

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS

BIANCA GALÚCIO PEREIRA ARAÚJO

PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE RESISTÊNCIA
DE TOMATEIRO À MURCHA BACTERIANA CAUSADA PELA
Ralstonia pseudosolanacearum

Recife

2022

BIANCA GALÚCIO PEREIRA ARAÚJO

**PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE RESISTÊNCIA
DE TOMATEIRO À MURCHA BACTERIANA CAUSADA PELA
*Ralstonia pseudosolanacearum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Sandes de Carvalho Filho

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho

Co-orientadora: Dr^a. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva

Recife

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A663p Araújo, Bianca
Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum* / Bianca Araújo. - 2022.
101 f. : il.
- Orientador: Jose Luiz Sandes de Carvalho Filho.
Coorientadora: Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho.
Inclui referências.
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas, Recife, 2022.
1. *Solanum lycopersicum*. 2. estresse biótico. 3. proteômica label free. 4. espectrometria de massas. I. Filho, José Luiz Sandes de Carvalho, orient. II. Carvalho, Rejane Rodrigues da Costa e, coorient. III. Título

**PROSPECÇÃO DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE RESISTÊNCIA
DE TOMATEIRO À MURCHA BACTERIANA CAUSADA PELA
*Ralstonia pseudosolanacearum***

BIANCA GALÚCIO PEREIRA ARAÚJO

Tese defendida e aprovada em: 30/06/2022

Banca Examinadora:

Dr. José Luiz Sandes de Carvalho Filho

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dr^a. Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dr. Dimas Menezes

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dr. Tercilio Calsa Junior

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. Kleyton Danilo da Silva Costa

Instituto Federal de Alagoas – IFAL

Recife

2022

Dedico esta pesquisa ao Levi Galúcio Pereira Araújo. Sua chegada trouxe o puro amor e a confirmação que tudo tem o tempo certo para acontecer. Agradeço a Deus pelo privilégio de ser sua mãe.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, e por nela proporcionar o encontro com vários seres que me encantaram e me conduziram na escolha da Pesquisa Científica como profissão.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas por proporcionar o aprendizado e o ensino com qualidade.

Ao meu orientador, Professor José Luiz Sandes de Carvalho Filho, pelo encorajamento e apoio em todos os momentos do doutorado.

À minha co-orientadora, Professora Rejane Rodrigues da Costa e Carvalho pelo carinho e por ter sempre palavras de ânimo.

À minha co-orientadora, Professora Fabiana Cavalcante pelo encorajamento e determinação para concretização desta tese.

Ao Professor Tercílio Calsa Júnior, pela generosidade de transmitir o conhecimento em proteômica e me ajudar a construir esta tese, juntamente com sua equipe de alunos.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – Cetene, pelo apoio e viabilização de recursos humanos e financeiros para a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos e colegas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Inpa, do Cetene e da UFRPE, por compartilharem conhecimentos e ensinamentos de profissionalismo e dedicação à pesquisa.

Aos meus pais Janilson Luiz Mendes Pereira e Maria Fátima Galúcio Alegre pelo amor genuíno e por fazerem o melhor, sempre.

Aos meus irmãos Marcelo, Glauce, Hugo, Raul e Davi pelo incentivo e amparo.

Ao meu esposo Esequiel da Silva Araújo pelo companheirismo e suporte diário.

Ao meu filho Levi Galúcio Pereira Araújo por me ensinar a viver o hoje.

A todas as pessoas que contribuíram para a concretização deste sonho,
minha gratidão!

“Um somos Nós.”

Hélio Couto

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Características das cultivares de tomate utilizado no experimento. Recife, 2021.....	32
Tabela 2. DAPs de tomateiro Caline IPA-07 associados com ontologias gênicas (GO) referentes a defesa e resposta a estresse oxidativo e ou biótico, indicadores potenciais de genes biomarcadores funcionais com expressão diferencial na resistência contra <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> . Log ₂ (FC): log ₂ da razão de variação do acúmulo da proteína no tratamento controle em relação ao tratamento infectado (estresse biótico).....	43
Tabela 3. DAPs de tomateiro Yoshimatsu associados com ontologias gênicas (GO) referentes a defesa e resposta a estresse oxidativo e ou biótico, indicadores potenciais de genes biomarcadores funcionais com expressão diferencial na resistência contra <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> . Log ₂ (FC): log ₂ da razão de variação do acúmulo da proteína no tratamento controle em relação ao tratamento infectado (estresse biótico).....	45

CAPÍTULO III

Table 1. Characteristics of tomato cultivars used in the experiment.....	73
Table 2. DAPs of Hawaii 7996 and Yoshimatsu cultivars associated with gene ontologies (GO) referring to defense and response to oxidative and or biotic stress, potential indicators of functional biomarker genes with differential expression in resistance against <i>Ralstonia pseudosolanacearum</i> . Log ₂ (FC): log ₂ of the ratio of variation of protein accumulation in inoculated cultivar Hawaii 7996 relative to inoculated Yoshimatsu.....	80

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Perfil eletroforético da extração de proteínas solúveis totais foliares das cultivares de tomate Yoshimatsu e Caline IPA-7 em resposta à *Ralstonia pseudosolanacearum*, utilizando gel SDS-PAGE 12 %. MM- LMW Calibration (GE Life Sciences); 1 e 2- IPA Controle; 3 e 4- IPA Inoculado; 5 e 6- Yoshimatsu controle, 7 e 8- Yoshimatsu inoculado..... 37
- Figura 2.** Distribuição de proteínas diferencialmente acumuladas nas cultivares de tomate Yoshimatsu e Caline IPA-7 em resposta à *Ralstonia pseudosolanacearum*, utilizando o software Perseus. Ptn: Proteína; DAP: Proteínas diferencialmente acumuladas; C: Controle; I: Inoculado..... 39
- Figura 3.** Análise de ontologia gênica por processo biológico da cultivar Caline IPA-7 em resposta à *Ralstonia pseudosolanacearum*. OPP: oxidative pentose phosphate pathway; TCA/org: tricarboxylic/organic acid; Miscellaneous: represent instances that do not belong to any of its siblings..... 41
- Figura 4.** Análise de ontologia gênica por processo biológico da cultivar Yoshimatsu em resposta à *Ralstonia pseudosolanacearum*. OPP: oxidative pentose phosphate pathway; TCA/org: tricarboxylic/organic acid; Miscellaneous: represent instances that do not belong to any of its siblings..... 42
- Figura 5.** Distribuição de DAPs em categorias de enzimas das cultivares Yoshimatsu e Caline IPA-07 em resposta à *Ralstonia pseudosolanacearum*..... 49

CAPÍTULO III

- Figure 1.** Gene ontology analysis by biological process of cultivar Hawaii 7996 in response to *Ralstonia pseudosolanacearum*..... 84
- Figure 2.** Gene ontology analysis by biological process of cultivar Yoshimatsu in response to *Ralstonia pseudosolanacearum*..... 84
- Figure 3.** Protein-protein interactions obtained in String software. Hawaii 7996 (A) and

Yoshimatsu (B) cultivars in response to *Ralstonia* 86
pseudosolanacearum.....

Figure 4. GO term distribution after enrichment analysis of cultivar Hawaii 7996 in response to *Ralstonia pseudosolanacearum*. A) Dot plot of biological process GO terms; B) Correlation network among identified 87 categories.....

Figure 5. Distribution of GO terms after enrichment analysis of cultivar Yoshimatsu in response to *Ralstonia pseudosolanacearum*. A) Dot plot of biological process GO terms; B) Correlation network among the identified 88 categories.....

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 <i>Importância econômica do tomateiro</i>	16
2.2 <i>Murcha bacteriana do tomate</i>	17
2.3 <i>Melhoramento genético do tomate para resistência à murcha bacteriana</i>	18
2.4 <i>Aplicação da análise proteômica no melhoramento genético do tomate</i>	20
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO II	26
RESUMO	27
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 <i>Material biológico</i>	31
2.2 <i>Delineamento experimental</i>	32
2.3 <i>Condições de crescimento das cultivares e inoculação</i>	33
2.4 <i>Extração e quantificação de proteínas solúveis totais</i>	34
2.5 <i>Digestão trípica</i>	35
2.6 <i>Espectrometria de massas nano-LC-MS/MS e identificação das proteínas</i>	35
2.6.1 <i>Análise de dados</i>	36
2.7 <i>Ontologia gênica</i>	36
3 RESULTADOS	37
3.1 <i>Extração de proteínas totais</i>	37
3.2 <i>Identificação das DAPs</i>	38
3.3 <i>Ontologia gênica</i>	39
4 DISCUSSÃO	50

<i>4.1 Proteínas diferencialmente acumuladas na cultivar Caline Ipa-7</i>	50
<i>4.2 Proteínas diferencialmente acumuladas na cultivar Yoshimatsu</i>	52
<i>4.3 Proteínas com atividade enzimática</i>	59
<i>4.4 Ontologia gênica</i>	59
5 CONCLUSÕES	60
6 REFERÊNCIAS	62
CAPÍTULO III	69
1. Introduction	71
2. Materials and methods	73
3. Results	79
4. Discussion	89
5. Conclusions	93
References	93
CONSIDERAÇÕES FINAIS	101

**Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência
de tomateiro à murcha bacteriana causada pela
*Ralstonia pseudosolanacearum***

RESUMO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças de maior importância econômica no mundo. *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rp*) é uma bactéria fitopatogênica que infecta o xilema de plantas, causando a devastadora doença conhecida como murcha bacteriana (MB), que ataca mais de 200 espécies vegetais em todo o mundo. O objetivo desse trabalho foi esclarecer os mecanismos de resistência e susceptibilidade, a nível proteômico, de duas cultivares resistentes a *Rp*: Hawaii 7996 e Yoshimatsu e uma susceptível Caline IPA-7, em resposta a inoculação da estirpe CCRMRs202 de *Rp*, aos quatro dias após inoculação. A metodologia consistiu na extração das proteínas solúveis totais, injeção em espectrômetro de massas nano-LC-MS/MS, análise dos espectros obtidos e identificação das proteínas no software MaxQuant, análise estatística e seleção de proteínas diferencialmente acumuladas entre os tratamentos no software Perseus e categorização por ontologia gênica no Uniprot e Blast2GO v. 6.0. Foi obtido um total de 1385 proteínas no comparativo das cultivares Yoshimatsu e Caline IPA-7 e 1306 proteínas no comparativo entre as cultivares Hawaii 7996 e Yoshimatsu. Destas, foram selecionadas por ontologia gênica, as diretamente ligadas à resposta de defesa. Identificou-se diversas proteínas relacionadas à patogênese (PRs) que possuem ação antimicrobiana, destacando-se as PR1, PR5, PR10 e PR14; a proteína universal do estresse (PHOs/USP), conhecida por promover resistência a estresses múltiplos, regulação da homeostase de ROS e regulação do crescimento/desenvolvimento das plantas; as anexinas, relacionadas ao sistema antioxidante, além da pectinesterase e xiloglucana endotransglicosilase (XET), ambas relacionadas à parede celular. O acúmulo delas, seja de forma exclusiva ou diferenciada nas cultivares sob estresse amplia o entendimento para diferentes estratégias de resistência ao patógeno, podendo contribuir de forma significativa nos programas de melhoramento genético do tomateiro em um processo de seleção assistida de genótipos resistentes à murcha bacteriana.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*; estresse biótico; proteômica label free; espectrometria de massas.

**Prospecting molecular biomarkers of resistance
from tomato to bacterial wilt caused by
*Ralstonia pseudosolanacearum***

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most economically important vegetables in the world. *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rp*) is a phytopathogenic bacterium that infects the xylem of plants, causing the devastating disease known as bacterial wilt (MB), which attacks more than 200 plant species worldwide. The objective of this work was to clarify the mechanisms of resistance and susceptibility, at the proteomic level, of two cultivars resistant to *Rp*: Hawaii 7996 and Yoshimatsu and a susceptible Caline IPA-7, in response to inoculation of the strain CCRMRs202 of *Rp*, at four days after inoculation. The methodology consisted of the extraction of total soluble proteins, injection into a nano-LC-MS/MS mass spectrometer, analysis of the spectra obtained and identification of proteins in MaxQuant software, statistical analysis and selection of proteins differentially accumulated between treatments in Perseus and categorization by gene ontology in UniProt and Blast2GO v. 6.0. A total of 1385 proteins were obtained when comparing the cultivars Yoshimatsu and Caline IPA-7 and 1306 proteins when comparing the cultivars Hawaii 7996 and Yoshimatsu. Of these, those directly linked to the defense response were selected by gene ontology. Several proteins related to pathogenesis (PR-proteins) that have antimicrobial action were identified, including PR1, PR5, PR10 and PR14; the universal stress protein (PHOs/USP), known to promote resistance to multiple stresses, regulation of ROS homeostasis and regulation of plant growth/development; the annexins, related to the anti-oxidant system and pectinoesterase e xyloglucan endotransglucosylase (XET), both related to the cell wall. Their accumulation, either exclusively or differently in cultivars under stress, broadens the understanding of different strategies of resistance to the pathogen, and can significantly contribute to tomato genetic improvement programs in a process of assisted selection of genotypes resistant to bacterial wilt.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; biotic stress; label-free proteomics; mass spectrometry.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL REFERENCIAL TEÓRICO

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.), solanácea originária da América do Sul, é a segunda hortaliça mais utilizada no mundo. Além de seu valor econômico, possui características de desenvolvimento interessantes, como: folhas compostas, frutos carnosos e ramificação de brotos simpodiais. Além disso, possui genética diploide simples, ciclo de vida curto, rotina de transformação genética e fácil manutenção. Essas características juntas fazem do tomate uma espécie excelente, tanto para pesquisa básica quanto aplicada de plantas (Ranjan et al. 2012).

Entre os principais limitadores da expansão da tomaticultura estão as doenças causadas por fitopatógenos e nelas destaca-se a murcha bacteriana. Os sintomas característicos são inicialmente murcha verde nos ramos terminais que avançam para murcha total da planta seguida de morte. Ainda se observa internamente o escurecimento dos vasos condutores do xilema que é resultante da interrupção parcial ou total do fluxo de água desde as raízes até a parte superior da mesma (Lopes et al. 2015). O escurecimento é decorrente do transporte de substâncias resultantes da oxidação de fenóis, originando melanina (Amorim et al. 2011).

A murcha bacteriana pode ser causada por um complexo de espécies bacterianas do gênero *Ralstonia* (*Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia pseudosolanacearum* e *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis*), não havendo relatos de ocorrência desta última bactéria no Brasil (Santiago et al. 2016). A murcha bacteriana apresenta distribuição mundial com ampla e crescente gama de hospedeiros, ocorrendo em mais de 54 famílias botânicas, compreendendo mais de 200 espécies de plantas, entre monocotiledôneas e dicotiledôneas (Elphinstone 2005, Wicker et al. 2007). No cultivo do tomateiro essa doença bacteriana é fator limitante em regiões tropicais, inviabilizando a produção em partes da região Norte e

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Nordeste do Brasil e a expansão em áreas cultivadas em estufas (Coelho Netto et al. 2004). Segundo as Regiões Geográficas Intermediárias do Estado de Pernambuco (IBGE 2017b), prevalece *R. solanacearum* em Petrolina e Serra Talhada e *R. pseudosolanacearum* em Caruaru e Recife (Silva 2014, Santiago et al. 2016, Albuquerque et al. 2017).

O controle da murcha bacteriana, após sua manifestação no campo, torna-se muito difícil. Por isso, é recomendada a adoção do manejo integrado, pela adoção de medidas preventivas e complementares de controle, uma vez que a prática de medidas isoladas não é eficiente para evitar as perdas, sobretudo quando as condições ambientais forem favoráveis à doença (Lopes 2009). Neste sentido, o melhoramento genético para a resistência à murcha bacteriana é considerado uma medida eficiente para um controle duradouro (Hayward 1991). Apesar disso, a quebra da resistência ocorre frequentemente devido à plasticidade genômica e fenotípica dentro do complexo de espécies *Ralstonia* (Toukam et al. 2009). Isso acontece devido ao fato de genótipos considerados resistentes à murcha bacteriana em uma determinada área geográfica poderem ser suscetíveis em outra área devido à influência ambiental e a variações das populações de patógenos ali existentes (Hayward 1991).

Embora a busca tenha sido uma prioridade em vários programas de melhoramento, existem poucas cultivares comerciais de solanáceas com nível adequado de resistência à murcha bacteriana (Wiker et al. 2007, Zohoungbogbo et al. 2021). Nos Estados Unidos da América a cultivar Hawaii 7996 é considerada o padrão internacional de resistência à murcha bacteriana. No Brasil, a cultivar Yoshimatsu, apresenta resistência a murcha, no entanto, Yuliar et al. (2015) relataram que alguns alelos responsáveis pela resistência a murcha se relacionam negativamente com a produtividade e qualidade dos frutos, o que inviabiliza a aceitação desses possíveis cultivares por produtores e consumidores. A cultivar

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Caline IPA-7, desenvolvida pelo Instituto Agronômico de Pernambuco, apresenta bom desempenho agronômico e características dos frutos, porém susceptibilidade à murcha bacteriana (Karasawa et al. 2012).

As alterações morfológicas e fisiológicas, bem como os ajustes metabólicos nas plantas diante de fatores estressantes são orquestrados e regulados por diversas alterações moleculares que são alvos de diversos estudos, visando principalmente o melhoramento (Afroz et al. 2009, Prior et al. 2016, Planas-Marquès et al. 2018). O estudo do perfil proteico durante a infecção pode identificar proteínas específicas relacionadas a vias metabólicas diretamente associadas aos mecanismos de resistência e suscetibilidade às doenças. Neste cenário abordagens proteômicas, especialmente metodologias em larga escala (*shotgun*), tem grande potencial em serem utilizadas visando a prospecção e identificação de biomarcadores funcionais (Salgotra e Stewart 2020).

A vantagem dos marcadores funcionais sobre outros marcadores usados no melhoramento de plantas é a proximidade da associação genômica de um marcador funcional com um fenótipo. Assim, os marcadores funcionais permitem acelerar a seleção direta de genes associados a características fenotípicas, que servem para aumentar a eficiência de seleção para desenvolver cultivares elite (Afroz et al. 2009, Planas-Marquès et al. 2018). A integração de dados agronômicos e ômicos-moleculares permitem dessa forma orientar o melhoramento genético de plantas em um contexto de seleção assistida (Salgotra e Stewart 2020) para o desenvolvimento de cultivares mais resistentes e contribuindo para melhoria da segurança alimentar.

