comparadas com as plantas controles.

SEGUNDO CAPÍTULO

MAPEAMENTO PROTEOMICO DA POLPA DE MARACUJÁ

1. Objetivo

- Identificar se há presença de proteínas ligadas a defesa vegetal na polpa do maracujá através de técnicas proteômicas;
- Análises das funções biológicas relacionadas com as proteínas indentificadas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Material Vegetal

Os frutos foram comprados em mercado local, na região de Campos dos Goytacazes. Sempre procurando frutos do mesmo tamanho e coloração semelhante.

2.2. Extração de proteínas

Foram realizadas três extrações de proteínas totais da polpa do maracujá, e em cada extração foram utilizados três frutos. As proteínas foram extraídas de acordo com Hajduch *et al.* (2005), porém com modificações. As amostras proteicas da polpa foram misturadas numa razão de 1: 1 (v / v) com 50% (v / v) de fenol, 0,9 M de sacarose, 10 mM de EDTA, 0,4% β - mercaptoetanol, 100 mM Tris-HCl pH 8,8 em banho de gelo. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g (4 ° C) e a camada de fenol foi recolhida. Em seguida, a fase fenólica foi extraída mais duas vezes com o tampão de extração descrito acima. A precipitação das proteínas foi realizada através da adição de cinco volumes (v / v) de acetato de amônio 0,1 M em metanol em 16h de incubação a -20°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g (4 ° C) durante 5 minutos. Os sedimentos foram lavados três vezes com 0,1 M de acetato de amônio em metanol e uma vez com acetona 100%. Os precipitados foram secos a temperatura ambiente e solubilizados em tampão para focalização isoeletrica (7 M de ureia, 2 M tioureia, 4% CHAPS, 1% p / v de DTT, 2% de anfólitos, pH 4-7 e 0,2% de azul de bromofenol). Os materiais insolúveis foram removidos por centrifugação. Os sobrenadantes foram coletados para quantificação de proteínas e análise 2D (Perdizio *et al.*, 2015).

2.3. Quantificação proteica

As concentrações de proteína foram determinadas utilizando 2-D kit Quant (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

2.4. Eletroforese, coloração e análise de imagem

Para cada extração foram realizados três géis 2D-PAGE, totalizando ao final do experimento 9 géis. Os quais foram obtidos da seguinte maneira. Quantidades iguais de proteína (500 µg) foram utilizadas na focalização isoeétrica (primeira dimensão). A focalização (tiras de IPG, 18 cm de comprimento, de pH 4-7, Immobiline™ DryStrip GE Healthcare) foi realizada utilizando IPGfor (GE Healthcare) seguindo os parâmetros: (1) 50 V (600 Vh); (2) 200 V (200 Vh); (3) 500 V (500 Vh); (4) 1000 V (1000 Vh); (5) gradiente de 4000 V (5000 Vh); (6) gradiente de 8000 V (6000 Vh); (7) 8000 V (54000 Vh); (8) 100 V (600 Vh). Em seguida, as proteínas foram reduzidas com 1% p / v de DTT, durante 15 min e alquiladas com 2,5% p / v de iodoacetamida em 10 mL de tampão de equilíbrio (6 M de ureia, 30% glicerol, 2% de SDS, e 50 mM de Tris-HCl, pH 8,8) durante 15 min. As tiras foram transferidas para géis com malha de 12,5% de poliacrilamida, conforme descrito por Laemmli, (1970). O SDS-PAGE (a segunda dimensão) foi realizada utilizando Protean II xi (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), com tampão para electroforese (250 mM Tris pH 8,4, 1,92 M de glicina e SDS a 1%) utilizando 25 mA por gel durante 6 h. Os géis foram corados com Coomassie coloidal azul (Neuhoff *et al.*, 1985). Em seguida foram digitalizados utilizando ImageScanner (GE Healthcare) e os dados foram analisados através do software ImageMaster 2D-Platinum, versão 7.0 (GE Healthcare) para discriminar os pontos (spots) de interesse. Os spots foram normalizados através do valor de ANOVA com $p \leq 0,05$.

2.5. Digestão de proteínas *in-gel*, MALDI TOF-TOF

Os spots selecionados foram recolhidos e incubados em 25 mM de bicarbonato de amónio (Sigma-Aldrich), contendo 50% (v / v) de acetonitrila durante 16 h. Após descoloração, eles foram lavados com água deionizada e cobertos com 100% de acetonitrila; subsequentemente, foram secos em Speed-Vac (Savant Instruments, Inc., Farmingdale, NY) durante 15 min. Mais tarde, os spots foram re-hidratados em 50 mM de bicarbonato de amónio com tripsina 33 ng / µL (Promega, Madison, WI, EUA 228) durante 1 h em gelo. O excesso de solução foi removido e as amostras foram incubadas a 37 °C durante 20 h. Após, os péptidos foram extraídos com 30 µL de ácido fórmico a 5%, acetonitrila 50%. As amostras foram incubadas em ultrassom durante 10 min. Este processo foi repetido duas vezes, e em seguida foram concentradas em SpeedVac, para cerca de 10