Este é o primeiro relato de estudo proteômico *shotgun* utilizando cultivares do Norte/Nordeste do Brasil em resposta à *Rp* visando à identificação de biomarcadores funcionais com vista à recente abordagem de melhoramento de precisão. Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo comparar, a nível proteômico, três cultivares de tomate, sendo duas resistentes (Hawaii e

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Yoshimatsu) e uma susceptível (Caline IPA-7) em resposta a fitobactéria *Ralstonia pseudosolanacearum* visando a prospecção de candidatos a biomarcadores moleculares com o intuito de serem utilizados em seleção assistida pelos programas de melhoramento genético de plantas que trabalham com a busca de cultivares resistentes à murcha bacteriana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica do tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) produz o fruto mais consumido mundialmente – o tomate, e cultivado em praticamente todas as regiões geográficas do planeta. Possui importância econômica, nutricional e científica (FAO 2020).

Os maiores produtores mundiais de tomate são China, Índia, Turquia, Estados Unidos da América, Egito, Itália, Irã, Espanha e México, que juntos representam cerca de 70% da produção mundial. Nesta classificação, a China ocupa o 1º lugar, produzindo 34,67% do volume total colhido no mundo, que equivale a cerca de 186.821,22 milhões de quilos ao ano, enquanto o Brasil ocupa a 10ª posição, com 3,753.595 Kg ao ano. A área cultivada chegou a 5.051.983 hectares, com rendimento médio por metro quadrado de 3,71 kg de tomate ante os 3,59 kg de 2019 (FAO 2020).

O Nordeste brasileiro apresentou uma participação de 13,3% da produção de tomate no Brasil com 502.582 toneladas e rendimento de 42.316 t ha⁻¹. O estado de Pernambuco foi o 3º maior produtor do Nordeste, ficando atrás dos estados da Bahia e Ceará, e o 11º maior produtor nacional. Sua área de cultivo foi de 2.464 ha, com 90.133 toneladas e rendimento médio de 36.580 kg ha⁻¹, correspondendo a 2,4% da produção nacional de tomate (IBGE 2017a).

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

2.2 Murcha bacteriana do tomate

Entre os principais limitadores do aumento da produção de tomateiro estão as doenças causadas por fitopatógenos e nelas destaca-se a murcha bacteriana. A murcha bacteriana é limitante ao cultivo do tomateiro principalmente em regiões tropicais, inviabilizando a produção em partes da região Norte e Nordeste do Brasil e a expansão em áreas cultivadas sob ambiente protegido. Os sintomas característicos são inicialmente murcha verde nos ramos terminais que avançam para murcha total da planta e escurecimento dos vasos condutores (Lopes et al. 2015).

A murcha bacteriana é causada por um complexo de espécies bacterianas do gênero *Ralstonia* (*Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* e *R. syzygii*), sendo as duas primeiras de ocorrência no Brasil e a terceira principalmente na Indonésia (Safni et al. 2014). Em Pernambuco prevalece *R. solanacearum* nas mesorregiões do Sertão e São Francisco e *R. pseudosolanacearum* na região do Agreste e Zona da Mata (Silva 2014, Santiago et al. 2016, Albuquerque et al. 2017).

O complexo *Ralstonia* causa doença em mais de 200 espécies de plantas, englobando aproximadamente 50 famílias botânicas (Hayward e Hartman 1994). Em razão da sua importância, *R. solanacearum* foi um dos primeiros patógenos de plantas com o genoma totalmente sequenciado (Denny 2006).

Devido ao grande número de organismos infectantes, o tomateiro também apresenta um grande potencial científico, como espécie-modelo no estudo da interação planta-patógeno, onde associado ao fato de que o genoma do tomate já está sequenciado, permitirá grandes avanços no manejo dessa planta e por ser cultivado em todo mundo, possui vários patógenos específicos para cada região, permitindo assim que cada país possa estudar a interação do tomateiro com os organismos nativos (Tomato Genome Consortium, 2012).

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

2.3 Melhoramento genético do tomate para resistência à murcha bacteriana

O melhoramento genético para a resistência à murcha bacteriana é considerado uma medida eficiente de controle e deve ser regionalizado (Hayward 1991). No entanto, a quebra da resistência ocorre frequentemente devido à plasticidade genômica e fenotípica dentro do complexo de espécies *Ralstonia* (Toukam et al. 2009). Isso acontece devido ao fato de genótipos considerados resistentes à murcha bacteriana em uma determinada área geográfica poderem ser suscetíveis em outra área devido à influência ambiental e a variações das populações do patógeno ali existentes (Hayward, 1991).

A obtenção de cultivares de tomateiros que expressem o caráter de resistência à murcha bacteriana é de extrema importância, já que o tratamento químico não demonstra resultado satisfatório no controle da doença. A universidade do Hawaii - EUA realizou pesquisas objetivando a obtenção genótipos resistentes à murcha bacteriana, obtendo as cultivares resistentes Hawaii 7996, Hawaii 7997 e Hawaii 7998, todas têm como genitor comum o acesso PI 127805A pertencente à espécie *Solanum pimpinellifolium* L. Em experimentos realizados em 12 países e utilizando 35 genótipos resistentes à murcha bacteriana, a linhagem Hawaii 7996 foi a que apresentou os melhores resultados com valores variando entre 84,8 e 100% de plantas sem sintomas, enquanto a testemunha suscetível apresentou resultados entre 0 e 56%, tornando-se padrão internacional de resistência. Foram identificados vários QTL's (Quantitative Trait Loci) ligados à resistência e os de efeito maior estão localizados nos cromossomos 6 (*Bwr-6*) e 12 (*Bwr-12*) (Wang et al. 1998, Wang et al. 2013, Lopes et al. 2015). O QTL *Bwr-12* atua na supressão da multiplicação do patógeno na haste do tomateiro, resultando numa menor incidência da doença. Por meio desses resultados foi possível confirmar a natureza poligênica da resistência,

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

bem como a maior estabilidade garantida pelos alelos presentes em Hawaii 7996 (Wang et al. 2013).

O Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA iniciou na década de 1970 seu programa de melhoramento de tomateiro, no qual um dos objetivos foi a obtenção de genótipos resistentes à murcha bacteriana, utilizando genótipos não comerciais do estado do Hawaii (EUA) e da Guiana Francesa como fonte de resistência. O que resultou no lançamento da cultivar Yoshimatsu, originada do cruzamento de IH-40 com UH-7976, apresentando resistência governada por mais de um gene ou bloco gênico com dominância, além de efeitos aditivos no aumento do caráter. Posteriormente, as pesquisas do INPA foram direcionadas no sentido de melhorar as características agrônômicas relacionadas à qualidade do fruto (Noda 2009).

Yuliar et al. (2015) relataram que alguns alelos responsáveis pela resistência a murcha se relacionam negativamente com a produtividade e qualidade dos frutos, o que inviabiliza a aceitação desses possíveis cultivares por produtores e consumidores.

Em estudos realizados por Costa et al. (2018), o controle genético da resistência da cultivar Yoshimatsu à *R. pseudosolanacearum* envolve dois genes de efeito maior com segregação independente de efeitos aditivos e de dominância, em que a resistência está associada a alelos recessivos e que para *R. solanacearum* a resistência envolve dois genes de efeito maior com segregação independente de efeitos aditivos e de dominância, mais poligenes com efeitos aditivos e de dominância, em que a resistência também está associada a alelos recessivos.

Ao testar isolados do complexo de espécies de *Ralstonia* em genótipos de *S. peruvianum*, Rossato (2016) observou um possível envolvimento de diferentes mecanismos de resistência. Este conhecimento é um forte indicador que as

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

cultivares atualmente disponíveis como resistentes apresentaram resistências distintas e que novas fontes de resistência possam ser encontradas.

A cultivar IPA-7, desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco, apresenta boas características de fruto, porém susceptibilidade a murcha bacteriana. A cultivar Yoshimatsu apresenta potencial para a extração de linhagens que combinem a resistência com boas produtividades e características agrônômicas. Entretanto, é preciso entender se a característica de fruto rachado está associada à resistência desta cultivar por meio dos isolados de *R. pseudosolanacearum* e *R. solanacearum* representativos do Estado de Pernambuco. Além disso, as mudanças na classificação das espécies do complexo *Ralstonia* oferecem uma nova oportunidade de avaliar as fontes de resistência.

Afroz et al. (2009) investigaram a proteômica comparativa de quatro cultivares de tomate que revelou que um grupo de chaperonas moleculares como HSP70, chaperonina de 60 kDa e proteína dissulfeto isomerase, e um antígeno de membrana apical foram significativamente acumulados em cultivares resistentes em comparação com cultivares suscetíveis que pode fornecer um sistema de defesa aprimorado contra a infecção por *Ralstonia solanacearum*.

2.4 Aplicação da análise proteômica no melhoramento genético do tomate

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

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

últimos anos vários estudos têm focado a caracterização da dinâmica de proteínas ao longo do desenvolvimento vegetal, associada à caracterização do genoma e transcriptoma (Planas-Marquès et al. 2018).

Em *Solanum tuberosum* L., a análise de 2-DE e MALDI-ToF/ToF-MS identificou oito proteínas diferentes expressas, incluindo proteína de ligação a RNA rica em glicina (GRP), proteína induzida por estresse de tomate-1 (TSI-1), proteína relacionada à patogênese (STH-2) e repetição de pentatricopeptídeo contendo proteína (PPR) em resposta à infecção por *R. solanacearum*. Em cultivares de Hawaii 7996 e Marmande foi revelada especificidade de ativação de proteases de cisteína do tipo papaína (PLCPs) e hidrolases de serina (SHs) na folha e sugere que a cultivar tolerante pode estar mais preparada para enfrentar *R. solanacearum* em sua parte basal (Prior et al. 2016, Planas-Marquès et al. 2018).

As abordagens proteômicas funcionais descritas acima são apenas algumas das tecnologias que estão sendo aplicadas para obter novos insights sobre diversos patossistemas de plantas. O estudo do perfil do proteoma durante a infecção pode identificar proteínas específicas e vias biológicas que contribuem para a resistência e suscetibilidade a doenças. A integração de dados agronômicos com dados ômicos/moleculares podem orientar o melhoramento genético de plantas para o desenvolvimento de cultivares mais resistentes e contribuindo para melhoria da segurança alimentar.

Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo comparar, a nível proteômico, três cultivares de tomate, sendo duas resistentes (Hawaii e Yoshimatsu) e uma susceptível (Caline IPA-7) em resposta à fitobactéria *Ralstonia pseudosolanacearum* visando à prospecção de candidatos a biomarcadores moleculares com o intuito de serem utilizados em seleção assistida pelos programas de melhoramento genético de plantas que trabalham com a busca de cultivares resistentes à murcha bacteriana.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afroz A, Khan MR, Ahsan N and Komatsu S (2009) Comparative proteomic analysis of bacterial wilt susceptible and resistant tomato cultivars. **Peptides** **30(9)**: 1600-1607.
- Albuquerque GMR, Souza EB, Silva AMF, Lopes CA, Boiteux LS and Fonseca MEN (2017) Genome sequence of *Ralstonia pseudosolanacearum* strains with compatible and incompatible interactions with the major tomato resistance source Hawaii 7996. **Genome Announcements** **5(36)**: e00982-17.
- Amorim L, Rezende JAM and Bergamin Filho A (2011) **Manual de Fitopatologia**. Agronômica Ceres, São Paulo, 704p.
- Coelho Netto RA, Pereira BG, Noda H and Boher B (2004) Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira** **29**: 17-23.
- Costa KDS, Santos AMM, Santos PR, Nascimento MR, Silva AMF, Albuquerque GMR, Batista RO, Pereira JWL and Carvalho Filho JLS (2018) Inheritance of resistance to *Ralstonia pseudosolanacearum* in tomato. **Euphytica** **214(8)**: 137.
- Denny TP (2006) Plant pathogenic *Ralstonia* species. In Gnanamanickam SS (ed) **Plant-associated bacteria**. Springer Publishing, Dordrecht, The Netherlands, p. 573-644.
- Elphinstone JG (2005) The current bacterial wilt situation: a global overview. In Allen C, Prior P and Hayward AC (eds) **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**. APS Press, Saint Paul, p. 9-28.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020) **Statistics division**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 29 de junho de 2020.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology** 29(1): 65-87.

Hayward AC and Hartman GL (1994) Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. In Bacterial wilt: the disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017a). **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. IBGE, Rio de Janeiro, 86p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017b) **Divisão regional do Brasil em regiões geográficas imediatas e regiões geográficas intermediárias**. IBGE, Coordenação de Geografia, Rio de Janeiro, 82p.

Karasawa M, Ferraz E, Silva DJ and Araújo ARL (2012) Desempenho produtivo de linhagens, cultivares e híbridos de tomateiro rasteiro cultivados por gotejamento. **Horticultura Brasileira** 30: 3529-3533.

Lopes CA, Boiteux LS and Eschembaack V (2015) Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira** 33: 125-130.

Lopes CA (2009) **Murcha bacteriana ou murchadeira – uma inimiga do tomateiro em climas quentes**. Embrapa Hortaliças, Brasília, Circular Técnica 67, 8p.

Noda H (2009) **Melhoramento de hortaliças em climas desfavoráveis: o desafio do desenvolvimento de cultivares adaptadas à Amazônia**. Simpósio Nordeste de Genética e Melhoramento de Plantas.

Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B and Allen C (2016) Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. **BMC Genomics** 17: 90.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Planas-Marquès M, Bernardo-Faura M, Paulus J, Kaschani F, Kaiser M, Valls M, van der Hoorn RAL and Coll NS (2018) Protease activities triggered by *Ralstonia solanacearum* infection in susceptible and tolerant tomato lines. **Molecular & Cellular Proteomics** **17(6)**: 1112-1125.

Ranjan A, Ichihashi Y and Sinha NR (2012) The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. **Genome Biology** **13**: 167.

Rossato M (2006) **Espécies de *Ralstonia* no Brasil: caracterização fenotípica, molecular, novas fontes de resistência em tomateiro e patogenicidade em cafeeiro**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 165p.

Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L and Kappler U (2014) Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** **64(9)**: 3087-3103.

Salgotra RK and Stewart Jr. CN (2020) Functional markers for precision plant breeding. **International Journal of Molecular Sciences** **21(13)**: 4792.

Santiago TR, Lopes CA, Caetano-Anollés G and Mizubuti ESG (2017) Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. **Plant Pathology** **66(3)**: 383-392.

Silva JR (2014) **Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões Norte e Nordeste do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 48p.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature** 485(7400): 635-641.

Toukam GMS, Cellier G, Wicker E, Guilbaud C, Kahane R, Allen C and Prior P (2009) Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. **Plant Disease** 93: 1123-1130.

Wang J-F, Ho FI, Truong HTH, Huang S-M, Balatero CH, Dittapongpitch V and Hidayati N (2013) Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar 'Hawaii 7996' to *Ralstonia solanacearum*. **Euphytica** 190(2): 241-252.

Wang J-F, Thoquet P, Olivier J and Grimsley N (1998) Genetic analysis of quantitative resistance loci (QRL) of tomato variety Hawaii 7996 in Taiwan. In Prior P, Allen C, and Elphinstone J (eds) **Bacterial wilt disease**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 245-249.

Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M and Prior P (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology** 73(21): 6790-6801.

Yuliar, Nion YA and Toyota K (2015) Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. **Microbes and Environments** 30(1): 1-11.

Zohoungbogbo H, Quenum A, Honfoga J, Chen J-R, Achigan-Dako E, Kenyon L and Hanson P (2021) Evaluation of resistance sources of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to phylotype I strains of *Ralstonia solanacearum* species complex in Benin. **Agronomy** 11(8): 1513.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

CAPÍTULO II

SELEÇÃO DE MARCADORES FUNCIONAIS DE TOMATEIRO PARA RESISTÊNCIA À *Ralstonia pseudosolanacearum*

Artigo a ser submetido à revista Crop Breeding and Applied Biotechnology (1518-7853).

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

RESUMO

A infecção do tomateiro por *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rp*) causa a murcha bacteriana, uma doença de distribuição cosmopolita, que coloniza os feixes do xilema e impede o fluxo de seiva, levando rapidamente a planta susceptível à murcha seguida de morte. Objetivando indicar marcadores funcionais úteis na seleção de genótipos resistentes à murcha bacteriana, o presente trabalho investigou o proteoma foliar das cultivares Yoshimatsu (resistente) e Caline IPA-7 (susceptível), em resposta a inoculação da estirpe CCRMRs202 de *Rp*, aos quatro dias após inoculação. A metodologia consistiu na extração das proteínas solúveis totais, injeção em espectrômetro de massas nano-LC-MS/MS, análise dos espectros obtidos e identificação das proteínas no software Maxquant, análise estatística e seleção de proteínas diferencialmente acumuladas entres os tratamentos no software Perseus e categorização por ontologia gênica no Uniprot e Blast2GO. Foi obtido um total de 1385 proteínas e selecionado as diretamente ligadas à resposta de defesa das cultivares Yoshimatsu e Caline IPA-7 quando atacado por *Rp*. Identificou-se diversas proteínas relacionadas à patogênese (PRs) que possuem ação antimicrobiana, destacando-se a PR10 observada exclusivamente na cultivar Yoshimatsu, e a proteína universal do estresse (PHOs/USP), conhecida por promover resistência a estresses múltiplos, regulação da homeostase de ROS e regulação do crescimento/desenvolvimento das plantas. O acúmulo delas no tomateiro sob estresse pode constituir uma importante estratégia de defesa, podendo contribuir de forma significativa nos programas de melhoramento genético do tomateiro em um processo de seleção assistida de genótipos resistentes à murcha bacteriana.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*, estresse biótico, proteômica label free, espectrometria de massas.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.), solanácea originária da América do Sul, espalhou-se pelo mundo para tornar-se uma das hortaliças mais utilizadas. Além de seu valor econômico, possui características de desenvolvimento interessantes, como: folhas compostas, frutos carnosos e ramificação de brotos simpodiais. Além disso, possui genética diplóide simples, ciclo de vida curto, rotina de transformação genética e fácil manutenção. Essas características juntas fazem do tomate uma espécie excelente, tanto para pesquisa básica quanto aplicada de plantas (Ranjan et al. 2012).

Os maiores produtores mundiais de tomate são: China, Índia, Turquia, Estados Unidos da América, Egito, Itália, Irã, Espanha e México, que juntos representam cerca de 70% da produção mundial. Nesta classificação a China ocupa o 1º lugar produzindo 34,67% do volume total colhido no mundo que foi cerca de 186.821,22 milhões de quilos ao ano e o Brasil a 10ª posição com 3,753.595 Kg ao ano. A área cultivada chegou a 5.051.983 hectares, com rendimento médio por metro quadrado de 3,71 kg de tomate ante os 3,59 kg de 2019 (FAO 2018).