μL . Posteriormente, realizou-se a dessalinização utilizando Zip-Tip (resina C18: P10 Millipore Corporation, Bedford, MA). Os péptidos foram eluídos a partir da coluna com 60% de acetonitrila 0,1% de ácido trifluoroacético. As soluções das amostras (0,3 μL) foram misturadas com um volume igual de uma solução da matriz de MALDI (R-ciano-4-hidroxicinâmico ácido (Aldrich, Milwaukee, WI) em 50% de acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,1%) na placa alvo e deixada secar à temperatura ambiente. Os dados de MS / MS foram adquiridos com uma granada de alumínio ítrio dopado com neodímio (Nd: YAG), com um ritmo de repetição de 200 Hz. Tipicamente, 1600 tiros foram acumulados para espectros no modo S, enquanto 3.000 tiros foram acumulados por espectros no modo de MS / MS. Seis dos sinais mais intensos de íons com uma relação sinal -ruído superior a 15, foram selecionados como precursores para a aquisição de MS / MS, com a exclusão dos picos da autólise da tripsina comum e os sinais iônicos da matriz. A calibração externa no modo de MS foi realizada utilizando uma mistura de quatro peptídeos: des-Arg1-Bradiquinina (m / z) 904,468; angiotensina I (m / z 1,296.685); GLU1 fibrinopeptídeo-B (m / z 1,570.677) e de ACTH (18_39) (m / z 2,465.199). Os espectros MS / MS foram calibrados externamente utilizando massas de íons de fragmento conhecidos, observados no espectro MS / MS de angiotensina I. Os resultados de MS / MS foram pesquisados contra o NCBI (base de dados) usando o software Mascot (www.matrixscience.com). Utilizando os parâmetros péptido tol. \pm a 100 ppm, tolerância de massa MS / MS de 0,6 Da carbamidometilação de cisteína (modificação fixo) e oxidação da metionina (modificação variável). As sequências de péptidos foram analisadas e validadas usando o software Scaffold³TM utilizando a probabilidade de identificação do peptídeo de 90%. O banco de dados UniProt (www.uniprot.org) foi utilizado para nomear as proteínas que não tiveram sua nomenclatura indicada pelo Mascot e pelo Scaffold. A classificação funcional das proteínas identificadas foi realizada utilizando o programa Blast2go PROv. 3.1 (www.blast2go.com).

3. Resultados e Discussão

Amostras de proteínas totais do fruto do maracujá foram analisadas em 2D-PAGE, para a separação por ponto isoelétrico foi utilizado um gel com um pH mais abrangente de 3-10 (figura 10). Após observação de que a maioria das proteínas se encontram em

uma faixa mais restrita, uma segunda faixa de pH foi utilizada (4-7), como mostra a figura 11. Cento e vinte e oito spots foram identificados de forma reprodutível nas condições de ensaio, ou seja, as proteínas foram detectadas em 3 repetições de 3 experimentos independentes. Algumas proteínas foram identificadas tendo origem um mesmo spot, levando a crer a ocorrência de uma co-migração.

Os resultados obtidos com a polpa do maracujá incrementam as informações sobre a biologia da fruta, uma vez se que se tem muito pouco na literatura, além de auxiliar estudos futuros sobre o pós-colheita. Identificando as proteínas que estariam auxiliando na manutenção da integridade da fruta, há a possibilidade de estudos futuros para a expressão em maior quantidade dessas proteínas, para que ele possua uma maior durabilidade do campo ao consumidor.

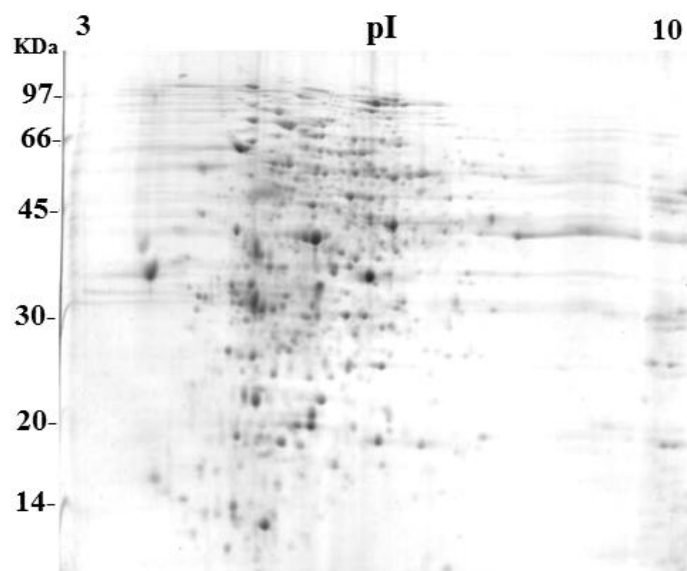


Figura 10. Gel representativo de proteínas totais da polpa de maracujá utilizando uma faixa de pH 3-10. As amostras (500 µg) foram focalizadas em tiras de IPG (18 cm), gradiente de pH linear de 3-10, e separadas por SDS-PAGE (12,5%). O gel foi corado com Coomassie coloidal azul (Schuster *et al.*, 1983).

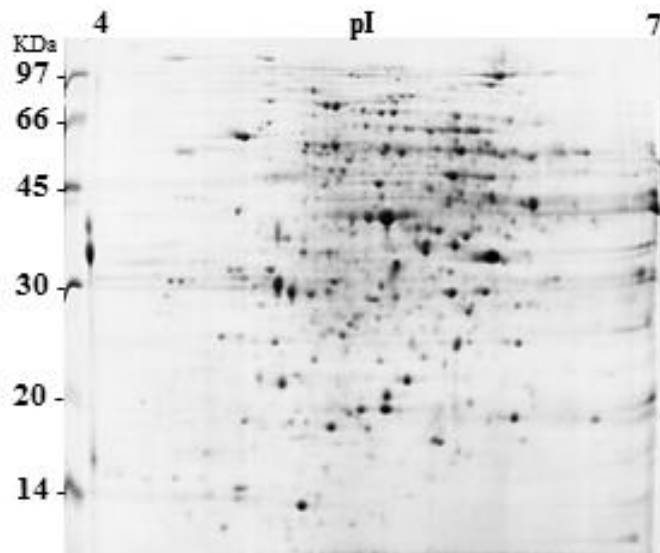


Figura 11. Gel representativo de proteínas da polpa de maracujá utilizando uma faixa de pH 4-7. As amostras (500 µg) foram focalizados em tiras de IPG (18 cm), gradiente de pH linear de 4-7, e separadas por SDS-PAGE (12,5%). O gel foi corado com Coomassie coloidal azul (Schuster *et al.*, 1983).

Na Tabela 3 estão reunidas 71 proteínas foram classificadas em 12 categorias: defesa vegetal, com superóxido desmutase [Fe] (spot 71, gi|255539971), 2-Cis-peroxiredoxina (spot 74, gi|115446541) e a ascorbato peroxidase 2 (spot 99, gi|221327589); resposta ao estresse, com 10 proteínas; resposta à dessecação, com chilling responsiva (spot 147, gi|153793260), proteína embrionária abundante (spot 147, gi|197359563); resposta ao estresse salino, com succinil-CoA-ligase (spot 158, gi|115447367); transportes, com 6 proteínas identificadas; alérgeno com profilin-I (spots 336 e 337, gi|130975); regulação biológica, com 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato 2 aldolase (spot 57, gi|357123058); processo de biossíntese, com 7 proteínas identificadas; processo celular, com 10 proteínas identificadas; processo metabólico, com 21 proteínas identificadas, desenvolvimento do pólen, com F1F0-ATP Fad sintase (spot 93, gi|15227104) e não caracterizadas, com 7 proteínas identificadas. Na figura 12, o gráfico mostra como são organizadas essas proteínas. Em maior quantidade, 30%, observa-se as proteínas ligadas ao metabolismo, na cor azul, seguida de resposta ao estresse e processos celulares com 14%, processos de biossíntese com 10%; transporte com 9%; defesa vegetal 4%; alérgenos e resposta a dessecação com 3%; resposta ao estresse salino, regulação biológica e desenvolvimento do pólen com 1% das proteínas identificadas.

Tabela 1 - Proteínas diferencialmente expressas em polpa de maracujá identificadas por MALDI TOF-TOF

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C. ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d
<i>Defesa Vegetal</i>							
71	Superóxido desmutase [fe], putativo	gi 255539971	158.0	1	6%	<i>Ricinus communis</i>	4,8/34504
74	2-Cis peroxidase BAS1, chloroplastica*	gi 115446541	132.4	1	14%	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	5,6/28096
99	Ascorbato peroxidase 2	gi 221327589	76.2	2	9%	<i>Citrus maxima</i>	5,5/27570
<i>Resposta ao Estresse</i>							
42	Proteína DIP	gi 157965463	151.9	1	18%	<i>Zea mays</i>	5,8/15914
42	Proteína homóloga ao estresse abscísico e amadurecimento	gi 2677824	55.3	1	10%	<i>Prunus armeniaca</i>	5,4/21240
56	Proteína de choque térmico classe II 18,8KDa	gi 232276	129.9	1	8%	<i>Ipomoea nil</i>	5,2/18772
58	Proteína de choque térmico CII	gi 259123935	70.1	1	10%	<i>Prunus salicina</i>	5,9/17526
59	Proteína de choque térmico 17,5 KDa	gi 224104214	64.4	2	14%	<i>Populus trichocarpa</i>	6,1/17824
64	SELMODRAFT_148621, proteína hipotética	gi 302782199	82.1	1	10%	<i>Selaginella moellendorffii</i>	4,9/17651
74	Desconhecido	gi 116783966	164.8	3	14%	<i>Picea sitchensis</i>	8,5/30820
107	Fibrilina	gi 76560800	54.5	1	3%	<i>Coffea canephora</i>	5,3/34806
241	Proteína de choque térmico 70KDa, mitocondrial, precursor	gi 399940	122.3	7	10%	<i>Phaseolus vulgaris</i>	5,9/72537
250	Proteína de choque térmico 70	gi 148646849	81.0	5	12%	<i>Chlorella vulgaris</i>	5,2/70833
<i>Resposta a Dessecação</i>							
147	Proteína chilling-responsiva	gi 153793260	133.4	5	13%	<i>Nicotiana tabacum</i>	4,8/35739
147	Proteína embrionária abundante, parcial	gi 197359563	117.4	2	14%	<i>Prunus dulcis</i>	4,7/27765
<i>Resposta ao Estresse Salino</i>							
158	Succinil-CoA-ligase [ADP-formar] subunidade beta, mitocondrial *	gi 115447367	75.4	1	2%	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	5,9/45091
<i>Transporte</i>							
46	ATPase subunidade F tipo - V	gi 224082722	91.3	1	9%	<i>Populus trichocarpa</i>	5,7/14448
76	ATP sintase subunidade beta, parcial (cloroplasto)	gi 21633459	51.4	1	2%	<i>Humbertia madagascariensis</i>	4,8/52273
205	ATPase subunidade 1	gi 112253900	90.2	1	3%	<i>Brassica napus</i>	6,0/55131

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados homologia com o banco de dados

c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 3 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d
209	ATP sintase subunidade beta, mitocondrial; precursor.	gi 231586	151.7	1	25%	<i>Hevea brasiliensis</i>	5,9/60258
232	Previsto:ATPase subunidade catalítica A, V-tipo	gi 356521645	140.9	7	16%	<i>Glycine max</i>	5,3/68779
239	Previsto:ATPase subunidade catalítica A, V-tipo	gi 356521645	77.2	6	16%	<i>Glycine max</i>	5,3/68779
Alérgeno							
336	Profilin-1	gi 130975	97.1	2	10%	<i>Betula pendula</i>	5,0/14253
337	Pofilin-1	gi 130975	62.3	1	10%	<i>Betula pendula</i>	5,0/14253
Regulação Biológica							
57	4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato 2 aldolase	gi 357123058	70.6	2	11%	<i>Brachypodium distachyon</i>	5,3/17849
Processos de Biossíntese							
61	Fator de iniciação da tradução eucariótica 5A *	gi 116781502	68.6	1	6%	<i>Picea sitchensis</i>	5,4/17313
106	Previsto: glutamina sintetase nódulo isozima-like isoforma	gi 449436357	90.0	1	4%	<i>Cucumis sativus</i>	5,7/39118
148	VITISV_007608 proteína hipotética	gi 147812626	76.6	1	4%	<i>Vitis vinifera</i>	5,2/27160
154	Glutamina sintetasePR-2	gi 121345	73.9	1	7%	<i>Phaseolus vulgaris</i>	5,4/39205
173	Metiltioribose quinase, putativo	gi 255555259	108.2	3	8%	<i>Ricinus communis</i>	5,8/48603
182	4-hidroxi-3-metilbut-2-enilo difosfato redutase	gi 18418433	73.4	2	5%	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,7/52780
333	Metiltransferase 5-metiltetrahydropteroltriglutamate-homocisteína, putativo	gi 255569484	54.0	1	2%	<i>Ricinus communis</i>	6,0/84720
Processos Celulares							
93	Previsto: glutationa S-transferase L3-like	gi 225439775	143.9	1	6%	<i>Vitis vinifera</i>	5,5/27054
163	Fosfoglicerato quinase *	gi 118488917	46.6	1	4%	<i>Populus trichocarpa x Populus deltoides</i>	8,5/50284
163	Desconhecida	gi 118483416	89.1	1	4%	<i>Populus trichocarpa</i>	5,3/41388
170	Desconhecida	gi 116789192	75.3	2	5%	<i>Picea sitchensis</i>	5,3/80134
226	Chaperonina CPN60-1, precursor mitocondrial, putativo	gi 110289207	95.7	1	3%	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	6,9/67307
228	Proteína precursora família Chaperonina	gi 224073124	321	3	6%	<i>Populus trichocarpa</i>	5,7/64789
280	Previsto: proteassoma subunidade beta do tipo 3-A	gi 225459609	75.1	1	9%	<i>Vitis vinifera</i>	5,3/22920
285	Proteína da família Mangrin *	gi 118484502	86.2	2	9%	<i>Populus trichocarpa</i>	9,0/27272