O Nordeste brasileiro apresentou uma participação de 13,3% da produção de tomate no Brasil com 502.582 toneladas e rendimento de 42.316 t ha⁻¹. O estado de Pernambuco foi o 3º maior produtor do Nordeste, ficando atrás dos estados da Bahia e Ceará, e ocupando 11º lugar em produtor nacional. Sua área de cultivo foi de 2.464 ha, com 90.133 toneladas e rendimento médio de 36.580 kg ha⁻¹, correspondendo a 2,4% da produção nacional de tomate (IBGE 2017a).

Entre os principais limitadores da expansão da tomaticultura estão as doenças causadas por fitopatógenos e nelas destaca-se a murcha bacteriana. Os sintomas característicos são inicialmente murcha verde nos ramos terminais que avançam para murcha total da planta seguida de morte. Ainda se observa internamente o escurecimento dos vasos condutores do xilema que é resultante da

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

interrupção parcial ou total do fluxo de água desde as raízes até a parte superior da mesma (Lopes et al. 2015). O escurecimento é decorrente do transporte de substâncias resultantes da oxidação de fenóis, originando melanina (Amorim et al. 2011).

A murcha bacteriana pode ser causada por um complexo de espécies bacterianas do gênero *Ralstonia* (*Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia pseudosolanacearum* e *Ralstonia syzygii* subsp. *Indonesiensis*), não havendo relatos de ocorrência desta última bactéria no Brasil (Santiago et al. 2016). A murcha bacteriana apresenta distribuição mundial com ampla e crescente gama de hospedeiros, ocorrendo em mais de 54 famílias botânicas, compreendendo mais de 200 espécies de plantas, entre monocotiledôneas e dicotiledôneas (Elphinstone 2005, Wicker et al. 2007). No cultivo do tomateiro essa doença bacteriana é fator limitante em regiões tropicais, inviabilizando a produção em partes da região Norte e Nordeste do Brasil e a expansão em áreas cultivadas em estufas (Coelho Netto 2004). Segundo as Regiões Geográficas Intermediárias do Estado de Pernambuco (IBGE 2017b), prevalece *R. solanacearum* em Petrolina e Serra Talhada e *R. pseudosolanacearum* em Caruaru e Recife (Santiago et al. 2016, Silva 2014, Albuquerque et al. 2017).

O controle da murcha bacteriana, após sua manifestação no campo, torna-se muito difícil. Por isso, é recomendada a adoção do manejo integrado, pela adoção de medidas preventivas e complementares de controle, uma vez que a prática de medidas isoladas não é eficiente para evitar as perdas, sobretudo quando as condições ambientais forem favoráveis à doença (Lopes 2009). Neste sentido o melhoramento genético para a resistência à murcha bacteriana é considerado uma medida eficiente para um controle duradouro (Hayward 1991). Apesar disso, a quebra da resistência ocorre frequentemente devido à plasticidade genômica e fenotípica dentro do complexo de espécies *Ralstonia* (Toukam et al. 2009). Isso

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

acontece devido ao fato de genótipos considerados resistentes à murcha bacteriana em uma determinada área geográfica poderem ser suscetíveis em outra área devido à influência ambiental e a variações das populações de patógenos ali existentes (Hayward 1991).

Embora a busca tenha sido uma prioridade em vários programas de melhoramento, existem poucas cultivares comerciais de solanáceas com nível adequado de resistência à murcha bacteriana (Wiker et al. 2007, Zohoungbogbo et al. 2021). A cultivar Yoshimatsu, desenvolvida pelo Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA, é originada do cruzamento de IH-40 com UH-7976, apresentando resistência governada por mais de um gene ou bloco gênico com dominância, além de efeitos aditivos no aumento do caráter (Costa et al. 2018, Noda 2009). No entanto, Yuliar e Toyota (2015) relataram que alguns alelos responsáveis pela resistência a murcha se relacionam negativamente com a produtividade e qualidade dos frutos, o que inviabiliza a aceitação desses possíveis cultivares por produtores e consumidores. A cultivar Caline IPA-7, desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco, apresenta bom desempenho agrônomo e características dos frutos, porém susceptibilidade à murcha bacteriana (Karasawa et al. 2012).

As alterações morfológicas e fisiológicas, bem como os ajustes metabólicos nas plantas diante de fatores estressantes são orquestrados e regulados por diversas alterações moleculares que são alvos de diversos estudos, visando principalmente o melhoramento (Afroz et al. 2009, Prior et al. 2016, Planas-Marquès et al. 2018). O estudo do perfil protéico durante a infecção pode identificar proteínas específicas relacionadas a vias metabólicas diretamente associadas aos mecanismos de resistência e susceptibilidade às doenças. Neste cenário abordagens proteômicas, especialmente metodologias em larga escala (*shotgun*), tem grande potencial em serem utilizadas visando a prospecção e identificação de biomarcadores funcionais (Salgotra e Stewart 2020).

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

A vantagem dos marcadores funcionais sobre outros marcadores usados no melhoramento de plantas é a proximidade da associação genômica de um marcador funcional com um fenótipo. Assim, os marcadores funcionais permitem acelerar a seleção direta de genes associados a características fenotípicas, que servem para aumentar a eficiência de seleção para desenvolver cultivares elite (Afroz et al. 2009, Planas-Marquès et al. 2018). A integração de dados agronômicos e omicos-moleculares permitem dessa forma orientar o melhoramento genético de plantas em um contexto de seleção assistida (Salgotra e Stewart 2020). Este é o primeiro relato de estudo proteômico shotgun utilizando cultivares do Norte/Nordeste do Brasil em resposta à *Rp* visando à identificação de biomarcadores funcionais com vista à recente abordagem de melhoramento de precisão.

Dessa forma o objetivo do presente trabalho foi investigar o proteoma foliar das cultivares Yoshimatsu (resistente) e Caline IPA-7 (susceptível), em resposta a inoculação com a estirpe CCRMRs202 de *Ralstonia pseudosolanacearum* e assim indicar biomarcadores funcionais úteis na seleção de genótipos resistentes à murcha bacteriana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico

Foram escolhidas duas cultivares de tomate contrastante em relação à resistência a murcha bacteriana, desenvolvidas para as condições edafoclimáticas das Regiões Norte e Nordeste brasileira. Suas principais características segundo Costa et al. (2014) estão demonstradas na Tabela 1.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Tabela 1. Características das cultivares de tomate utilizado no experimento. Recife, 2021.

Características	Yoshimatsu	Caline IPA-7
Tecnologia	INPA	IPA
Murcha bacteriana	Resistente	Suscetível
Hábito de crescimento	Indeterminado	Determinado
Frutos	Médio, pluriloculados	Médio, bi e trilocolados
Aceitação de Mercado	Baixa	Media

O inóculo selecionado foi de *Ralstonia pseudosolanacearum*, isolado CCRMRs202, Biovar 3, Filotipo 1, Sequevar I-18, hospedeiro de tomateiro e originário do município de Gravatá-PE (pertencente a Coleção de Culturas Rosa Mariano, gentilmente cedido pelo Laboratório de Fitobacteriologia do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE), cuja virulência foi previamente testada.

2.2 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições e 2 plantas por parcela, em casa de vegetação com teto e paredes de plástico filme transparente situada na latitude 8°34'32"S e longitude 34°56'57"O, localizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE (Recife, Pernambuco, Brasil), no período de a 01 julho a 01 de agosto de 2021, com média de temperatura 27,4°C, umidade relativa de 81%, intensidade de luz solar 443,3 w/m² e UVI de 4. Os dados meteorológicos foram obtidos na estação Sainlogic Weather Station (transmissor e receptor), modelo WS3500, frequência 868 MHZ, instalada dentro da casa de vegetação.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

2.3 Condições de crescimento das cultivares e inoculação

A semeadura das cultivares Yoshimatsu e Caline IPA-7 foi realizada em bandeja de 96 células, com duas sementes por célula, contendo substrato comercial. A irrigação foi por aspersão automatizada, segundo a demanda hídrica. Onze dias após a germinação, quando as mudas apresentavam aproximadamente 2 cm de comprimento, foi realizado o desbaste e passou a ser realizada fertirrigação com solução nutritiva (200 g/1.000 L de MAP, 400 g/1.000 L de sulfato de magnésio, 25 g/1.000 L de Quelatec, 25 g/1.000 L de Ultraferro, 750 g/1.000 L de nitrato de cálcio e 450 g/1.000 L de nitrato de potássio) em dias alternados até a véspera da inoculação, de forma a garantir a uniformidade e vigor das plantas a serem inoculadas.

Quando as mudas apresentaram quatro folhas definitivas realizou-se o transplante para recipientes de 500 mL contendo uma mistura de solo, areia lavada e húmus na proporção de 3:1:1; devidamente autoclavada.

Para obtenção da suspensão bacteriana, o isolado CCRMRs202 foi resgatado da preservação em água e cultivado em meio TZC (tetracloreto de trifetil tetrazólio) (Kelman 1954) em incubadora BOD por 48h na temperatura a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Em seguida, 6 placas contendo o mesmo meio de cultura foram semeadas com alça descartável que tocou em colônia típica e isolada da bactéria. Após o crescimento bacteriano em incubadora BOD na temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, procedeu-se a raspagem das colônias e ajuste da suspensão para a concentração de células bacterianas para cerca de 1×10^8 UFC mL⁻¹ aferindo por meio de fotocolorímetro a leitura de 0,54 e comprimento de onda de 570 nanômetro (Biospectro SP-220) (Lopes 2018).

Cinco dias após o transplante realizou-se a inoculação da suspensão bacteriana de *Ralstonia pseudosolanacearum* CCRMRs202, por meio do método do

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

cutis nas raízes com auxílio de um bisturi, um corte semicircular no substrato a cerca de 1 cm do caule da planta, e em seguida verteu-se no solo 15 mL da suspensão bacteriana (Felix et al. 2012) ou de água destilada, na testemunha. Após a inoculação, as irrigações foram realizadas diariamente com mangueira direcionada em recipientes plásticos localizados sob os vasos de 500 mL, evitando a lixiviação do inóculo e mantendo o substrato úmido.

As coletas foram realizadas após 24 horas, 4 dias, 8 dias e 12 dias a inoculação. Realizou-se a coleta da parte aérea de cada planta da parcela, individualmente. O material foi colocado em tubos Falcon de 50 mL sob nitrogênio líquido e em seguida armazenado em ultrafreezer a -80°C até o momento das análises. Para este estudo foi escolhido a coleta de quatro dias após a inoculação.

2.4 Extração e quantificação de proteínas solúveis totais

As proteínas solúveis totais foliares das amostras foram extraídas pelo método fenólico de Wang et al. (2006) com modificações. E posteriormente, quantificadas de acordo método (Bradford 1976) utilizando o Coomassie Brilliant Blue G-250 como reagente de coloração e albumina de soro bovino (BSA) na concentração de 1,0 mg/ml-1, para a produção da curva padrão.

Para verificação da eficiência do método de extração e integridade das amostras foi realizado eletroforese SDS-PAGE em cuba de eletroforese vertical e suporte do gel de poliacrilamida a 12 % com 1,0 mm de espessura e dimensões 20x20. Aplicou-se 50 µg de cada amostra, em triplicata e as condições de corrida foram de amperagem variada de 17 mA a 300 V por 15 minutos e mudando para 34 mA por 2 h e 30 min e após esse tempo a corrida foi sendo observada até o final. Utilizou-se marcador de baixo peso molecular (LMW Calibration, GE Life Sciences).

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

2.5 Digestão tríptica

Foram separadas alíquotas de cada triplicata contendo 50 µg para digestão de mistura complexa. Foi adicionado 25 µL de solução DTT (50 mmol L⁻¹ DTT; 100 mmol L⁻¹ bicarbonato de amônio em água) e incubou-se à 45 °C por 1 h. Adicionou-se, então, 50 µL de solução IAA (200 mmol L⁻¹ IAA; 100 mmol L⁻¹ bicarbonato de amônio em água) e incubou-se à temperatura ambiente por 1 h no escuro. Foi adicionado 1 µL de solução 1 mol L⁻¹ DTT em água, 50 µL de solução 100 mmol L⁻¹ bicarbonato de amônio em água e 100 µL de tripsina dissolvida em bicarbonato de amônio 100 mmol L⁻¹; 5% (v/v) ACN em água. Após, foram incubados à 37°C overnight (16 h).

A solução de peptídeos foi seca em Speed Vac por cerca de 2 h à temperatura ambiente e os microtubos foram armazenados à -20 °C para posterior análise em nano-LC-MS/MS.

2.6 Espectrometria de massas nano-LC-MS/MS e identificação das proteínas

As amostras foram analisadas na unidade de espectrometria de massas RPT02H/Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná. Os peptídeos foram analisados em triplicata para cada tratamento (YOSH_Controle; YOSH_Inoculado; IPA_Controle e IPA_Inoculado), e em duplicata de corrida por LC-MS/MS em um Easy-nLC 1000 online com um LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific). A cromatografia foi realizada em uma coluna C18 (30 cm de comprimento, 75 µm I.D., 1,9 µm de partícula) com um fluxo de 250 nL/min e um gradiente linear de 5-40% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico e 5% de DMSO por 2 h. Os dados de MS foram adquiridos no modo DDA, sendo o MS1 full scan realizado no orbitrap (resolução 60.000) e o MS2 no quadrupolo linear trap, onde os 10 íons mais intensos foram submetidos à fragmentação CID.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

2.6.1 Análise de dados

Os dados brutos obtidos da análise LC-MS/MS foram analisados no software MaxQuant, versão 1.6.1.0 (Cox e Mann 2008, Cox et al., 2011). Os parâmetros padrão foram usados, incluindo tripsina como protease, carbamidometilação de cisteína como modificação fixa, acetilação da proteína N-terminal e oxidação de metionina como modificação variável. Foi utilizado o banco de dados de proteínas de *Solanum lycopersicum* contendo 34.665 entradas, do Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), utilizando o máximo permitido de clivagens perdidas pela tripsina até 1, modificações variáveis por carbamidometil (C), e acetil N-terminal e oxidação da metionina (M). Apenas proteínas com escore maior que 50% e confiança maior que 99% foram consideradas (Chambery et al. 2009).

O pacote Perseus (disponível em <http://www.maxquant.org/>) foi usado para análise estatística e determinação de proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) usando o Teste T-Student ($p < 0,05$). Para o presente trabalho foram realizadas duas comparações: Comparação 1 (YOSH_Controle x YOSH_Inoculado) e Comparação 2 (IPA_Controle X IPA_Inoculado) de forma a avaliar os mecanismo de defesa utilizados por cada cultivar em resposta à inoculação com *R. pseudosolanacearum*. As DAPs identificadas em ambos os grupos foram denominadas “comuns”, e àquelas observadas em apenas um grupo “exclusivas”.

2.7 Ontologia gênica

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas do UniProt através da ferramenta Retrieve ID e submetidas à análise de distribuição de ontologia gênica (GO) no programa OmicsBox/Blast2GO (<https://www.biobam.com/omicsbox/>), utilizando as ferramentas Blastp, InterProScan e GO-Slim (Mitchell et al. 2019). Foram analisados os parâmetros de processo biológico, função molecular, componente célula.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

As categorias de enzimas foram identificadas no Blast2GO e caracterizadas com auxílio do bando de dados Brenda (<https://www.brenda-enzymes.org/>) (Jeske 2019). A Análise de enriquecimento de termos GO foi realizada no servidor ShinnyGO (Bykova et al. 2005), utilizando um FDR < 0,05 (taxa de falsa descoberta) como estatisticamente significativo. Ele cria uma rede de genes altamente significativos nas principais vias biológicas (Suplementar 3 e 4).

A distribuição de termos GO, ou categorias funcionais, do conjunto das DAPs de cada tratamento foram utilizadas em todas as comparações.

3 RESULTADOS

3.1 Extração de proteínas totais

O processo de extração de proteínas solúveis totais foi eficiente revelando proteínas íntegras e com qualidade suficiente para espectrometria de massas (Figura 1).

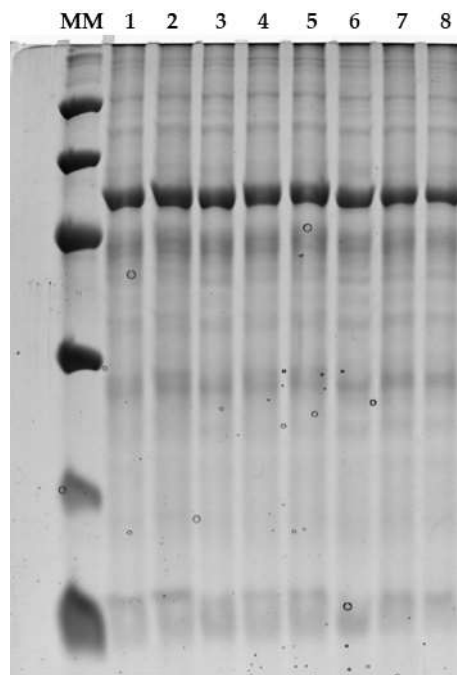


Figura 1. Perfil eletroforético da extração de proteínas solúveis totais foliares das cultivares de tomate Yoshimatsu e Caline IPA-7 em resposta à *Ralstonia*

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

pseudosolanacearum, utilizando gel SDS-PAGE 12 %. MM- LMW Calibration (GE Life Sciences); 1 e 2- IPA Controle; 3 e 4- IPA Inoculado; 5 e 6- Yoshimatsu controle, 7 e 8- Yoshimatsu inoculado.

3.2 Identificação das DAPs

A análise por espectrometria de massas LC-MS/MS permitiu a identificação de 1385 proteínas no total. Inicialmente foi realizada uma limpeza de contaminantes do tipo “only identified by site”, “reverse” e “potential contaminants”, resultado em 1306 proteínas. Em seguida foi realizada filtragens de valores válidos, onde selecionamos apenas proteínas presentes em pelo menos 3 amostras da corrida em quadruplicata, resultando em 559 proteínas na cultivar Yoshmatsu e 642 na Caline IPA-07.

Após análise estatística foi possível obter na comparação da cultivar susceptível Caline IPA-7, inoculada ou não com *R. pseudosolanacearum*, 201 DAPs das quais 129 comuns aos dois tratamentos. No controle foram observados 78 e 122 DAPs, mais induzidas e exclusivas deste tratamento, respectivamente. No tratamento inoculado foram obtidas 91 DAPs, das quais 71 e 20 foram induzidas e exclusivas, respectivamente (Figura 2). Na comparação da cultivar Yoshimatsu foram determinadas 203 DAPs, das quais 159 comuns aos dois tratamentos, das quais 125 e 78, mais induzidas e exclusivas deste tratamento, respectivamente. No tratamento inoculado foram obtidas 90 DAPs, das quais 51 e 39 foram induzidas e exclusivas, respectivamente (Figura 2).