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 3 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d
289	Proteassoma tipo subunidade alfa *	gi 116780007	66.0	1	6%	<i>Picea sitchensis</i>	5,7/25601
320	Enolase, putativa	gi 110288667	115.0	1	4%	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	5,4/47972
Processos Metabólicos							
46	CICLE_v10024334mg proteína hipotética	gi 557543442	99.2	1	5%	<i>Citrus clementina</i>	4,8/29062
65	Proteína prevista	gi 168059448	62.0	1	5%	<i>Physcomitrella patens</i>	6,3/18971
88	Isomerase de triosefosfato, putativo	gi 255584863	98.8	2	9%	<i>Ricinus communis</i>	5,8/27444
90	Previsto: triosefosfato isomerase, citosólica	gi 823247378	260	4	17%	<i>Gossypium raimondii</i>	6,0/27459
104	VITISV_024278 proteína hipotética	gi 147822216	132.3	1	6%	<i>Vitis vinifera</i>	5,7/30336
117	Prevista: proteína morte pétala	gi 449468764	73.2	2	6%	<i>Cucumis sativus</i>	7,6/53616
120	Proteína biossíntese fenazina, putativo	gi 255559496	68.6	1	2%	<i>Ricinus communis</i>	5,2/54564
123	Lactoglutatione liase, putativo	gi 255554865	103.5	2	9%	<i>Ricinus communis</i>	7,6/31547
127	Proteína da família malato desidrogenase	gi 566153496	143.2	1	8%	<i>Populus trichocarpa</i>	8,7/36014
170	Aconitase, putativo	gi 255579588	107.8	3	4%	<i>Ricinus communis</i>	5,9/98543
178	S-adenosil-metionina-sintetase-2	gi 37051117	174.9	9	36%	<i>Pisum sativum</i>	6,2/37633
201	UDP-glucose pirofosforilase	gi 32527831	93.3	4	11%	<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>	5,6/51810
220	EUTSA_v10003945mg proteína hipotética	gi 567139657	68.7	1	3%	<i>Eutrema salsugineum</i>	6,1/52968
222	EUTSA_v10003945mg proteína hipotética	gi 557091486	50.3	1	3%	<i>Eutrema salsugineum</i>	6,1/52488
224	Fosfoglicerato desidrogenase	gi 211906486	71.6	1	2%	<i>Gossypium hirsutum</i>	7,1/63818
267	Cr611	gi 347516612	155.2	2	5%	<i>Catharanthus roseus</i>	6,0/35593
274	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, citosólica	gi 120666	133.5	2	10%	<i>Antirrhinum majus</i>	8,3/36685
291	Anidrase carbônica *	gi 217074216	166.6	3	14%	<i>Medicago truncatula</i>	6,1/30555
292	6-fosfogluconolactonase	gi 110430677	48.9	1	3%	<i>Oryza brachyantha</i>	5,0/28966
335	Proteína da família hidrolase Dienelactone	gi 224131618	66.5	2	13%	<i>Populus trichocarpa</i>	5,2/26205
335	Desconhecido	gi 116779876	139.1	1	9%	<i>Picea sitchensis</i>	5,2/26478

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

* - Nomes identificados por Uniprot

Tabela 3 (continuação)

Nº spot	Nome da proteína	Número de acesso NCBI	Score ^a	P.C ^b	Cob. Seq. ^c	Organismo de referência	PIMM ^d
<i>Desenvolvimento do pólen</i>							
93	F1F0-ATP Fad sintase, subunidade mitocondrial	gi 15227104	77.0	1	6%	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6,2/27596
<i>Não Caracterizadas</i>							
67	CICLE_v10023417mg proteína hipotética	gi 557547338	77.9	1	7%	<i>Citrus clementina</i>	7,9/20348
107	Desconhecida	gi 116791791	118.7	1	5%	<i>Picea sitchensis</i>	5,5/35666
114	Previsto: proteína 14-3-3 7	gi 225459292	153.4	2	11%	<i>Vitis vinifera</i>	4,7/28739
121	POPTR_0001s38900g proteína hipotética	gi 224061357	130.5	1	5%	<i>Populus trichocarpa</i>	4,8/32848
136	Eugenol sintase 2	gi 149349524	137.6	3	12%	<i>Clarkia breweri</i>	5,4/34234
136	Proteína da família isoflavona reductase	gi 224066197	109.2	1	7%	<i>Populus trichocarpa</i>	5,5/33979
222	Desconhecidas	gi 238007860	65.3	1	1%	<i>Zea mays</i>	9,5/58782

a- MASCOT score

b- Peptidos combinados – homologia com o banco de dados

c- Cobertura sequencia

d- Ponto Isoelétrico/ Massa Molecular teórico

* - Nomes identificados por Uniprot

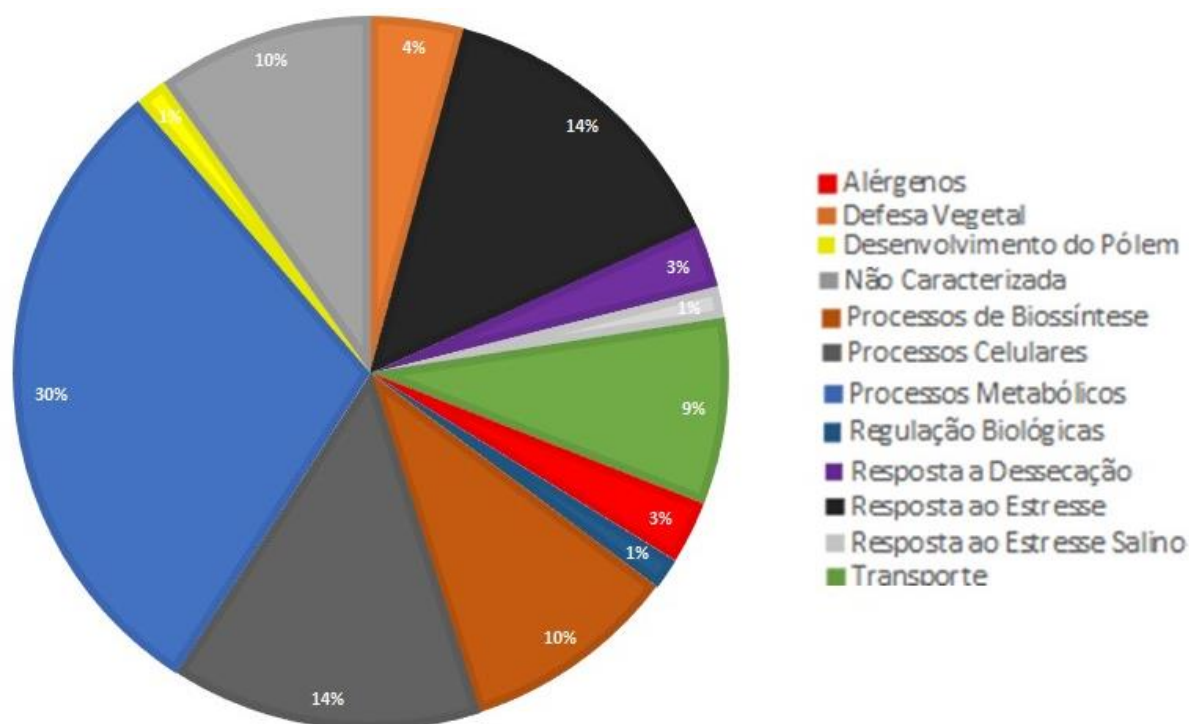


Figura 12. Categorização funcional das proteínas identificadas em polpa de maracujá, baseadas no Blast2GO. O gráfico mostra as diferentes funções proteicas encontradas na polpa do maracujá.

A maior porcentagem de proteínas identificadas pertence a categoria de processos metabólicos e, provavelmente, refletem o papel destas proteínas durante o desenvolvimento normal da fruta, resultados semelhantes também foram encontrados em laranja doce (Pan *et al*, 2009). Outra categoria interessante é a defesa vegetal, onde identificamos três proteínas, defesa vegetal, a superóxido desmutase [Fe] (spot 71, gi|255539971), a 2-Cis-peroxiredoxina (spot 74, gi|115446541) e a ascorbato peroxidase 2 (spot 99, gi|221327589). Todas estão associadas a resposta hipersensibilidade, tendo importante papel antioxidante. Sua presença na polpa da fruta sugere que podem atuar como parte do material intrínseco de defesa do fruto, como também atuando na formação de vitaminas, carotenóides e compostos fenólicos (Halliwell & Gutteridge, 1995).

Uma categoria que se destaca é a resposta ao estresse. Nessa categoria destacamos as proteínas identificadas pertencentes a família das proteínas de choque térmico, proteína de choque térmico classe II (spot 56, gi|232276); proteína de choque térmico CII (spot 58, gi|259123935); proteína de choque térmico 17,5 KDa (spot 59, gi|224104214); proteína de choque térmico 70 KDa (spot 241, gi|399940) e proteína de choque térmico

70 (spot 250, gi|148646849). Essas proteínas estariam intimamente relacionadas a eventos pós-colheita, atuando na manutenção do frescor do fruto após a retirada dele da planta (Pedreschi *et al.*, 2013).

Estudos de proteômica com frutas são mais limitados do que outros tecidos como folhas ou raízes (Molassiotis *et al.*, 2013). Assim, este trabalho pode fornecer informações importantes no campo da ciência sobre frutos e a biologia de culturas tropicais. Outro ponto importante a abordar é abundância de proteínas na polpa, de diferentes funções fisiológicas. Essa característica poderia ser interessante para estudar não só a fisiologia da fruta, mas também ilustrar o maracujá como uma possível ferramenta para a tecnologia de biorreator (Jha *et al.*, 2014; Raven *et al.*, 2015). Essa técnica iria permitir a utilização dos frutos para a super-expressão de proteínas específicas, como por exemplo ligadas a defesa vegetal ou até mesmo a proteínas relacionadas a maior durabilidade do fruto ao sair do campo e ir para o comércio.

Com os avanços na área de genoma e transcriptoma do maracujá (Munhoz *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2014) a tendência é aumentar o número de informações geradas pelos estudos de proteômica com este fruto, além de auxiliar na elaboração mais precisa para a implementação do maracujá como um biorreator. Uma vez que o ciclo produtivo dessa cultura é muito mais rápido (~ 5-6 meses) em comparação com outras plantas exploradas na indústria de suco como laranja, manga e caju.

Logo, a utilização do maracujá como biorreator está cada mais próximo da realidade, devido aos estudos de proteômica, genômica e transcriptômica da planta. Como o fruto apresenta em sua composição diferentes proteínas ligadas a diferentes processos fisiológicos, isso permitirá uma maior facilidade em escolher em que área atuar, pós-colheita, super-expressando proteínas ligadas a manutenção da qualidade da fruta, ou na defesa vegetal, aumentando a quantidade de proteínas, que iriam proteger o fruto ou quem sabe ambos os processos.

4. Conclusão

- Observamos que as proteínas totais identificadas da polpa do maracujá atuam em diferentes processos fisiológicos.
- A maioria das proteínas identificadas atuam em processos metabólicos, 30%.

- Em Segundo lugar com 14%, observamos as proteínas relacionadas a resposta a estresse e processos celulares.
- Dentro de proteínas relacionadas ao estresse encontramos 5 proteínas da família das proteínas de choque térmico,
- Dentro da categoria de defesa vegetal, encontramos, a superóxido dismutase [Fe], 2-cis peroxiredoxina e ascorbato peroxidase, proteínas ligadas a resposta de hipersensibilidade.
- Também foram encontradas proteínas ligadas a resposta a dessecação, ao estresse salino, transporte, alérgeno, regulação biológica, processos de biosíntese e desenvolvimento do polén.