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

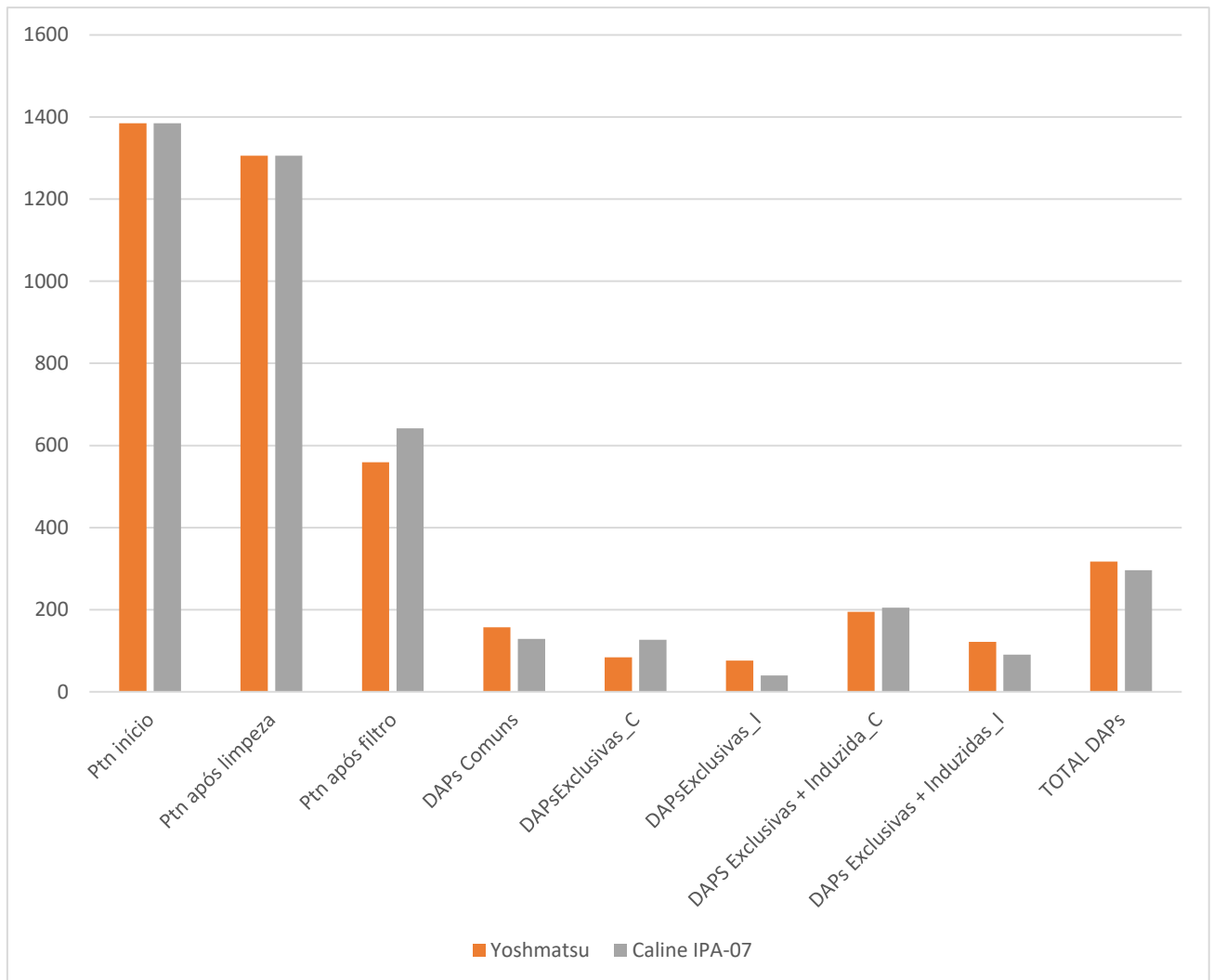


Figura 2. Distribuição de proteínas diferencialmente acumuladas nas cultivares de tomate Yoshimatsu e Caline IPA-7 em resposta à *Ralstonia pseudosolanacearum*, utilizando o software Perseus. Ptn: Proteína; DAP: Proteínas diferencialmente acumuladas; C: Controle; I: Inoculado.

3.3 Ontologia gênica

A análise de ontologia genica avaliou a distribuição das proteínas identificadas em categoria com base no processo biológico, função molecular (Suplementar 1) e componente celular (Suplementar 2). Em ambas as cultivares foi possível observar

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

as mesmas categorias de processo biológico, sendo metabolismo de proteínas e fotossíntese as categorias com maior número de DAPs relacionadas.

A cultivar Caline IPA-7 inoculada apresentou de forma exclusiva, em relação ao controle, a categoria síntese de tetrapirrólicos. Observa-se também uma redução no número de DAPs na planta inoculada nas categorias “estresse” e “redox”, “desenvolvimento celular”, “sinalização” e “metabolismo de hormônios” e “metabolismo de nucleotídeos” (Figura 3). De forma oposta à cultivar Caline IPA-7, foi observada na cultivar resistente Yoshimatsu na planta inoculada a presença de DAPs na categoria de “transporte de elétrons mitocondriais” e “OPP- Via fosfato pentose oxidativa” (Figura 4).

Foram selecionadas as DAPs diretamente ligadas à resposta de defesa das plantas na presença do patógeno, e agrupadas em função do processo biológico ao qual estão relacionadas (Tabelas 2 e 3).

Sete enzimas foram apresentaram na cultivar Yoshimatsu, sendo: seis pertencentes ao grupo oxirredutases e uma ao grupo isomerase. Quatro dessas enzimas foram exclusivas no tratamento inoculado em relação ao controle (Tabela 3).

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

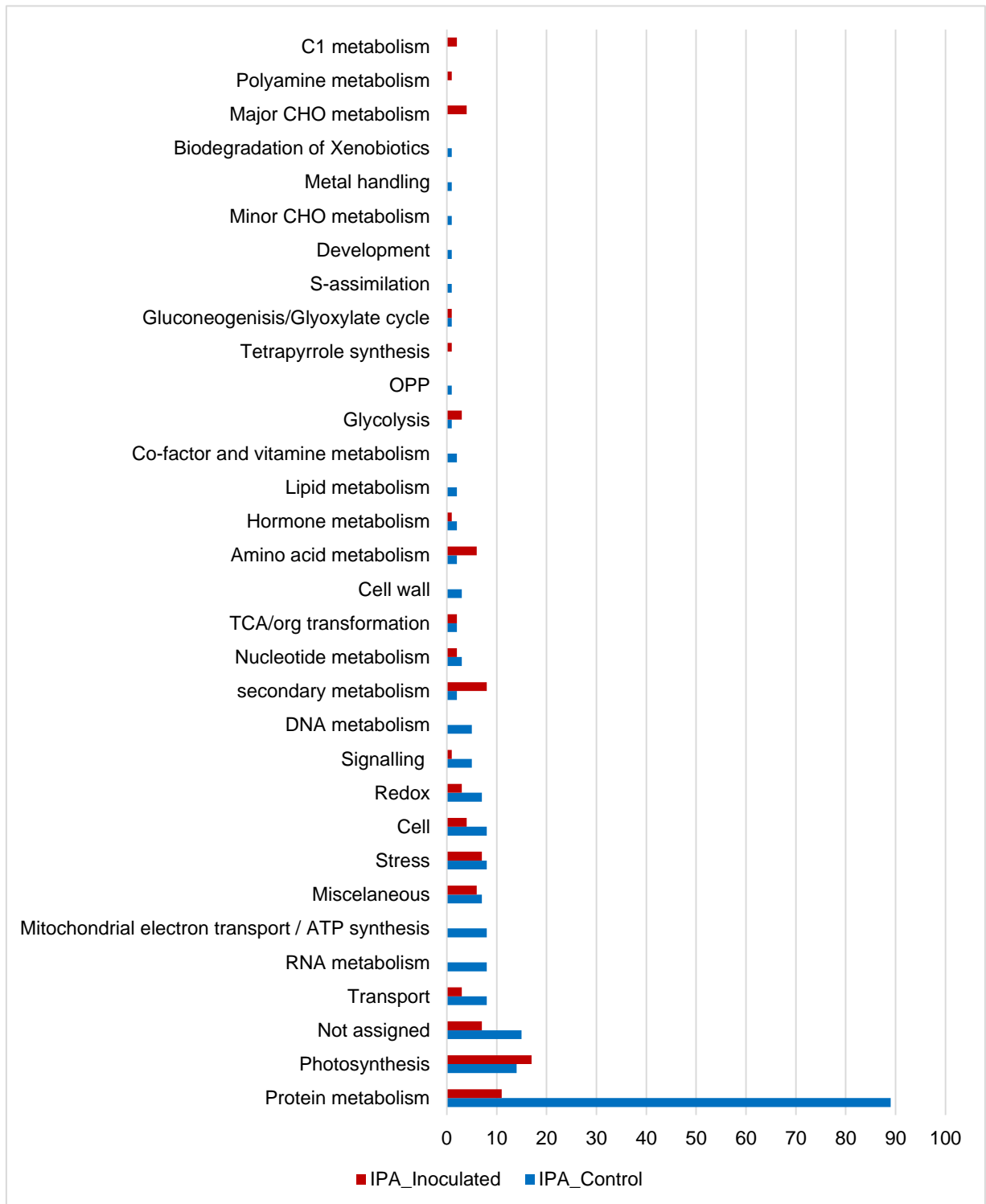


Figura 3. Análise de ontologia gênica por processo biológico da cultivar Caline IPA-7 em resposta à *Ralstonia pseudosolanacearum*. OPP: oxidative pentose phosphate pathway; TCA/org: tricarboxylic/organic acid; Miscellaneous: represent instances that do not belong to any of its siblings.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

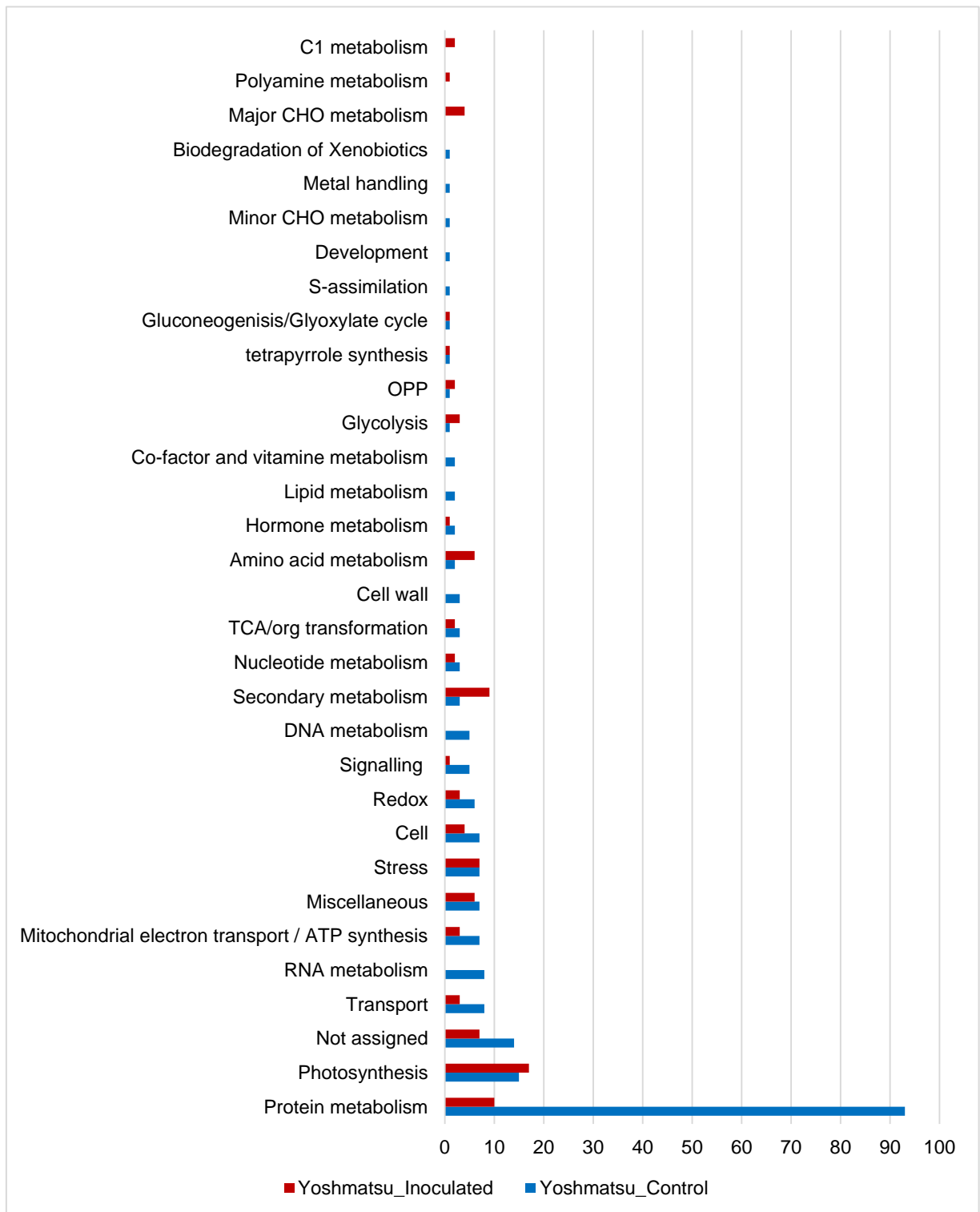


Figura 4. Análise de ontologia gênica por processo biológico da cultivar Yoshimatsu em resposta à *Ralstonia pseudosolanacearum*. OPP: oxidative pentose phosphate pathway; TCA/org: tricarboxylic/organic acid; Miscellaneous: represent instances that do not belong to any of its siblings.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Tabela 2. DAPs de tomateiro Caline IPA-07 associados com ontologias gênicas (GO) referentes a defesa e resposta a estresse oxidativo e ou biótico, indicadores potenciais de genes biomarcadores funcionais com expressão diferencial na resistência contra *Ralstonia pseudosolanacearum*. Log2(FC): log2 da razão de variação do acúmulo da proteína no tratamento controle em relação ao tratamento infectado (estresse biótico).

GENE ONTOLOGY (BIOLOGICAL PROCESS)	PROTEIN NAMES	CONTROL	STRESS	LOG2 FC (C/E)
defense response [GO:0006952]	thaumatin-like protein (PR-5)	A0A3Q7HTH3	-	exc
	osmotin-like protein (PR-5)	Q41350	-	exc
defense response to virus [GO:0051607]; photorespiration [GO:0009853]; reductive pentose-phosphate cycle [GO:0019253]	ribulose biphosphate carboxylase small chain	P07179	-	exc
abscisic acid-activated signaling pathway [GO:0009738]; defense response [GO:0006952]; regulation of protein serine/threonine phosphatase activity [GO:0080163]	S-norcochlorogenic acid synthase 1-like	A0A3Q7H5W0	-	exc
	pathogenesis-related protein STH-2-like (peptídeo derivado de PR10)	A0A3Q7I9H4	-	exc
cell wall macromolecule catabolic process [GO:0016998]; chitin catabolic process [GO:0006032]; defense response to fungus [GO:0050832]; polysaccharide catabolic process [GO:0000272]	Basic 30 kDa endochitinase (EC 3.2.1.14)	Q05538	-	exc
coumarin biosynthetic process [GO:0009805]; response to molecule of fungal origin [GO:0002238]	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	A0A3Q7F7I3	-	1.41
	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 4-like	A0A3Q7FZA2	-	exc

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

	hyoscyamine 6-dioxygenase-like	-	Q40131	1.2
	flavanone 3-hydroxylase	-	A0A3Q7F6V7	exc
response to biotic stimulus [GO:0009607]; defense response to other organism [GO:0098542]; immune response [GO:0006955]; photosynthesis [GO:0015979]	Pathogenesis-related protein 1C (PR1)	A0A3Q7HXW1	-	exc
	protein Strubbelig- Receptor family 5-like isoform X1		A0A3Q7GV49	1.10
auxin-activated signaling pathway [GO:0009734]; circadian rhythm [GO:0007623]; defense response to fungus [GO:0050832]; developmental vegetative growth [GO:0080186]; flower development [GO:0009908]; induced systemic resistance, jasmonic acid mediated signaling pathway [GO:0009864]; jasmonic acid biosynthetic process [GO:0009695]; photoperiodism, flowering [GO:0048573]; positive regulation of defense response to insect [GO:1900367]; response to abscisic acid [GO:0009737]; response to absence of light [GO:0009646]; response to blue light [GO:0009637]; response to ethylene [GO:0009723]; response to far red light [GO:0010218]; response to hydrogen peroxide [GO:0042542]; response to insect [GO:0009625]; response to metal ion [GO:0010038]; response to red light [GO:0010114]; response to salicylic acid [GO:0009751]; response to salt stress [GO:0009651]; response to vitamin B2 [GO:0033274]; response to wounding [GO:0009611]	allene oxide cyclase		Q9LEG5	1.51
defense response to insect [GO:0002213]; isoleucine biosynthetic process [GO:0009097]; L-serine catabolic process [GO:0006565]; positive regulation of defense response [GO:0031349]; protein	threonine dehydratase biosynthetic		P25306	3.253

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

homotetramerization [GO:0051289]; response to herbivore [GO:0080027]; response to insect [GO:0009625]; threonine catabolic process [GO:0006567]				
---	--	--	--	--

Tabela 3. DAPs de tomateiro Yoshimatsu associados com ontologias gênicas (GO) referentes a defesa e resposta a estresse oxidativo e ou biótico, indicadores potenciais de genes biomarcadores funcionais com expressão diferencial na resistência contra *Ralstonia pseudosolanacearum*. Log₂(FC): log₂ da razão de variação do acúmulo da proteína no tratamento controle em relação ao tratamento infectado (estresse biótico).