Referencias

- Álvarez C, Bermúdez MÁ, Romero LC, Gotor C, García I. Cysteine homeostasis plays an essential role in plant immunity. *New Phytol.* 2012; 1:165-177.
- Alvarez S, Zhu M, Chen S. Proteomics of Arabidopsis redox proteins in response to methyl jasmonate. *J. Proteomics* 2009; 73: 30-40.
- Andrigueto JR, Kosoki AR, Oliveira DA. Maracujá no contexto do desenvolvimento e conquistas da produção integrada de frutas no Brasil. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2005; 509-556.
- Anschütz U, Becker D. Going beyond nutrition: Regulation of potassium homeostasis as a common denominator of plant adaptive responses to environment. *J. Plant Physiol.* 2014; 171: 670–87.
- Arnhold E. Pacote em ambiente R para análise de variância e análises complementares. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2013;50:488-92.
- Attaran E, Major IT, Cruz JA, Rosa BA, Koo AJK, Chen J, Kramer DM, He SY, Howe G. Temporal dynamics of growth and photosynthesis suppression in response to jasmonate signaling. *Plant Physiol.* 2014; 165: 1302-14.
- Bernacci LC, Soares-Scott MD, Junqueira NTV, Passos IRS, Meletti LMM. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). *Rev. Bras. Frutic.* 2008; 30: 566-76.
- Blée E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* 2002; 7: 315-22.
- Bohler S, Bagard M, Oufir M, Planchon S, Hoffmann L, Jolivet Y, Hausman JF, Dizengremel P, Renaut J. A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics* 2007; 7: 1584–99.
- Bodzon-Kulakowska A, Anna Bierzynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Piotr Suder P, Noga M, Jarzebinska J, Silberring J (2007). Methods for samples preparation in proteomic research. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 849: 1–31.
- Botelho-Junior S, Machado OLT, Fernandes KVS, Lemos FJA, Perdizio VA, Oliveira AEA, Monteiro LR, Filho ML, Jacinto T. Defense response in non-genomic model species: methyl jasmonate exposure reveals the passion fruit leaves' ability to assemble a cocktail of functionally diversified Kunitz-type trypsin inhibitors and recruit two of them against papain. *Planta* 2014; 240: 345-56.
- Botelho-Júnior S, Siqueira-Júnior CL, Jardim BC, Machado OLT, Neves-Ferreira AGC, Perales J, Jacinto T. Trypsin inhibitors in passion fruit (*passiflora f. edulisflavicarpa*) leaves: accumulation in response to methyl jasmonate, mechanical wounding, and herbivory. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 9404-09.

Cavalcante FML, Almeida IV, Melo KA, Panizzon CPNB, Rhoden AS, Pamphile JA. Interação patógeno planta: respostas frente ao ataque. Rev. Saúde e Biol. 2013; 8:90-97.

Cervi, AC (1997). *Passifloraceae* do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. *Fontqueria*, 45: 1-92.

Cipriano AKAL, Gondim DMF, Vasconcelos IM, Martins JAM, Moura AA, Moreno FB, Moreira ACOM, Melo JGM, Cardoso JE, Paiva ALS, Oliveira JTA. Proteomic analysis of responsive stem proteins of resistant and susceptible cashew plants after *Lasiodiplodia theobromae* infection. J. Proteomics 2015; 113: 90–109.

Chil F, Yang P, Han F, Jing Y, Shen S. Proteomic analysis of rice seedlings infected by *Sinorhizobium meliloti* 1021. Proteomics 2010; 10: 1861–74.

Coelho AA, Cenci AS, Resende ED (2011) Rendimento em suco e resíduos do maracujá em função do tamanho dos frutos em diferentes pontos de colheita para o armazenamento. Rev. Bras. Prod. Agroin. 2011; 13:55-63.

Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014.

Dalio RJD. Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp. and European beech (*Fagus sylvatica* L.). Ph.D. Thesis. Technische Universitaet Muenchen (TUM), 2013; Freising, Germany.

Deng G, Liu LJ, Zhong XY, Lao CY, Wang HY, Wang B, Zhu C, Shah F, Peng DX. Comparative proteome analysis of the response of ramie under N, P and K deficiency. *Planta* 2014; 239: 1175-86.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 82:47-95.

Dueckershoff K, Mueller S, Mueller MJ, Reinders J. Impact of cyclopentenone-oxylipins on the proteome of *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1784:1975–85.

Dhawan K, Dhawan S, Sharma A (2004). *Passiflora*: a review update. J. *Ethnopharmacol.* 2004; 94: 1-23.

Embrapa: <https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/maracuja> (25/05/2016).

Fang X, Chen J, Dai L, Ma H, Zhang H, Yang J, Wang F, Yan C. Proteomic dissection of plant responses to various pathogens. *Proteomics* 2015; 15: 1525–1543.

Fekih R, Tamiru M, Kanzaki H, Abe A, Yoshida K, Kanzaki E, Saitoh H, Takagi H, Natsume S, Undan JR, Undan J, Terauchi R. The rice (*Oryza sativa* L.) lesion mimic resembling, which encodes an AAA-type ATPase, is implicated in defense response. *Mol. Genet. Genomics* 2015; 2: 611-22.

Feussner I, Wasternack C. The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev.Plant Biol.* 2002; 53:275–97.

Glauser G, Dubugnon L, Mousavi SAR, Rudaz S, Wolfender JL, Farmer EE. Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 2009; 284:34506–13.

Guan W, Ferry N, Edwards MG, Bell HA, Othman H, Gatehouse A, Gatehouse AMR. Proteomic analysis shows that stress response proteins are significantly up-regulated in resistant diploid wheat (*Triticum monococcum*) in response to attack by the grain aphid (*Sitobion avenae*). *Mol. Breeding* 2015; 35:1-22.

Hajduch M, Ganapathy A, Stein JW, Thelen JJ. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiol.* 2005; 137: 1397–419.

Halfed-Vieira B, Nechet KL. Ocorrência da mancha bacteriana do maracujazeiro em Roraima. *Fitopatol. Bras.* 2003; 2:14.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free radicals biology and medicine*. Oxford: Oxford University, 1995. 346p.

Hammond-Kosac, KE; Jones, J.D.G. 2000. Responses to plant pathogens. In: Buchanam, B.B.; Gruissem, W. & Jones, R.L. (Eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, Maryland: APS Press. 2000: 1102-56.

Jardim BC, Perdizio VA, Berbert-Molina MA, Rodrigues DC, Botelho-Júnior S, Vicente ACP, Hansen E, Otsuki K, Ürményi TP, Jacinto T. Herbivore response in passion fruit (*passiflora edulis* sims) plants: induction of lipoxygenase activity in leaf tissue in response to generalist and specialist insect attack. *Protein Pept. Lett.* 2010; 17: 480-4.

Jellouli N, Salem AB, Jouira AGHB. Research Article Evaluation of Protein Extraction Methods for *Vitis vinifera* Leaf and Root Proteome Analysis by Two-Dimensional Electrophoresis. *J. Integr.Plant Biol.* 2010; 52: 933–40.

Jha LL, Shah D, Rajesh KS. Transgenic *lycopersicum esculentum mill* (tomato) plant as bioreactor for the production of human neutrophil peptide-1 (hnp-1): a useful protein based pharmaceutical. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2014; 5: 3209-15.

Kastner, J; Knorre, DV; Himanshu, H; Erb, M; Baldwin, IT, Meldau S Salicylic Acid, a Plant Defense Hormone, Is Specifically Secreted by a Molluscan Herbivore. *Plos one.* 2014; 9.

Kosová K, Vítámvás P, Planchon S, Renaut J, Vanková R, Prášil IT. Proteome analysis of cold response in spring and winter wheat (*Triticum aestivum*) crowns reveals similarities in stress adaptation and differences in regulatory processes between the growth habits. *J. Proteome Res.* 2013; 11:4830-45.

Lau D, Oliveira JCF, Lau EY, Brommonschenkel S.H. Hipersensibilidade e necrose sistêmica em *Nicotiana benthamiana* transformada com o gene de resistência *sw-5* de tomateiro. *Fitopatol. Bras.* 2006; 31:247-53.

Li W, You-Ping X, Yang P, Gong-You C, Xin-Zhong C. Hydrogen peroxide is indispensable to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*-induced hypersensitive response and nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana*. *Australasian Plant Pathol.* 2015; 44: 611-7.

Liao M, Li Y, Wang Z. Identification of elicitor-responsive proteins in rice leaves by a proteomic approach. *Proteomics* 2009; 9: 2809–19.

Lippert D, Chowrira S, Ralph SG, Zuang J, Aeschliman D, Ritland C, Ritland K, Bohlmann J. Conifer defense against insects: Proteome analysis of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) bark induced by mechanical wounding or feeding by white pine weevils (*Pissodes strobi*). *Proteomics* 2007; 7: 248-70.

Ma H, Yang R, Song L, Yang Y, Wang Q, Wang Z, Ren C, Ma H. Differential proteomic analysis of salt stress response in jute (*Corchorus capsularis* & *olitorius* L.) seedling roots. *Pak. J. Bot.* 2015; 47:385-96.

Maldonado-Cervantes E, Huerta-Ocampo JA, Montero-Morán GM, Barrera-Pacheco A, Espitia-Rangel E, la Rosa APB. Characterization of *Amaranthus cruentus* L. seed proteins by 2-DE and LC/MSeMS: Identification and cloning of a novel late embryogenesis-abundant protein. *J Cereal Sci.* 2014; 60:172-78.

Markiewicz M, Michalczyk L. Molecular response of resistant and susceptible apple genotypes to *Erwinia amylovora* infection. *Eur. J. Plant Pathol.* 2015; 143: 515-26.

Marsh E, Alvarez S, Hicks LM, Barbazuk WB, Kovacs WQL, Schachtman D. Changes in protein abundance during powdery mildew infection of leaf tissues of Cabernet Sauvignon grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Proteomics* 2010; 10: 2057–64.

Meletti LMM, Brückner, CH. Melhoramento Genético. In: Brückner, C.H., Picanço, M.C. Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado. Porto Alegre: *Cinco Continentes*, 2001. p. 345-85.

Meng LB, Chen YB, Lu TC, Wang YF, Qian CR, Yu Y, Ge XL, Li XH, Wang BC. A systematic proteomic analysis of NaCl-stressed germinating maize seeds. *Mol. Biol. Rep.* 2014; 41:3431-43.

Molassiotis A, Tanou G, Filippou P, Fotopoulos V. Proteomics in the fruit tree science arena: New insights into fruit defense, development, and ripening. *Proteomics* 2013; 13: 1871–84.

Mostek A, Börner A, Badowiec A, Weidner S. Alterations in root proteome of salt-sensitive and tolerant barley lines under salt stress conditions. *J Plant Physiol.* 2015; 174:166-76.

Moura HFN, Vasconcelos IM, Souza CEA, Silva FDA, Moreno FBMB, Lobo MDP, Moreira ACOM, Moura AA, Costa JH, Oliveira JTA. Proteomics changes during the incompatible interaction between cowpea and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz and Sacc. *Plant Sci.* 2014; 217-218: 158–75.

Munhoz CF, Santos AA, Arenhart RA, Santini L, Monteiro-Vitorello CB, Vieira MLC. Analysis of plant gene expression during passion fruit–*Xanthomonas axonopodis* interaction implicates lipoxygenase 2 in host defence. *Ann. Appl. Biol.* 2015; 167: 135-55.

Neuhoff V, Stamm R, Eibl H. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 1985; 6: 427-48.

Nwugo CC, Lin H, Duan Y, Civerolo EL. The effect of *Candidatus Liberibacter asiaticus*'s infection on the proteomic profiles and nutritional status of pre-symptomatic and symptomatic grapefruit (*Citrus paradisi*) plants. *BMC Plant Biol.* 2013; 13:59.

Oliveira RC, Docê RC, Barros STD (2012). Clarification of passion fruit juice by microfiltration: Analyses of operating parameters, study of membrane fouling and juice quality. *J. Food Eng.* 2012; 11:432-39.