GENE ONTOLOGY (BIOLOGICAL PROCESS)	PROTEIN NAMES	CONTROL	STRESS	LOG ₂ FC (C/E)
response to cold [GO:0009409] sulfate assimilation [GO:0000103]	Assimilatory sulfite reductase (ferredoxin) (EC 1.8.7.1)		H6WYS2	exc
abscisic acid-activated signaling pathway [GO:0009738]; defense response [GO:0006952]; regulation of protein serine/threonine phosphatase activity [GO:0080163]	Bet_v_1 domain-containing protein (PR10)		A0A3Q719H4	exc
		A0A3Q7FV86		2,127
		A0A3Q7FXR7		1,831
photosynthesis, light harvesting in photosystem I [GO:0009768]; protein-chromophore linkage [GO:0018298];	Chlorophyll a-b binding protein 6A	P12360		Exc
	Chlorophyll a-b binding protein 7	P10708		2,006

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

response to light stimulus [GO:0009416]	Chlorophyll a-b binding protein 8	P27522		1,509
	Chlorophyll a-b binding protein	A0A3Q7HHU2		1,819
		Q7M1K8		1,459
coumarin biosynthetic process [GO:0009805]; response to molecule of fungal origin [GO:0002238]	Fe2OG dioxygenase domain-containing protein		A0A3Q7F7I3	exc
			A0A3Q7FZA2	exc
	Steroid 16alpha-hydroxylase	Q40131		2,495
cell redox homeostasis [GO:0045454]; cellular response to oxidative stress [GO:0034599]; hydrogen peroxide catabolic process [GO:0042744]; response to hydrogen peroxide [GO:0042542]	Glutaredoxin domain-containing protein	A0A3Q7H1V8		1,964
	Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin (EC 1.11.1.25)	A0A3Q7EHP3		1,544
		A0A3Q7ILP6		1,370
			Q7Y240	exc
	Glutathione peroxidase	A0A3Q7JAZ2		exc
		A0A3Q7HK83		1,889
	Peroxidase (EC 1.11.1.7)		A0A3Q7H0U0	exc
	Uncharacterized protein	A0A3Q7I8J8		exc
Thioredoxin-dependent peroxiredoxin	A0A3Q7H8S0		1,514	

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

	(EC 1.11.1.24)			
	Catalase (EC 1.11.1.6)		K4BAE6	0,909
	Catalase isozyme 1 (EC 1.11.1.6)		P30264	0,504
response to water deprivation [GO:0009414]	Probable aquaporin PIP-type pTOM75 (RAMP)		Q08451	0,932
protein folding [GO:0006457]; response to endoplasmic reticulum stress [GO:0034976]; cellular response to heat [GO:0034605];	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	A0A3Q7HI26		exc
			A0A3Q7HIP9	exc
	Molecular chaperone Hsp90-1		Q6UJX4	0,487
	Uncharacterized protein		A0A3Q7IZ03	0,746
cellular response to calcium ion [GO:0071277]; de-etiolation [GO:0009704]; regulation of stomatal closure [GO:0090333]	Rhodanese domain-containing protein	A0A3Q7FI22		exc
defense response to virus [GO:0051607]; photorespiration [GO:0009853]; reductive pentose-phosphate cycle [GO:0019253]	Ribulose biphosphate carboxylase small subunit	P08706		1,536
defense response to other organism [GO:0098542]; immune response [GO:0006955]	Indol-3-acético-amido sintetase (GH3)		A0A3Q7FKJ0	exc
response to biotic stimulus [GO:0009607]	Pathogenesis-related protein 1C (PR1)		A0A3Q7HXW	exc

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

			1	
response to stress [GO:0006950]	Anexinas		A0A3Q7EM8 0	exc
response to wounding [GO:0009611]	Uncharacterized protein	A0A3Q7J2P9		exc

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

A categorização das DAPs com atividade enzimática revelou maior agrupamento na categoria de oxidoredutases, transferases e hidrolases. É possível observar que na presença do estresse causado pela bactéria, a cultivar Caline IPA-07 apresentou uma inibição no acúmulo de enzimas envolvidas com a resposta ao estresse oxidativo, enquanto na Yoshmatsu observa-se um comportamento contrastante. O mesmo foi observado nas categorias de hidrolases, isomerases e liases (Figura 5).

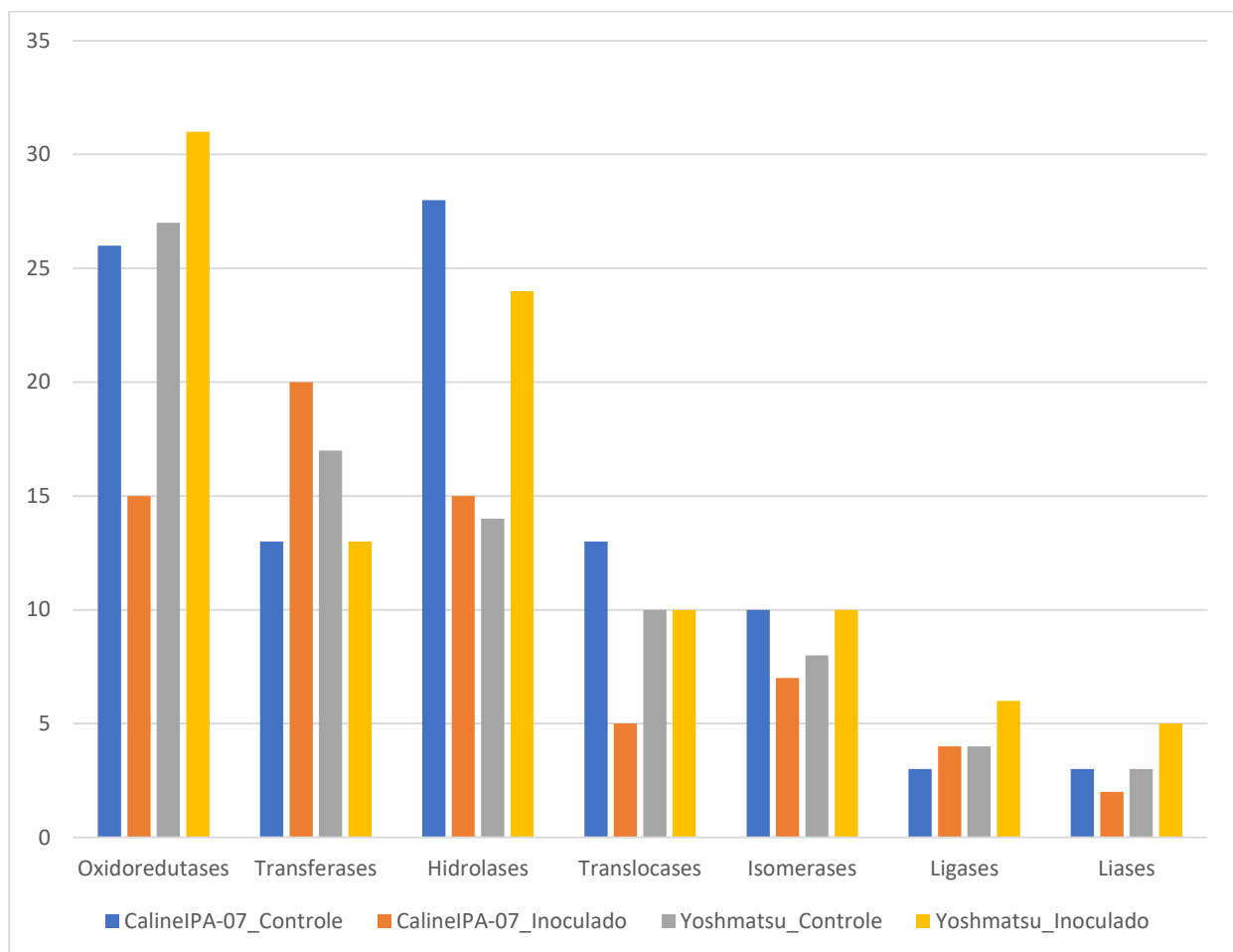


Figura 5. Distribuição de DAPs em categorias de enzimas das cultivares Yoshimatsu e Caline IPA-07 em resposta à *Ralstonia pseudosolanacearum*.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

4 DISCUSSÃO

As alterações morfológicas e fisiológicas, bem como os ajustes metabólicos nas plantas diante de fatores estressantes são orquestrados e regulados por diversas alterações moleculares que são alvos diversos estudos, visando principalmente o melhoramento. A análise do proteoma diferencial das folhas do tomateiro, cultivares Caline IPA-7 e Yoshimatsu, inoculadas ou não com isolado CCRMRs202 de *R. pseudosolanacearum* revelou diversas proteínas potencialmente associadas à inibição ou indução dos mecanismos moleculares de defesa destas cultivares em resposta à murcha bacteriana.

4.1 Proteínas diferencialmente acumuladas na cultivar Caline Ipa-7

Os dados obtidos demonstram alterações significativas no proteoma da cultivar Caline IPA-7 inoculada pela bactéria *Ralstonia pseudosolanacearum*, sendo observada uma redução significativa no número de DAPs relacionadas à defesa nas plantas inoculadas em relação às plantas controle.

No tratamento controle da cultivar de Caline IPA-07 foram identificadas diversas PR-proteínas (*Pathogenesis related proteins*), dentre elas destacam-se os os peptídeos antimicrobianos que são conhecidos por serem moléculas sinalizadoras atuando em processos importantes nas plantas superiores como crescimento e desenvolvimento, interações planta-patógeno e planta-ambiente (Stangarlin et al. 2011). A PR-STH-like (A0A3Q7I9H4) é um peptídeo derivado da região N-terminal da PR-10 possui função pouco conhecida, porém estudos recentes apontam que peptídeos antimicrobianos tem grande potencial no desenvolvimento de biorreguladores peptídicos ou biocidas, podendo fornecer uma forma alternativa de minimizar o uso de agroquímicos, melhorar a tolerância ou resistência ao estresse das culturas para melhor qualidade e produtividade (Huffaker et al. 2006). Foram identificadas ainda as proteínas PR-1

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

(A0A3Q7HXW1), PR-3 (endoquitinase básica de 30 kDa: Q05538) e PR-5 (taumatina: A0A3Q7HTH3; e osmotina: Q41350). A PR1 é uma proteína sinalizadora de produção de ácido salicílico, que induz resistência sistêmica adquirida e está associada à resistência a patógenos em plantas (Herrera-Vasquez et al. 2015). A PR-3 tem sido relatada em *S. lycopersicum* suscetível à *Phytophthora* spp. como alvo de S-nitrosação - um mecanismo de regulação proteica na sinalização de NO-, no desenvolvimento da planta e nas respostas ao estresse (Jedelská et al. 2021). A PR5 é uma superfamília envolvida com a resistência das plantas a múltiplos estresses. Dentre seus membros estão a taumatina (LTP- Thaumatin-like protein) e a Osmotina (OLP- osmotin-like protein) envolvidas na floração, amadurecimento de frutos e dinâmica da parede celular em sementes em germinação (Seo et al. 2008). Neste cenário observa-se que as PRs, apesar de potencialmente aptas a atuarem na defesa contra o patógeno, na cultivar suscetível estão diretamente envolvidas com o metabolismo basal das plantas, não sendo este um mecanismo ativado durante o estresse. Apesar disso representam potenciais marcadores a serem investigados.

Diversas proteínas de defesa foram observadas na cultivar Caline IPA-7, indicando ativação do sistema de defesa da planta. A planta Inoculada induziu o acúmulo das proteínas receptor de estrubelina família 5 (A0A3Q7GV49), Oxido-ciclase alene (Q9LEG5), Treonina desitratase Biosintética (P25306), esteroide 16alfa-hidroxilase (Q40131) e flavonona 3 hidroxilase (A0A3Q7F6V7). Os receptores de estrubelina são uma classe de receptores quinases descritos por estarem envolvidos em vias de sinalização associadas a morfogênese tecidual em *A. thaliana* (Chevalier et al. 2005). Recentemente, Wang et al. (2018) avaliaram o papel desses receptores na imunidade vegetal, e verificaram que a superexpressão do gene receptor de estrubelina StLRPK1 aumentava a resistência de babatas transgênicas a infecção pelo fitopatógeno *P. infestans*. A proteína oxido-ciclase alene (AOC) é uma enzima chave na via biossintética do ácido jasmônico (JA). O JA é um regulador vegetal endógeno que

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

desempenha papel fundamental nas respostas de defesa das plantas aos estresses ambientais. O JA é importante na indução de diferentes mecanismos relacionados a defesa estresses bióticos, incluindo a produção de metabolitos secundários e genes relacionados a patogênese, assim como na sinalização a resposta sistêmica adquirida em plantas (Durner et al. 1997, Deuner et al. 2015). A treonina desidratase biossintética é uma treonina desaminase que catalisa a desidratação da treonina em α -cetobutirato e amônia. Essa proteína é bem conhecida como mecanismo de defesa vegetal em resposta a insetos-praga. Em *S. licoperscum*, essa proteína está envolvida tanto na biossíntese da isoleucina como na degradação da treonina no intestino de insetos (Gonzales-Vigil et al. 2011). A esteroide 16 α -hidroxilase é uma enzima capaz de promover a hidroxilação de esteroides 16 α em glicoalcalóides esteroidais (SGAs). Estes por sua vez são metabolitos tóxicos encontrados exclusivamente nas *Solanaceae* (Nakaysu et al. 2017). Por fim a proteína flavanone 3-hydroxylase (F3H), envolvida com a via dos flavonóides, e age combatendo ROS especialmente sob estresse fotooxidativo.

Infecção por patógenos desencadeiam diversos mecanismos moleculares levando as plantas a responderem alterando a expressão de genes específicos, evento que muitas vezes resulta em profundas modificações no metabolismo primário e secundário. Dessa forma observa-se que a cultivar susceptível possui ferramentas de defesa, porém no período avaliados de 4 dias após a inoculação com *Rp*, tais mecanismos foram insuficientes em mitigar os efeitos da infecção.

4.2 Proteínas diferencialmente acumuladas na cultivar Yoshimatsu

Proteínas de respostas a estresses bióticos

No presente trabalho foram identificadas e selecionadas proteínas envolvidas com diversos mecanismos de manutenção da planta na presença de

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Rp. Dentre elas estão as proteínas ubiquitinas 40S (A0A3Q7IBU5), chaperoninas (A0A3Q7J408) e subunidades estruturais e regulatórias do proteassoma (A0A3Q7I6A1, A0A3Q7F6F6), proteína de Clivagem de Glicina (A0A3Q7HQA3), proteína de choque térmico 70kDa (A0A3Q7EQ38 e A0A3Q7ILD3) e o fator de alongação G (A0A3Q7IP94).

As proteínas que compõem o sistema ubiquitina-proteassoma 26S, como ubiquitinas 40S (A0A3Q7IBU5), chaperoninas (A0A3Q7J408) e subunidades estruturais e regulatórias do proteassoma (A0A3Q7I6A1, A0A3Q7F6F6), dentre outras, foram inibidas na planta sob infecção pelo patógeno. Para suprimir o sistema imune inato da planta, os fitopatógenos são capazes de regular alguns mecanismos epigenéticos dos hospedeiros, como a acetilação e metilação de histonas, influenciando diretamente nas respostas de defesa da planta (Ramirez-Prado et al. 2018). Nesse contexto, *R. pseudosolanacearum* possui a capacidade de regular o funcionamento desse sistema a partir da liberação de efetores do tipo III, como o RipAR e RipAW, alterando o processo natural de ubiquitinação de proteínas, o qual é muito importante para ativação de respostas imunes da planta (Landry et al. 2020).

A proteína de Clivagem de Glicina (A0A3Q7HQA3) foi exclusiva no tratamento com *Ralstonia pseudosolanacearum*. Ela faz a clivagem de glicina, convertendo-a em serina, e deixando-a disponível para o metabolismo celular desempenhar funções diversas, como proteção de equilíbrio osmótico, participação de via fotossintética e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além de participar de indiretamente como promotor de crescimento em plantas e transporte de nutrientes (Olivier et al. 1995, Bykova et al. 2005). Outra proteína dependente de Glicina, foi a proteína de choque térmico 70kDa (A0A3Q7EQ38), sendo mais uma proteína de prevenção de infecção (Kim et al. 2007).

Há ainda a proteína 5-metiltetrahydropteroyltriglutamate (A0A3Q7ILD3), que também foi exclusiva no estresse, e participa do metabolismo da metionina, que

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

também é conhecida sendo precursora do etileno, composto responsável pela maturação de frutos e senescência vegetal (Castro et al. 2006). Estudos proteômicos de plantas de tomate resistente à *Ralstonia solanacearum* chegaram a conclusão de que a resistência de determinadas cultivares está intimamente ligada ao ciclo da metionina (Wang et al. 2019).

A produção de peptídeos é algo essencial para a planta durante o estresse, principalmente o estresse biótico. A planta necessita produzir os compostos específicos, necessários para combater o patógeno. Nesse contexto, é fundamental que a maquinaria de síntese proteica esteja preparada a possível demanda de transcritos, sejam eles nucleares ou organelares. O fator de alongação G (A0A3Q7IP94), proteína cloroplastidial, exclusiva do tratamento da planta inoculada com *Ralstonia pseudosolanacearum* ajuda nessa função (Atkinson e Baldauf 2011).

Foram identificadas oito proteínas diretamente ligadas ao mecanismo de defesa da planta resistente. São elas: proteína universal de resposta ao estresse PHOS (USP) (A0A3Q7EF29); proteína relacionada a patogênese PR1 (A0A3Q7HXL1 e A0A3Q7I9H4); peroxidase (A0A3Q7H0U0); peroxidase tioredoxina 1 (Q7Y240); proteína dissulfido-isomerase (A0A3Q7HIP9); indol-3-acético-amido sintetase (GH3) (A0A3Q7FKJ0) e anexinas (A0A3Q7EM80).

Proteínas relacionadas com o mecanismo antioxidante

Quando as plantas reconhecem patógenos potenciais, elas produzem uma explosão oxidativa que consiste em superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Essa explosão oxidativa, que desencadeia as vias de transdução do sinal de defesa da planta, ocorre em duas fases: a fase I é de curta duração, inespecífica e ocorrem minutos após o reconhecimento do patógeno e a fase II é prolongada e ocorre 1,5 a 3 h após a detecção do patógeno. A fase II da explosão oxidativa geralmente leva à resistência à doença por meio da resposta hipersensível e da indução de genes de

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

defesa do hospedeiro. A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é atribuída principalmente a peroxidases ligadas à parede celular e NADPH oxidases, semelhantes às encontradas em macrófagos. Acredita-se que a explosão oxidativa possa ter efeitos antimicrobianos diretos; no entanto, as quantidades de EROs experimentadas por patógenos durante a infecção do hospedeiro são desconhecidas (Flores-Cruz 2009).

Em plantas as EROs são moléculas naturalmente produzidas principalmente durante o desenvolvimento (Huang et al 2019), e em órgãos de alta atividade, como as folhas. No tomateiro o acúmulo destas proteínas sob estresse, provavelmente está relacionada à infecção do tomateiro pela bactéria, visto que, ao infectar a planta, a bactéria *R. pseudosolanacearum*, produz um arsenal proteico conhecido como Rips (Ralstonia injected proteins) que altera o metabolismo da planta interferindo em diversos processos de defesa (Landry et al. 2020). Dentre as ações das Rips, incluem inibir atividade das enzimas antioxidantes, como no caso da RipAK atua diretamente na inibindo atividade da catalase (Sun et al. 2021). A inibição das enzimas antioxidantes favorece o acúmulo de EROs, contribuindo para ativação de genes envolvidos em respostas ao estresse oxidativo presentes no genoma *R. solanacearum* (Flores-Cruz et al. 2011), desta forma, favorecendo o desenvolvimento e adaptação da bactéria, além de promover maior virulência. Do ponto de vista do melhoramento de plantas a ativação destas proteínas do sistema antioxidante pode ser utilizada como indicativa de um mecanismo eficiente de defesa da planta.

Proteínas relacionadas a atividade antioxidante foram acumuladas em Yoshimatsu exclusivamente durante a infecção. São elas: peroxidase (A0A3Q7H0U0), peroxidase tioredoxina 1 (Q7Y240) e proteína dissulfido-isomerase (A0A3Q7HIP9). Trata-se de enzimas envolvidas com a detoxificação de radicais superóxidos, evidenciando uma possível tentativa da planta para reduzir as EROs. Além disso, contribui para termotolerância (Chi et al. 2019) e participa nos mecanismo de sinalização das plantas contra ação de patógenos (Mata-Pérez et al 2019). A proteína

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

dissulfeto-isomerase (PDI) é comumente conhecida como chaperona molecular que catalisa as reações de intercâmbio ditiol-dissulfeto e promove a formação de dissulfeto de proteína, isomerização ou redução, dependendo do potencial redox e natureza do substrato polipeptídico (Freedman 1989). No entanto, várias linhas de evidenciam a indução de PDI em resposta a fatores incluindo infecções fúngicas e bacterianas e sugerem que maiores acúmulos de proteínas associado ao destino proteico nas cultivares de tomate resistente pode desempenhar um papel vital nas células contra a infecção bacteriana (Afroz et al. 2009).

Algumas proteínas com funções de desintoxicação são importantes em quadros de estresse bióticos, isso se deve, principalmente devido aos compostos produzidos pelo patógeno. De maneira semelhante, alguns radicais livres aderem a moléculas, desestabilizando sua estrutura, afetando assim sua função. A Glutathione S-transferase (A0A3Q7I0A1), acumulada exclusivamente na condição estresse, é um importante agente de desintoxicação de xenobióticos (Hayes et al. 2005, Josephy 2010).

O ácido indol-3-acético-amido sintetase (GH3) (A0A3Q7FKJ0) é uma proteína que catalisa a síntese do conjugado indol-3-ácido acético (IAA)--aminoácido, fornecendo um mecanismo para a planta manejar o excesso de auxina. A auxina, hormônio vegetal relacionado ao desenvolvimento e crescimento vegetal, também está associado a susceptibilidade de plantas a infecções de fitopatógenos, e estudos mostram que a repressão dos receptores de auxina está associada a uma resposta imune induzida, como observado em *Arabidopsis thaliana* (Navarro et al. 2006, Park et al. 2007). Infecções bacterianas promovem o aumento de IAA (principal tipo auxina vegetal), induzindo, dentre outras proteínas, a expressão de expansinas, que acabam por degradar a parede celular e tornar a planta mais suscetível. Em cultivares transgênicas de arroz (*Oryza sativa*), foi visto que a superexpressão do gene GH3-8 promove a resistência desta contra a *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Ding et al. 2008). De maneira similar, foi verificado que a superexpressão do gene GH3.1 e GH3.1L

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

reduz a susceptibilidade de isolados de *Citrus sinenses* contra *Xanthomonas citri* (Zou et al. 2019).

As anexinas (A0A3Q7EM80) são uma família de proteínas evolutivamente conservadas, conhecidas por estarem envolvidas em importantes funções celulares, como organização do citoesqueleto, transporte de vesículas, detecção e transdução de sinais, além de favorecer a permeabilidade iônica entre membranas celulares (Mortimer 2008). Essas proteínas são amplamente estudadas devido a sua relevância na sinalização celular associada a estímulos ambientais, a partir do transporte intracelular de Ca^{2+} . Diferentes estudos já observaram a indução na expressão da anexina em plantas inoculadas por diferentes tipos de fitopatógenos como vírus, bactérias, fungos, bem como pelo ataque de insetos-pragas, indicando uma resposta de defesa inespecífica quanto ao tipo de patógeno (Yadav e Chhibbar 2018). Em *S. lycopersicum*, um estudo proteômetabolômico realizado por (Ghosh 2016), verificou que a expressão da anexina foi altamente induzida em frutos da cultivar de tomate transgênica E8.2-OXDC infectados pelo fungo *Sclerotinia rolfisii*.

Proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e ao estresse universal (USP)

Dentre as proteínas diferencialmente acumuladas da cultivar Yoshimatsu inoculada com *R. pseudosolanacearum*, destaca-se as proteínas exclusivas diretamente associadas a defesa, como a PR1 e PR10 (A0A3Q7HXW1 E A0A3Q7I9H4) que são proteínas relacionadas à patogênese, agem inibindo a morte celular programada e suprimindo patógenos bacterianos em tecidos vegetais (Lincoln et al 2018). A expressão de PR1 mRNA tem sido usada extensivamente como um marcador de resistência a doenças em plantas (Glazebrook 2005). As proteínas de classe 10 relacionadas à patogênese (PR10) são proteínas vegetais altamente conservadas, que são induzidas em resposta a fatores de estresse abióticos e bióticos

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

(Fernandes et al. 2013). Até o momento, nenhuma função biológica única pode ser atribuída a eles. Em vez disso, foi proposto um papel mais geral do PR-10 no desenvolvimento da planta e nos mecanismos de defesa (Aglas et al. 2020). O maior acúmulo dessas proteínas nos revela uma importante estratégia de defesa e um potencial marcador funcional indicativo de resistência.

As proteínas universais de estresse (USP) (A0A3Q7EF29) são pequenas proteínas solúveis, caracterizadas, principalmente, pela presença do domínio USP (adenine nucleotide α -hydrolase-like domain, acesso PFAM:00582) (Gorshkovva e Pojidaeva 2021). Como o nome sugere, as USP participam de uma série de respostas celulares associadas a estresses bióticos e abióticos, modulando ativamente o metabolismo vegetal, atuando, sobretudo, na sinalização celular, induzindo respostas de defesa mediadas pelo controle redox intracelular (Chi et al. 2019). Em *A. thaliana*, a USP-like protein HRU1 é capaz de modular a produção de EROS na planta sob condição de hipóxia (Gonzali et al. 2015). Outras USP identificadas em *A. thaliana* exercem função de chaperonas, mantendo a integridade de proteínas e ácidos nucleicos de plantas sob condições de estresse oxidativo, calor e frio (Jung et al. 2013, Mlencion et al. 2017). Em *S. lycopersicum*, os níveis transcricionais da USP-like protein SIRd2 foram altamente induzidos após estes terem sido submetidos a estresse salino, sugerindo que a SIRd2 está intrinsecamente ligada a tolerância desta planta ao estresse salino e osmótico, regulando os níveis intracelulares de EROs (Gutiérrez-Beltrán et al. 2017). Em *Oryza sativa* as proteínas USP indicaram o aumento de resistência ao ataque de *Magnaporthe oryzae* (Stangarllin et al. 2011). Assim a pesquisa dessas proteínas de defesa que conferem amplo espectro de resistência são importantes para a compreensão da interação em patossistemas e são fortes candidatos na busca de resistência ampla e durável de novos cultivares.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

4.3 Proteínas com atividade enzimática

As enzimas encontradas nas folhas da cultivar Yoshimatsu (Tabela 2), sendo: seis do grupo de oxirredutases (EC 1.8.7.1; EC 1.11.1.25; EC 1.11.1.7; EC 1.11.1.24; EC 1.11.1.6; EC 1.11.1.6 – i) e uma isomerase (EC 5.3.4.1) estão associadas a mecanismo de defesa, podendo suas funções serem atribuídas a resposta contra patógenos e ferimentos [100]. O método de inoculação somado a cultivar resistente utilizada poderia explicar o acúmulo dessas enzimas nos dois tratamentos (controle e inoculado). O acúmulo conjunto das três primeiras enzimas oxirredutases e uma isomerase (indicadas acima), de maneira exclusiva nas plantas quatro dias após a inoculação, pode indicar um sistema eficiente de resistência a *Ralstonia pseudosolanacearum*.

4.4 Ontologia gênica

As plantas desenvolveram sistemas regulatórios especializados para controlar as respostas imunes. Dessa forma as vias de sinalização interagem para conduzir e gerenciar a amplitude e a duração apropriadas da resposta de defesa, uma vez que a ativação da resposta induzida pelo estresse provavelmente causará efeitos deletérios no funcionamento normal das células [66]. A análise de ontologia gênica das categorias de processo biológico do tipo “metabolismo de proteínas” e “fotossíntese” apresentaram o maior número de DAPs associadas, em ambas as cultivares e tratamentos. Tal comportamento é esperado uma vez que se trata de categorias do metabolismo basal das plantas.

Regulação negativa foi observada em uma grande cultivar de processos metabólicos (“estresse” e “redox”, “desenvolvimento celular”, “sinalização”, “metabolismo de hormônios” e “metabolismo de nucleotídeos”), indicando que a cultivar Caline IPA-7 é ineficiente em utilizar estas vias em resposta ao estresse aplicado. A cultivar Caline IPA-7 inoculada apresentou de forma exclusiva, em relação ao controle,

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

a categoria “síntese de tetrapirrólicos”, que está diretamente ligada ao metabolismo do cloroplasto. Resultado semelhante foi observado por Roumani et al. (2022) analisando amostras de tomate após 24h de ação de herbivoria pelo inseto praga *Tuta absoluta*.

Na planta resistente, um aspecto conhecido da interação planta-patógeno é o reconhecimento oportuno do patógeno invasor associado a uma rápida montagem e ativação efetiva dos mecanismos de defesa. A cultivar resistente Yoshimatsu inoculada apresentou DAPs exclusivamente associadas as categorias de “cadeia de transporte de elétrons mitocondriais- mitochondrial electron transport chain (mETC)” e “OPP- Via fosfato pentose oxidativa”. A mETC e OPP estão envolvidas na sinalização de um estresse oxidativo disfuncional e com metabolismo de carboidratos, respectivamente. Tais categorias demonstram que a cultivar resistente possui a capacidade de induzir o acúmulo de proteínas com alta capacidade de responder a ação do patógeno, indicando potenciais alvos para o melhoramento genético por seleção assistida.

Afroz et al. (2009) ao investigar os mecanismos moleculares da resistência bacteriana em cultivares suscetíveis e resistentes de tomate, em resposta a inoculação de *Pseudomonas solanacearum*, identificou um total de nove proteínas expressas diferencialmente entre os cultivares suscetíveis e resistentes. As proteínas identificadas pertencem às categorias de energia, destino proteico e armazenamento e defesa. Destas proteínas, uma chaperonina de 60 kDa e um antígeno de membrana apical foram significativamente acumulados em cultivares resistentes em comparação com cultivares suscetíveis. Em estudos proteômicos Wang e colaboradores (Wang et al. 2021), mostraram que miraculina, HBP2 e TOM20 contribuem para resistência e a PP1 para susceptibilidade a *R. solanacearum* em cultivares de batata.

5 CONCLUSÕES

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

A análise proteômica comparativa de duas cultivares de tomate Caline IPA-7 e Yoshimatsu, susceptível e resistente à *R. pseudosolanacearum*, respectivamente, revelaram proteínas diferencialmente acumuladas e exclusivas, diretamente ligadas ao mecanismo de defesa. Na cultivar resistente foram identificadas oito proteínas exclusivamente acumuladas em resposta à infecção indicando mecanismos de defesa da planta e potenciais marcadores funcionais de resistência. São elas: proteínas de resposta imune e defesa a outros organismos indol-3-acético-amido sintetase (GH3) (A0A3Q7FKJ0); anexinas (A0A3Q7EM80); proteína universal de resposta ao estresse (USP) (A0A3Q7EF29); proteína relacionada à patogênese PR1 e PR10 (A0A3Q7HXW1 e A0A3Q7I9H4), Peroxidase (A0A3Q7H0U0), peroxidase tioredoxina 1 (Q7Y240); proteína dissulfido-isomerase (A0A3Q7HIP9). O acúmulo delas no tomateiro sob estresse pode constituir uma importante estratégia de defesa, podendo contribuir de forma significativa nos programas de melhoramento genético do tomateiro em um processo de seleção assistida de genótipos resistentes à murcha bacteriana. O presente estudo representa uma primeira investigação proteômica de folhas das cultivares Caline IPA-7 e Yoshimatsu, em resposta à *R. pseudosolanacearum*.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

6 REFERÊNCIAS

- Afroz A, Khan MR, Ahsan, N.; Komatsu, S (2019) Comparative proteomic analysis of bacterial wilt susceptible and resistant tomato cultivars. **Peptides** **30**, 1600-7.
- Aglas L, Soh WT, Kraiem A, Wenger M, Brandstetter H, Ferreira F (2020) Ligand Binding of PR-10 Proteins with a Particular Focus on the Bet v 1 Allergen Family. **Current allergy and asthma reports** **20**, 1-11. DOI: 10.1007/s11882-020-00918-4.
- Ahmed I, Yadav D, Shukla P, & Kirti PB (2018). Heterologous expression of Brassica juncea annexin, AnnBj2 confers salt tolerance and ABA insensitivity in transgenic tobacco seedlings. **Functional & integrative genomics** **18**, 5, 569-579.
- Albuquerque GM, Souza EB, Silva AM, Lopes CA, Boiteux LS, Fonseca MEDN (2017). Genome sequence of *Ralstonia pseudosolanacearum* strains with compatible and incompatible interactions with the major tomato resistance source Hawaii 7996. **Genome Announcements** **5**, e00982-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00982-17>.
- Amorim L, Rezende JAM, Bergamin F (2011) (Eds.). Manual de Fitopatologia. Piracicaba. 4 ed. São Paulo: **Agronômica Ceres** **1**, 383-387.
- Atkinson GC, Baldauf SL (2011) Evolução do fator de alongamento G e as origens das formas mitocondrial e cloroplasta. **Mol Biol Evol** **28**, 1281-92. DOI: 10.1093/molbev/msq316.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** **72**, 248-254.
- Bykova NV, Keerberg O, Pärnik T, Bauwe H, Gardeström P (2005) Interaction between photorespiration and respiration in transgenic potato plants with antisense reduction in glycine decarboxylase. **Planta** **222**, 130-40. DOI: 10.1007/s00425-005-1505-9
- Castro PRC, Gonçalves MR, Cato SC (2006) Efeitos da aplicação foliar de Codamin e de Brassinolide em feijoeiro. **Revista da Agricultura** **81**, 24-30.
- Chambery A, Di Maro A, Sanges C. et al. (2009) Improved procedure for protein binder analysis in mural painting by LC-ESI/Q-q-TOF mass spectrometry: detection of different milk species by casein proteotypic peptides. **Anal Bioanal Chem** **395**, 2281–2291. DOI:10.1007/s00216-009-3183-0.
- Chevalier D, Batoux M, Fulton L, Pfister K, Yadav RK, Schellenberg M, Schneitz K (2005). STRUBBELIG defines a receptor kinase-mediated signaling pathway regulating organ development in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **102**, 9074-9079.

- ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*
- Chi YH, Koo SS, Oh HT, Lee ES, Park JH, Phan KAT, ... & Lee SY (2019). The physiological functions of universal stress proteins and their molecular mechanism to protect plants from environmental stresses. **Frontiers in plant science** **10**, 750.
- Coelho Netto RA, Pereira BG, Noda H, & Boher B (2004). Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. **Fitopatologia Brasileira** **29**, 17-23.
- Costa KDS, Santos AMM, Santos PR, Nascimento MR, Silva AMF, Albuquerque GMR, ... & Carvalho Filho JLS (2018). Inheritance of resistance to *Ralstonia pseudosolanacearum* in tomato. **Euphytica** **214**, 1-11.
- Cox J & Mann M (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature biotechnology** **26**, 12, 1367-1372. DOI:10.1038/nbt.1511.
- Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. **Journal of proteome research** **10**, 4, 1794-1805. DOI:10.1021/pr101065j.
- Deuner C, Borges CT, Almeida AS, Meneghello GE, Tunes LVM (2015). Jasmonic acid as a promoter of resistance in plants. **Revista de Ciências Agrárias (Portugal)** **38**, 3, 275-281.
- Ding X, Cao Y, Huang L, Zhao J, Xu C, Li X, Wang S (2008). Activation of the indole-3-acetic acid–amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. **The Plant Cell** **20**, 1, 228-240., DOI:10.1105/tpc.107.055657
- Durner J, Shah J, & Klessig DF (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. **Trends in plant science** **2**, 7, 266-274.
- Elphinstone JG (2005). The current bacterial wilt situation: a global overview. **Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex**, 9-28.
- FAO – Food and agriculture organization of the united nations. **Statistics division**, 2018, Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 29 de junho de 2018.
- Felix KCS, Souza EB, Michereff SJ, Mariano RLR (2012) Survival of 458 *R. solanacearum* in infected tissues of *Capsicum annuum* and in soils of the 459 state of Pernambuco, Brazil. **Phytoparasitica** **40**, 53-62.
- Feng Zhi-Ming et al. (2022) ITRAQ-based quantitative proteomics analysis of defense responses triggered by the pathogen *Rhizoctonia solani* infection in rice. **Journal of Integrative Agriculture** **21**, 139-152. [http://dx.doi.org/10.1016/s2095-3119\(20\)63499-2](http://dx.doi.org/10.1016/s2095-3119(20)63499-2).
- Fernandes H, Michalska K, Sikorski M, Jaskolski M (2013). Structural and functional aspects of PR-10 proteins. **FEBS J.** **280**, 5, 1169–1199. DOI: 10.1111/febs.12114.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Flores-Cruz Z, Allen C (2011) Necessity of OxyR for the hydrogen peroxide stress response and full virulence in *Ralstonia solanacearum*. **Applied and Environmental Microbiology** **77**, 6426-32. DOI: 10.1128/Aem.05813-11.

Flores-Cruz, Z.; Allen, C. **2009** *Ralstonia solanacearum* Encounters an Oxidative Environment During Tomato Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. **22**:7, 773-782.

Freedman RB (1989) Protein disulfide isomerase: Multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. **Cell** **57**.1069

Ghosh S, Narula K, Sinha A, Ghosh R, Jawa P, Chakraborty N, Chakraborty S (2016) Proteometabolomic analysis of transgenic tomato overexpressing oxalate decarboxylase uncovers novel proteins potentially involved in defense mechanism against *Sclerotinia*. **Journal of Proteomics** **143**, 242-253, DOI:10.1016/j.jprot.2016.04.047.