Pan Z, Liu Q, Yun Z, Guan R, Zeng W, Xu Q, Deng X. Comparative proteomics of a lycopene-accumulating mutant reveals the important role of oxidative stress on carotenogenesis in sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] osbeck). *Proteomics* 2009; 9: 5455–70.

Pandey D, Rajendran SRCK, Gaur, Sajeesh PK, Kumar A. Plant Defense Signaling and Responses Against Necrotrophic Fungal Pathogens. *J. Plant Growth Regul.* 2016; 1-16.

Pedreschi R, Lurie S, Hertog M, Nicola B, Mes J, Woltering E. Post-harvest proteomics and food security. *Proteomics* 2013; 13: 1772–83.

Perdizio VA, Machado OLT, Araújo JS, Oliveira AEA, Monteiro LR, Costa MN, Ferreira AT, Perales J, Jacinto T. Critical evaluation of proteomic protocols for passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) leaves, a crop with juice market benefits. *Afr. J. Biotechnol.* 2015; 14: 1662-67.

Rangel M, Machado OLT, da Cunha M, Jacinto T. Accumulation of chloroplast-targeted lipoxygenase in passion fruit leaves in response to methyl jasmonate. *Phytochemistry* 2002; 60: 619–25.

Raven N, Rasche S, Kuehn C, Anderlei T, Klöckner W, Schuster F, Henquet M, Bosch D, Büchs J, Fischer R, Schillberg S. Scaled-up manufacturing of recombinant antibodies produced by plant cells in a 200-L orbitally-shaken disposable bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 2015; 112: 308–21.

Resende MLV; Salgado, SML; Chaves, M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógeno. *Fitopatol. Bras.* 2003; 28:123-30.

Rodrigues JSQ; Pineli LLO; Rodrigues NG; Lima HC; Costa AM; Silva CHO; Junqueira NTV; Chiarello MD. Qualidade sensorial de néctares de maracujás BRS Ouro Vermelho produzidos em diferentes sistemas de cultivo. *Rev.Ceres* 2013; 60: 595-602.

Santos AA, Penha HA, Bellec A, Munhoz CF, Pedrosa-Harand A, Bergès H, Carneiro Vieira MLC. Begin at the beginning: A BAC-end view of the passion fruit (*Passiflora*) genome. *BMC Genomics* 2014; 15: 816.

Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, Chételat A, Cubas P, Farmer EE, Nath U, Weigel D. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol.* 2008.

Schuster A, Davies E. Ribonucleic acid and protein metabolism in *Pea epicotyls*. *Plant Physiol.* 1983; 73: 809-16.

da Silva MAO, Garcia JS, Souza GHMF, Eberlin MN, Gozzo FC, Arruda MAZ. Evaluation of sample preparation protocols for proteomic analysis of sunflower leaves. *Talanta* 2010; 80: 1545–51.

Singh A, Singh S, Singh IK. Recent insights into the molecular mechanism of jasmonate signaling during insect-plant interaction. *Australasian Plant Pathol.* 2016; 45:123-33.

Siqueira-Júnior CL, Jardim BC, Ürményi TP, Vicente ACP, Hansen E, Otsuki K, da Cunha M, Madureira HC, Carvalho DR, Jacinto T. Wound response in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) plants: gene characterization of a novel chloroplast-targeted allene oxide synthase up-regulated by mechanical injury and methyl jasmonate. *Plant Cell Rep.* 2008; 27: 387–97.

Trentin JPR, Dalbosco EZ, Albuquerque NA, Krause DP, Krause W. Qualidade de frutos de maracujá azedo comercializados em tangará da serra. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p. 2014.*

Xiong H, Shen H, Zhang L, Zhang Y, Guo X, Wang P, Duan P, Ji C, Zhong L, Zhang F, Zuo Y. Comparative proteomic analysis for assessment of the ecological significance of maize and peanut intercropping. *J. Proteomics* 2013; 78:447-60.

Wang M, Biere A, Van der Putten WH, Bezemer TM. Sequential effects of root and foliar herbivory on aboveground and belowground induced plant defense responses and insect performance. *Oecologia* 2014; 175: 187-98.

Wang W, Scali M, Spadafora RVA, Sensi E, Mazzuca S, Cresti M. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* 2003; 24: 2369–75.

Wang X, Yang P, Zhang X, Xu Y, Kuang T, Shen S, He Y. Proteomic analysis of the cold stress response in the moss, *Physcomitrella patens*. *Proteomics* 2009; 9: 4529–38.

Wasternack C. Action of jasmonates in plant stress responses and development — Applied aspects. *Biotechnol. Adv.* 2014; 32: 31-9.

Witzel K, Neugart S, Ruppel S, Schreiner M, Wiesner M, Baldermann S (2015). Recent progress in the use of ‘omics technologies in brassicaceous vegetables. *Front. Plant Sci.* 2015; 6:1-14.

Wu MC, Hu HT, Yang L, Yang L. Proteomic analysis of up-accumulated proteins associated with fruit quality during autumn olive (*Elaeagnus umbellata*) fruit ripening. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59: 577-83.

Wu X, Xiong E, Wang W, Scali M, Cresti M. Universal sample preparation method integrating trichloroacetic acid/acetone precipitation with phenol extraction for crop proteomic analysis. *Nat. Protoc.* 2014; 9: 362–74.

Zaccheo PVC, Aguiar RS, Stenzel NMC, Sera T, Neves CSVJ. Produção e características qualitativas dos frutos de híbridos de maracujazeiro-amarelo. *Rev. Bras. Frutic.* 2012; 34:1113-20.

Zhang Y, Li D, Zhang H, Hong Y, Huang L, Liu S, Li X, Ouyang Z, Song F. Tomato histone H2B monoubiquitination enzymes SIHUB1 and SIHUB2 contribute to disease resistance against *Botrytis cinerea* through modulating the balance between SA- and JA/ET mediated signaling pathways. *BMC Plant Biol.* 2015; 15: 252.

Zhou L, Xu H, Mischke S, Meinhardt LW, Zhang D, Zhu X, Li X, Fang W. Exogenous abscisic acid significantly affects proteome in tea plant (*Camellia sinensis*) exposed to drought stress. *Hortic Res.* 2014; 1:14029.