Glazebrook J. **2005** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu Rev Phytopathol** **43**, 205-227. DOI:10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923

Gonzales-Vigil E, Bianchetti CM, Phillips Jr GN, Howe GA (2011). Adaptive evolution of threonine deaminase in plant defense against insect herbivores. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **108**, 14, 5897-5902.

Gonzali S, Loreti E, Cardarelli F, Novi G, Parlanti S, Pucciariello C (2015) Universal stress protein HRU1 mediates ROS homeostasis under anoxia. **Nat. Plants** **1**.15151. DOI: 10.1038/nplants.2015.151

Gorshkova DS, Pojidaeva ES (2021). Members of the universal stress protein family are indirectly involved in gibberellin-dependent regulation of germination and post-germination growth. **Russian Journal of Plant Physiology** **68**, 3, 451-462.

Gutiérrez-Beltrán E, Personat JM, Torre F, Pozo OA (2017) Universal Stress Protein Involved in Oxidative Stress Is a Phosphorylation Target for Protein Kinase CIPK6. **Plant Physiology** **173**, 1, 836–852, DOI: 10.1104/pp.16.00949

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. **45**, 51-88. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.

Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review Phytopathology** **29**, 65–87.

Herrera-Vasquez A, Salinas P, Holuigue L (2015) Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. **Front. Plant Sci.** **2**, 6. DOI:17110.3389/fpls.2015.00171.

Huang H, Ullah F, Zhou DX, Yi M, Zhao Y (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. **Frontiers in Plant Science** **10**, 800.

- ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*
- Huffaker A, Pearce G, Ryan CA (2006) An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **103**, 26, 10098-10103.
- IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil** / Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística brasileira. IBGE, 2017a, 29:12, 86p.
- IBGE. **Divisão regional do Brasil em regiões geográficas imediatas e regiões geográficas intermediárias**. Coordenação de Geografia. IBGE **2017b**, Rio de Janeiro, 82p.
- Jedelská, T., Sedlářová, M., Lochman, J., Činčalová, L., Luhová, L., & Petřivalský, M. (2021). Protein S-nitrosation differentially modulates tomato responses to infection by hemi-biotrophic oomycetes of *Phytophthora* spp. **Horticulture research** **8**.
- Jeske L, Placzek S, Schomburg I, Chang A, Schomburg D (2019). BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource. **Nucleic acids research** **47**, D1, D542-D549.
- Joseph PD (2010) Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. **Hum Genomics Proteomics**, 876940. DOI:10.4061/2010/876940.
- Kim K, Kim KH, Kim HH, & Cheong J (2008). Hepatitis B virus X protein induces lipogenic transcription factor SREBP1 and fatty acid synthase through the activation of nuclear receptor LXR α . **Biochemical Journal** **416**, 2, 219-230.
- Karasawa M, Ferraz E, Silva DJ, Araújo ARL (2012) Desempenho produtivo de linhagens, cultivares e híbridos de tomateiro rasteiro cultivados por gotejamento. **Horticultura Brasileira** **30**, S3529-S3533.
- Kelman A. (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. **Phytopathology** **44**, 693-695.
- Kim JE, Myong K, Shim WB, Yun SH, Lee YW (2007) Functional characterization of acetylglutamate synthase and phosphoribosylamine-glycine ligase genes in *Gibberella zeae*. **Curr Genet** **51**, 99-108. DOI: 10.1007/s00294-006-0110-1.
- Landry D, González-Fuente M, Deslandes L, Peeters N. (2020) The large, diverse, and robust arsenal of *Ralstonia solanacearum* type III effectors and their in planta functions. **Molecular Plant Pathology** **21**, 1377– 1388. DOI: 10.1111/mpp.12977.
- Liang D, Qi Z, Du Y, Yu J, Yu M, Zhang R, ... & Liu Y (2022). Identification of Differentially Expressed Genes Reveal Conserved Mechanisms in the Rice-Magnaporthe oryzae Interaction. **Frontiers in Plant Science**, **13**.
- Lincoln JE, Sanchez JP, Zumstein K, & Gilchrist DG (2018). Plant and animal PR1 family members inhibit programmed cell death and suppress bacterial pathogens in plant tissues. **Molecular Plant Pathology**, **19**, 9, 2111-2123.

- ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*
- Lopes CA (2009) Murcha Bacteriana ou Murchadeira-Uma inimiga do tomateiro em climas quentes. Brasília: Embrapa Hortaliças, **Circular Técnica 67**, 8.
- Lopes CA (2018) Protocolo para avaliação da resistência à murcha bacteriana em genótipos de tomate e pimentas Capsicum. Embrapa, **Circular Técnica 164**. 16.
- Lopes CA, Boiteux LS, Eschembaack V (2015) Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira 33**, 125-130.
- Marquès MP, Bernardo-Faura M, Paulus J, Kaschani F, Kaiser M, Valls M, ... & Coll NS (2018). Protease activities triggered by *Ralstonia solanacearum* infection in susceptible and tolerant tomato lines. **Molecular & Cellular Proteomics 17**, 6, 1112-1125.
- Mata-Pérez C, Spoel SH (2019) Thioredoxin-mediated redox signalling in plant immunity. **Plant Science 279**, 27-33. DOI: 10.1016/j.plantsci.2018.05.001.Vvvvv
- Melencion SMB, Chi YH, Pham TT, Paeng SK, Wi SD, Lee C (2017) RNA chaperone function of a universal stress protein in *Arabidopsis* confers enhanced cold stress tolerance in plants. **Int. J. Mol. Sci. 18**, 2546. DOI: 10.3390/ijms18122546
- Mitchell AL, Attwood TK, Babbitt PC, Blum M, Bork P, Bridge A, ... & Finn RD (2019). InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. **Nucleic acids research 47**, D1, D351-D360.
- Yadav D, Boyidi P, Ahmed I, & Kirti PB (2018). Plant annexins and their involvement in stress responses. **Environmental and Experimental Botany 155**, 293-306.
- Nakayasu M, Umemoto N, Ohyama K, Fujimoto Y, Lee HJ, Watanabe B, ... & Mizutani M (2017). A dioxygenase catalyzes steroid 16 α -hydroxylation in steroidal glycoalkaloid biosynthesis. **Plant Physiology, 175**, 1, 120-133.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, ... & Jones JD (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. **Science 312**, 5772, 436-439.
- Noda H. **Melhoramento de hortaliças em climas desfavoráveis: o desafio do desenvolvimento de cultivares adaptadas à Amazônia**. Simpósio Nordeste de Genética e Melhoramento de Plantas 2009.
- Oliver DJ, Raman R (1995) Glycine decarboxylase: protein chemistry and molecular biology of the major protein in leaf mitochondria. **J Bioenerg Biomembr 27**, 407-14. DOI: 10.1007/BF02110003.
- Park JE, Park JY, Kim YS, Staswick PE, Jeon J, Yun J, Kim SY, Kim J, Lee YH, Park CM (2007) GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. **J. Biol. Chem 282**. 10036–10046.

- ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*
- Pior P, Ailloud F, Dalsing BL, Remenant B, Sanchez B (2016) Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species Philippe. **BMC Genomics** **17**, 90. DOI 10.1186/s12864-016-2413-z.
- Ramírez-Carrasco G, Martínez-Aguilar K, Alvarez-Venegas R (2017) Transgenerational Defense Priming for Crop Protection against Plant Pathogens: A Hypothesis. **Front Plant Sci** **8**, 696. DOI:10.3389/fpls.2017.00696.
- Ramirez-Prado JS, Piquerez SJM, Bendahmane A, Hirt H, Raynaud C, Benhamed M (2018) Modify the Histone to Win the Battle: Chromatin Dynamics in Plant–Pathogen Interactions. **Frontiers in Plant Science** **9**.
- Ranjan A, Ichihashi Y, Sinha NR (2012) The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. **Genome Biol.** **13**, 167. DOI:10.1186/gb-2012-13-8-167.
- Salgotra RK, Stewart CN Jr (2020) Functional Markers for Precision Plant Breeding. **Int J Mol Sci.** **6**,21,13:4792. DOI: 10.3390/ijms21134792.
- Santiago TR, Lopes CA, Caetano-Anollés G, & Mizubuti ESG (2017). Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. **Plant Pathology**, **66**, 3, 383-392.
- Seo PJ, Lee AK, Xiang F, & Park CM (2008). Molecular and functional profiling of Arabidopsis pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. **Plant and Cell Physiology** **49**, 3, 334-344.
- Silva JR **Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões Norte e Nordeste do Brasil**, 2014. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 48p.
- Stangarlin JR, Kuhn OJ, Toledo MV, Portz RL, Schwan-Estrada KRF, & Pascholati SF (2011). The plant defense against pathogens. **Scientia Agraria Paranaensis** **10**, 1, 18-46.
- Sun H, Zhang H, Xu Z, Wang Y, Liu X, Li Y, ... & Zhang H (2021). TMT-based quantitative proteomic analysis of the effects of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pst) infection on photosynthetic function and the response of the MAPK signaling pathway in tobacco leaves. **Plant Physiology and Biochemistry** **166**, 657-667.
- Toukam MSG, Cellier G, Wicker E, Guilbaud C, Kahane R, Allen C, & Prior P (2009). Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. **Plant disease** **93**, 11, 1123-1130.
- Wang B, He T, Zheng X, Song B, Chen H (2021) Responding to the Invasion of *Ralstonia solanacearum* UW551 and Its Type III Secretion System Mutant. **Molecular Plant-Microbe Interactions** **34**, 4, 337-350. DOI: 10.1094/MPMI-06-20-0144-R.

- ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*
- Wang G, Kong J, Cui D, Zhao H, Niu Y, Xu M, Jiang G, Zhao Y, Wang W. (2019) Resistance against *Ralstonia solanacearum* in tomato depends on the methionine cycle and the γ -aminobutyric acid metabolic pathway. **Plant J.** **97**, 1032-1047. DOI: 10.1111/tpj.14175.
- Wang G, Kong J, Cui D, Zhao H, Zhao P, Feng S, Zhao Y, Wang W (2018) Comparative Proteomic Analysis of Two *Ralstonia solanacearum* Isolates Differing in Aggressiveness. **International journal of molecular sciences** **19**, 2444. <https://doi.org/10.3390/ijms19082444>.
- Wang H. et al. (2018) A potato STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY member, StLRPK1, associates with StSERK3/BAK1 and activates immunity. **Journal of experimental botany** **69**, 22, 5573-5586.
- Wang W, Vignari R, Scali M, Cresti M (2006) A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis** **27**, 13, 2782-2786.
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. **Applied and Environmental Microbiology** **71**, 6790-6801.
- Yuliar NA, Toyota K (2015) Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *R. solanacearum*. **Microbes Environ** **30**, 1-11.
- Zohoungbogbo H, Quenum A, Honfoga J, Chen JR, Achigan-Dako E, Kenyon L, Hanson P (2021) Evaluation of Resistance Sources of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to Phylotype I Strains of *Ralstonia solanacearum* Species Complex in Benin. **Agronomy** **11**, 1513. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081513>.
- Zou X, Long J, Zhao K, Peng A, Chen M, et al. (2019) Overexpressing GH3.1 and GH3.1L reduces susceptibility to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by repressing auxin signaling in citrus (*Citrus sinensis* Osbeck). **PLOS ONE** **14**, 12. DOI:10.1371/journal.pone.0220017.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

CAPÍTULO III

INDUÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM *Solanum lycopersicum* EM RESPOSTA À *Ralstonia pseudosolanacearum*: UMA PERSPECTIVA PROTEÔMICA

Artigo a ser submetido à revista Scientia Horticulturae (0304-4238).

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Induction of resistance mechanisms in *Solanum lycopersicum* in response to *Ralstonia pseudosolanacearum*: a proteomic perspective

Bianca Galúcio Pereira Araújo ^{a,b,*}, Elton Pedro Nunes Pena ^c, Fabiana Aparecida Cavalcante Silva ^b, Tercilio Calsa Junior ^c, José Luiz Sandes de Carvalho Filho ^a

^a Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife, PE, Brazil

^b Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Fidelidade Genética, Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Avenida Professor Luís Freire, s/n, 50740-545, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil

^c Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Jornalista Aníbal Fernandes, s/n, 50730-120, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil

* Corresponding author

E-mail address: bianca.araujo@cetene.gov.br (B. G. P. Araújo).

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most economically important vegetables in the world. *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Rp*) is a phytopathogenic bacterium that infects the xylem of plants, causing the devastating disease known as bacterial wilt, which attacks more than 200 plant species worldwide. The objective of this work was to clarify the resistance mechanisms, at the proteomic level, of two *Rp* resistant cultivars: Hawaii 7996 and Yoshimatsu, in response to inoculation of *Rp* strain CCRMRs202, at four days after inoculation. The methodology consisted in the extraction of total soluble proteins, injection in nano-LC-MS/MS mass spectrometer, analysis of the spectra obtained and protein identification in Maxquant software, statistical analysis and selection of differentially accumulated proteins among treatments in Perseus software and categorization by gene ontology in uniprot and Blast2GO. A total of 1306 proteins were obtained and the ones directly linked to the defense response of Hawaii 7996 and Yoshimatsu cultivars when attacked by *Rp* were selected. Several proteins related to pathogenesis (PR-proteins) with antimicrobial action were identified, especially PR5 and PR14, observed exclusively in Hawaii 7996, and PR10, accumulated in both cultivars. The cultivar Hawaii 7996 presented a higher number of DAPs related to the antioxidant system, such as the annexins, when compared to Yoshimatsu. On the other hand, the cultivar

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Yoshimatsu accumulated exclusively proteins related to the cell wall. The exclusive and differentiated accumulation of proteins in two tomato cultivars resistant to *Rp*, when inoculated, broadens the understanding for different resistance strategies to the pathogen, and may contribute significantly in tomato breeding programs in a process of assisted selection of bacterial wilt resistant genotypes.

Keywords: *Solanum lycopersicum*. Biotic stress. Label free proteomics. Mass spectrometry.

1. Introduction

Plants have evolved a sophisticated innate immune system with two fronts to detect and combat invading microorganisms. The first recognizes and responds quickly and efficiently to a wide range of pathogens and non-pathogens (Roux et al., 2014), called PAMP-triggered immunity (PTI) (Zipfel, 2014). However, pathogens release effectors within the plant cell to suppress PTI (Boller and Felix, 2009); thus, plants have developed a second defense front called effector-triggered immunity, which employs resistance genes to recognize effectors encoded by specific pathogens as the ultimate defense strategy against pathogens.

The current understanding of the plant immune system is generally summarized as a simple co-evolutionary model called the "zigzag model" (Jones and Dangl, 2006). Ultimately, to some extent, the outcome of a pathogen invasion depends on the balance between the suppression of the pathogen by the plant immune system and the consequent activation of an effective defense against the pathogen by the plant (Pieterse et al., 2009). These plant immune systems and the pathogen molecules to which they respond provide extraordinary insights into molecular recognition, cell biology and evolution in biological kingdoms.

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.), belonging to the family Solanaceae, is the second most consumed vegetable after potato in global food production. Tomatoes are a rich source of micronutrients such as minerals, vitamins and antioxidants that are essential to the human diet. They also contain high levels of lycopene, an antioxidant

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

that reduces the risks associated with many cancers and neurological diseases (Ranjan et al., 2012). Many pests and diseases affect both the quantity and quality of tomato production, among which bacterial wilt stands out, which has a worldwide distribution and affects more than 200 plant species, including monocots and dicots (Elphinstone, 2005; Wicker et al., 2007).

Bacterial wilt can be caused by a complex of bacterial species of the genus *Ralstonia* (*Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia pseudosolanacearum*, and *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis*). In tomato cultivation this bacterial disease is a limiting factor in tropical regions, making production unviable in parts of the North and Northeast regions of Brazil and the expansion into areas cultivated in greenhouses (Coelho Netto et al., 2004). *R. solanacearum* is prevalent in Petrolina and Serra Talhada and *R. pseudosolanacearum* in Caruaru and Recife (Silva, 2014; Albuquerque et al., 2017; IBGE, 2017; Santiago et al., 2017).

Due to the wide host range and variability of the pathogen, control measures based on the use of resistant cultivars remain the most effective, economical and environmentally friendly method (Denny, 2006). Resistance to bacterial wilt in tomato is a polygenic trait and was reported in the mid-stem when plants were inoculated by the root with *R. solanacearum* (Dahal et al., 2009). Comparative proteomic analysis between control and inoculated treatments of the contrasting cultivars Yoshimatsu and Caline IPA-7, contrasting for resistance to *Ralstonia pseudosolanacearum*, revealed the regulation of several metabolic pathways, especially pathogenesis responsive proteins (PR-proteins), stress-related proteins and antioxidant enzymes (Araújo et al., unpublished data). To further elucidate the interactions between cultivars, it is necessary to evaluate which mechanisms are differentially activated in resistant and inoculated cultivars.

The tomato cultivar Hawaii 7996 is considered the gold standard source of resistance, exhibiting high levels of broad-spectrum resistance/tolerance to a wide

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

range of *R. solanacearum* and *R. pseudosolanacearum* isolates (Hayward, 1991; Toukam et al., 2009; Zohoungbogbo et al., 2021). Studies show that in Hawaii 7996 resistance is associated with the ability to restrict bacterial colonization of vascular tissues (Silva, 2014) rather than prevention of root invasion. Although the search has been a priority in several breeding programs, there are few commercial solanaceous cultivars with an adequate level of resistance to bacterial wilt (Wicker et al., 2007; Zohoungbogbo et al., 2021). The cultivar Yoshimatsu, developed by the National Research Institute of the Amazon – INPA, is originated from the cross of IH-40 with UH-7976, showing resistance governed by more than one gene or gene block with dominance, in addition to additive effects in increasing the character (Castro et al., 2015; Costa et al., 2018). Yuliar et al. (2015) reported that some alleles responsible for wilt resistance relate negatively to productivity and fruit quality, which makes the acceptance of these possible cultivars by growers and consumers unviable.

This way, the objective of the present work was to investigate the leaf proteome of Hawaii 7996 (international standard resistance) and Yoshimatsu (resistant developed in Brazil) cultivars in response to inoculation with the CCRMRs202 strain of *Ralstonia pseudosolanacearum* and thus indicate functional biomarkers useful in the selection of bacterial wilt resistant genotypes.

2. Materials and methods

2.1. Biological material

Two tomato cultivars resistant to bacterial wilt were chosen, developed for tropical conditions. Their main characteristics are shown in Table 1.

Table 1. Characteristics of tomato cultivars used in the experiment.

CHARACTERS	Yoshimatsu	Hawaii 7996
Technology	INPA	EUA

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Bacterial wilt	Resistant	Resistant
Growth habit	Indeterminate	Indeterminate
Group and size round	Round, medium	Round, medium
Market acceptance	Low	High

The selected inoculum was from *Ralstonia pseudosolanacearum*, isolate CCRMRs202, Biovar 3, Phylotype 1, Sequevar I-18, tomato host and originating from the municipality of Gravatá-PE (belonging to the Rosa Mariano Culture Collection, kindly provided by the Phytobacteriology Laboratory of the Agronomy Department of the Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE), whose virulence was previously tested.

2.2. Experimental design

The experiment was conducted in a randomized block design with four repetitions and two plants per plot, in a vegetation house with transparent plastic film roof and walls, located at latitude 8°34'32"S and longitude 34°56'57"O, in the Northeast Strategic Technologies Center – CETENE (Recife, Pernambuco, Brazil), in the period from July 01 to August 01, 2021, with an average temperature of 27.4°C, relative humidity 81%, sunlight intensity 443.3 w/m² and UVI of 4. The weather data were obtained from the Sainlogic Weather Station (transmitter and receiver), model WS3500, frequency 868 MHZ, installed inside the greenhouse.

2.3. Growing conditions of cultivars and inoculation

The cultivars Hawaii 7996 and Yoshimatsu were sown in 96-cell trays, with two seeds per cell, containing commercial substrate. Irrigation was by automated sprinkler irrigation, according to water demand. Eleven days after germination, when the seedlings were approximately 2 cm long, they were thinned and fertirrigated with a nutrient solution (200 g/1,000 L of MAP, 400 g/1,000 L of magnesium sulfate, 25 g/1,000 L of Quelatec AZ®, 25 g/1,000 L of Ultraferro®, 750 g/1,000 L of calcium nitrate

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

and 450 g/1,000 L of potassium nitrate) on alternate days until the day before inoculation, to ensure the uniformity and vigor of the plants to be inoculated.

When the seedlings presented four definitive leaves, they were transplanted to 500 mL containers containing a mixture of soil, washed sand, and humus in the proportion of 3:1:1; properly autoclaved.

To obtain the bacterial suspension, the isolate CCRMRs202 was rescued from preservation in water and cultured in TZC (triphenyl tetrazolium tetrachloride) medium (Kelman, 1954) in a BOD incubator for 48h at $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Then, six plates containing the same culture medium were seeded with disposable loops that touched typical and isolated colony of the bacteria. After bacterial growth in BOD incubator at the temperature of $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48 hours, we proceeded to scrape the colonies and adjust the suspension for the concentration of bacterial cells to about 1×10^8 CFU mL⁻¹, gauging by means of photocolorimeter reading of 0.54 and wavelength of 570 nanometer (Biospectro SP-220) (Lopes, 2018).

Five days after transplanting, the inoculation of the bacterial suspension of *Ralstonia pseudosolanacearum* CCRMRs202 was performed. Using the method of cutting the roots with the aid of a scalpel, a semicircular cut was made in the substrate about 1 cm from the stem of the plant, and then 15 mL of the bacterial suspension was poured into the soil (Lopes, 2018) or distilled water, in the control. After inoculation, irrigations were performed daily with directed hose in plastic containers located under the 500 mL pots, avoiding leaching of the inoculum and keeping the substrate moist.

The samples were collected 24 hours, 4 days, 8 days, and 12 days after inoculation. The aerial part of each plant in the plot was collected individually. The material was placed in 50 mL Falcon tubes under liquid nitrogen and then stored in an ultrafreezer at -80°C until the analysis. For this study, it was chosen the collection four days after inoculation.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

2.4. Extraction and quantification of total soluble proteins

The total leaf soluble proteins of the samples were extracted by the phenolic method of Wang et al. (2006), with modifications. Afterwards, they were quantified according to the Bradford method (Bradford, 1976) using Coomassie Brilliant Blue G-250 as staining reagent and bovine serum albumin (BSA) at a concentration of 1.0 mg/mL to produce the standard curve.

To verify the efficiency of the extraction method and sample integrity, SDS-PAGE electrophoresis was performed in a vertical electrophoresis tank and 12% polyacrylamide gel holder with 1.0 mm thickness and 20x20 dimensions. We applied 50 µg of each sample in triplicate, and the run conditions were varied amperage of 17 mA to 300 V for 15 minutes and changing to 34 mA for 2 h and 30 min and after this time the run was being observed until the end. Low molecular weight marker (LMW Calibration, GE Life Sciences) was used.

2.5. Tryptic digestion

Aliquots of each triplicate containing 50 µg were separated for complex mixture digestion. 25 µL of DTT solution (50 mmol L⁻¹ DTT; 100 mmol L⁻¹ ammonium bicarbonate in water) was added and incubated at 45°C for 1 h. 50 µL of IAA solution (200 mmol L⁻¹ IAA; 100 mmol L⁻¹ ammonium bicarbonate in water) was then added and incubated at room temperature for 1 h in the dark. 1 µL of 1 mol L⁻¹ DTT solution in water, 50 µL of 100 mmol L⁻¹ ammonium bicarbonate solution in water, and 100 µL of trypsin dissolved in 100 mmol L⁻¹ ammonium bicarbonate; 5% (v/v) ACN in water were added. After, they were incubated at 37°C overnight (16 h).

The peptide solution was dried in Speed Vac for about 2 h at room temperature and the microtubules were stored at -20°C for further analysis in nano-LC-MS/MS.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

2.6. Nano-LC-MS/MS mass spectrometry and protein identification

The samples were analyzed in the mass spectrometry unit RPT02H/Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná. Peptides were analyzed in triplicate for each treatment (HAWAII_inoculated; YOSH_inoculated), and in duplicate runs by LC-MS/MS on an Easy-nLC 1000 online with an LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific). Chromatography was performed on a C18 column (30 cm long, 75 µm I.D., 1.9 µm particle size) with a flow rate of 250 nL/min and a linear gradient of 5-40% acetonitrile in 0.1% formic acid and 5% DMSO for 2 h. MS data were acquired in DDA mode, with MS1 full scan performed on the orbitrap (60,000 resolution) and MS2 on the quadrupole linear trap, where the ten most intense ions were subjected to CID fragmentation.

2.6.1. Data analysis

The raw data obtained from LC-MS/MS analysis were analyzed in MaxQuant software, version 1.6.1.0 (Cox and Mann, 2008; Cox et al., 2011). Standard parameters were used, including trypsin as protease, carbamidomethylation of cysteine as fixed modification, acetylation of the N-terminal protein, and methionine oxidation as variable modification. The *Solanum lycopersicum* protein database containing 34,665 entries, from Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), was used, using the maximum allowed cleavages lost by trypsin up to 1, variable modifications by carbamidomethyl (C), and N-terminal acetyl and methionine oxidation (M). Only proteins with a score greater than 50% and confidence greater than 99% were considered (Chambery et al., 2009).

The Perseus package (available at <http://www.maxquant.org/>) was used for statistical analysis and determination of differentially accumulated proteins (DAPs) using the T-Student Test ($p < 0.05$). For the present work, was performed a comparison HAWAII_inoculated × YOSH_inoculated in order to evaluate the defense mechanism used by each cultivar in response to inoculation with *R. pseudosolanacearum*. DAPs

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

identified in both groups were termed "common", and those observed in only one group "exclusive".

2.7. Gene ontology

Sequences in FASTA format of the annotated proteins were retrieved from UniProt using the Retrieve ID tool and subjected to gene ontology (GO) distribution analysis in the OmicsBox/Blast2GO program (<https://www.biobam.com/omicsbox/>), using the Blastp, InterProScan and GO-Slim tools (Mitchell et al., 2019). The parameters of biological process, molecular function and cell component were analyzed.

2.8. Protein-protein interaction network and GO term enrichment analysis

Protein-protein biomolecular networks were obtained in String software version 11.5 which has a database of experimental and predicted protein interaction information (Szklarczyk et al., 2021). Each node in the network represents a protein molecule and the line represents the interaction among the proteins. The wider the line, the higher the score, and the narrower the line, the lower the score. In this study, the cut-off confidence score of protein interactions was ≥ 0.4 . Proteins directly related to GO Biological process of defense response against pathogens were highlighted.

GO term enrichment analysis was performed on the ShinnyGO server (Bykova et al., 2005), using an FDR < 0.05 (false discovery rate) as statistically significant. Dotplot type graphs, which creates a network of highly significant genes in major biological pathways of biological process and correlation network among the enriched terms were generated.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

3. Results

LC-MS/MS mass spectrometry analysis allowed the identification of 1385 proteins in total. Initially a cleanup of contaminants of the "only identified by site", "reverse" and "potential contaminants" types was performed, resulting in 1306 proteins. Valid values filtering was then performed, where we selected only proteins present in at least three samples from the quadruplicate run, resulting in 208 DAPs in cultivar Hawaii 7996 and 72 in Yoshimatsu (Table 2).

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Table 2. DAPs of Hawaii 7996 and Yoshimatsu cultivars associated with gene ontologies (GO) referring to defense and response to oxidative and or biotic stress, potential indicators of functional biomarker genes with differential expression in resistance against *Ralstonia pseudosolanacearum*. Log2(FC): log2 of the ratio of variation of protein accumulation in inoculated cultivar Hawaii 7996 relative to inoculated Yoshimatsu.

GENE ONTOLOGY (BIOLOGICAL PROCESS)	PROTEIN NAMES	HAWAII 7996	YOSHIMATSU	LOG2FC (C/E)
defense response [GO:0006952], abscisic acid-activated signaling pathway [GO:0009738]; regulation of protein serine/threonine phosphatase activity [GO:0080163], defense response to other organism [GO:0098542]; immune response [GO:0006955]	Bet_v_1 domain-containing protein (PR10)	A0A3Q719H4	A0A3Q719H4	2.53
	Bet_v_1 domain-containing protein (PR10)	A0A3Q7FV86	A0A3Q7FV86	2.09
	Uncharacterized protein	A0A3Q7HTH3	-	exc
	LRRNT_2 domain-containing protein	A0A3Q7JMX3	-	exc
defense response to fungus [GO:0050832]; cell wall macromolecule catabolic process [GO:0016998]; chitin catabolic process [GO:0006032]; polysaccharide catabolic process [GO:0000272]; cell wall modification [GO:0042545]; pectin catabolic process [GO:0045490]	Acidic 26 kDa endochitinase (PR5)	Q05539	-	exc
	Basic 30 kDa endochitinase (PR5)	Q05538	-	exc
	Pectinesterase	A0A3Q7F5K0	-	exc
calcium ion transmembrane transport [GO:0070588]; phloem sucrose unloading [GO:0110128]; potassium ion export across plasma membrane [GO:0097623]; primary root development [GO:0080022]; response to abscisic acid	Annexin	O81536	-	exc
	Chlorophyll a-b binding protein 6A, chloroplastic	P12360	-	exc
	Lactoylglutathione lyase	Q42891	-	exc

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

[GO:0009737]; response to cold [GO:0009409]; response to heat [GO:0009408]; response to salt stress [GO:0009651]; response to water deprivation [GO:0009414]; photosynthesis, light harvesting in photosystem I [GO:0009768]; protein-chromophore linkage [GO:0018298]; response to light stimulus [GO:0009416]; methylglyoxal catabolic process to D-lactate via S-lactoyl-glutathione [GO:0019243]; cellular response to calcium ion [GO:0071277]; de-etiolation [GO:0009704]; regulation of stomatal closure [GO:0090333]

Rhodanese domain-containing protein

A0A3Q7FI22

-

exc

cellular response to heat [GO:0034605]; protein folding [GO:0006457]; protein stabilization [GO:0050821]; cellular response to heat [GO:0034605]; protein folding [GO:0006457]; protein stabilization [GO:0050821]; cellular response to unfolded protein [GO:0034620]; chaperone cofactor-dependent protein refolding [GO:0051085]; endoplasmic reticulum unfolded protein response [GO:0030968]; protein refolding [GO:0042026]; ubiquitin-dependent ERAD pathway [GO:0030433]; cellular response to unfolded protein [GO:0034620]; chaperone cofactor-dependent protein refolding [GO:0051085]; protein refolding [GO:0042026]; coumarin biosynthetic process [GO:0009805]; response to molecule of fungal

Molecular chaperone Hsp90-1

Q6UJX4

Q6UJX4

1.51

HATPase_c domain-containing protein

A0A3Q7HLX5

-

exc

Luminal-binding protein

P49118

-

exc

Uncharacterized protein

A0A3Q7FX57

-

exc

Steroid 16alpha-hydroxylase

Q40131

Q40131

1.86

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum* origin [GO:0002238]

	Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin	Q7Y240	Q7Y240	1.44	
	Protein disulfide-isomerase	A0A3Q7GX88	-	exc	
	Protein disulfide-isomerase	A0A3Q7HI26	-	exc	
	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2	Q43779	-	exc	
response to stress [GO:0006950]; response to oxidative stress [GO:0006979]; cell redox homeostasis [GO:0045454]; cellular response to oxidative stress [GO:0034599]; hydrogen peroxide catabolic process [GO:0042744]; protein folding [GO:0006457]; response to endoplasmic reticulum stress [GO:0034976]; removal of superoxide radicals [GO:0019430]	Glutathione peroxidase	A0A3Q7HK83	A0A3Q7HK83	1.68	
	Glutathione peroxidase	A0A3Q7JAZ2	-	exc	
	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	O24031	-	exc	
	Annexin	A0A3Q7G528	-	exc	
	Non-specific lipid-transfer protein (PR14)	A0A3Q7HZ96	-	exc	
	Uncharacterized protein	A0A3Q7IJL2	-	exc	
	Non-specific lipid-transfer protein (PR14)	Q4A1N1	-	exc	
		Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	-	Q9FZ05	exc
	cell wall biogenesis [GO:0042546]; cell wall organization [GO:0071555]; xyloglucan metabolic process [GO:0010411]; cell wall modification [GO:0042545]; pectin catabolic process [GO:0045490]	Pectinesterase	A0A3Q7GM93	A0A3Q7GM93	0.84
		Pectinesterase	A0A3Q7GS13	A0A3Q7GS13	0.59

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

defense response to other organism [GO:0098542]; immune response [GO:0006955]; photosynthesis [GO:0015979]	Protein kinase domain- containing protein	A0A3Q7GV49	A0A3Q7GV49	0.70
lipid metabolic process [GO:0006629]	c domain-containing protein	-	K4B3Y8	exc
cellular response to oxidative stress [GO:0034599]; cell redox homeostasis [GO:0045454]; hydrogen peroxide catabolic process [GO:0042744]	Protein-methionine-S-oxide reductase Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin	G3K2M4	G3K2M4 A0A3Q7EHP3	0.60 exc
mitochondrial phosphate ion transmembrane transport [GO:1990547]; phosphate ion transmembrane transport [GO:0035435]; response to salt stress [GO:0009651]	Phosphorus transporter Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	K4BDP2 A0A3Q7I0X4	K4BDP2 A0A3Q7I0X4	0.73 0.73
photosynthesis, light harvesting in photosystem I [GO:0009768]; protein-chromophore linkage [GO:0018298]; response to light stimulus [GO:0009416]	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	A0A3Q7G195	A0A3Q7G195	0.28
photosynthesis, light harvesting in photosystem I [GO:0009768]; protein-chromophore linkage photosynthetic electron transport in photosystem II; [GO:0018298]; response to herbicide [GO:0009635]	Photosystem II protein D1	Q2MIC0	Q2MIC0	0.34

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

3.1. Gene ontology

Gene ontology analysis assessed the distribution of identified proteins into categories based on biological process. In both cultivars it was possible to observe that the categories with the highest number of related DAPs were "cellular process", "metabolic process" and "response to stimuli". The inoculated cultivar Hawaii 7996 showed exclusively the categories "cell detoxification", "primary root development" and "sucrose accumulation in phloem". Both cultivars presented categories directly related to defense mechanisms against pathogens, namely "biological regulation", "immune response" and "defense response to other organisms" (Figures 1 and 2).

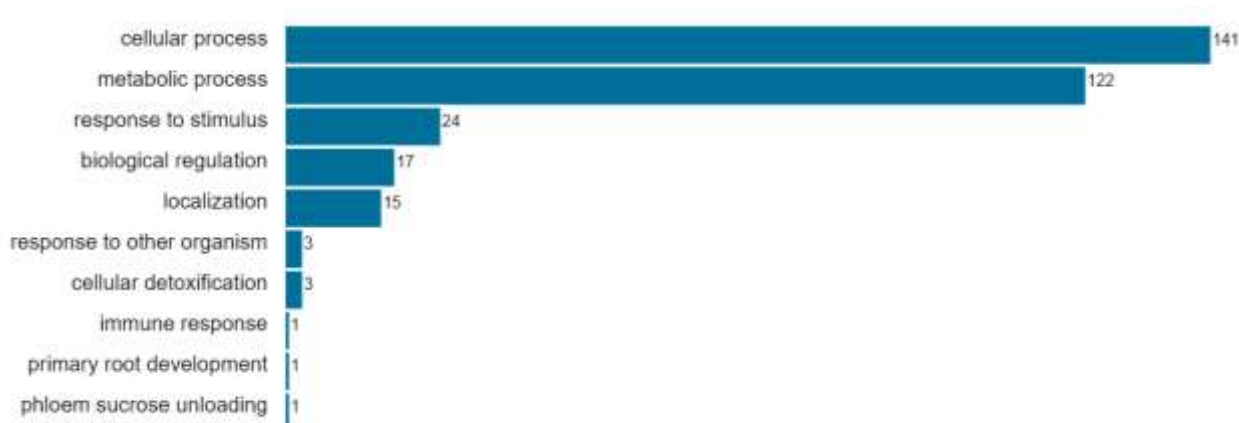


Figure 1. Gene ontology analysis by biological process of cultivar Hawaii 7996 in response to *Ralstonia pseudosolanacearum*.



Figure 2. Gene ontology analysis by biological process of cultivar Yoshimatsu in response to *Ralstonia pseudosolanacearum*.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

3.2. Protein-protein interaction and enrichment analysis

The protein-protein interaction network of both cultivars showed intense correlation among the proteins related to the GO categories of cellular defense process (Figure 3).

Enrichment analysis of the biological process GO terms of the cultivar Hawaii 7996 revealed several categories directly associated with the defense mechanisms involved in the response against *Rp*, especially "stress response", "stimulus response", which were directly related to "catabolic process" in the correlation network of the enriched terms (Figure 4). The cultivar Yoshimatsu did not show enriched categories directly linked to biotic stress, but induced DAPs related to several categories of the photosynthetic process and antioxidant system. These categories, as well as those of the basal metabolism of the plant, showed a close correlation (Figure 5).

In the present work, we selected the biological processes and the respective DAPs directly linked to the differential mechanisms of response to biotic stress in resistant cultivars inoculated with *Rp*.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

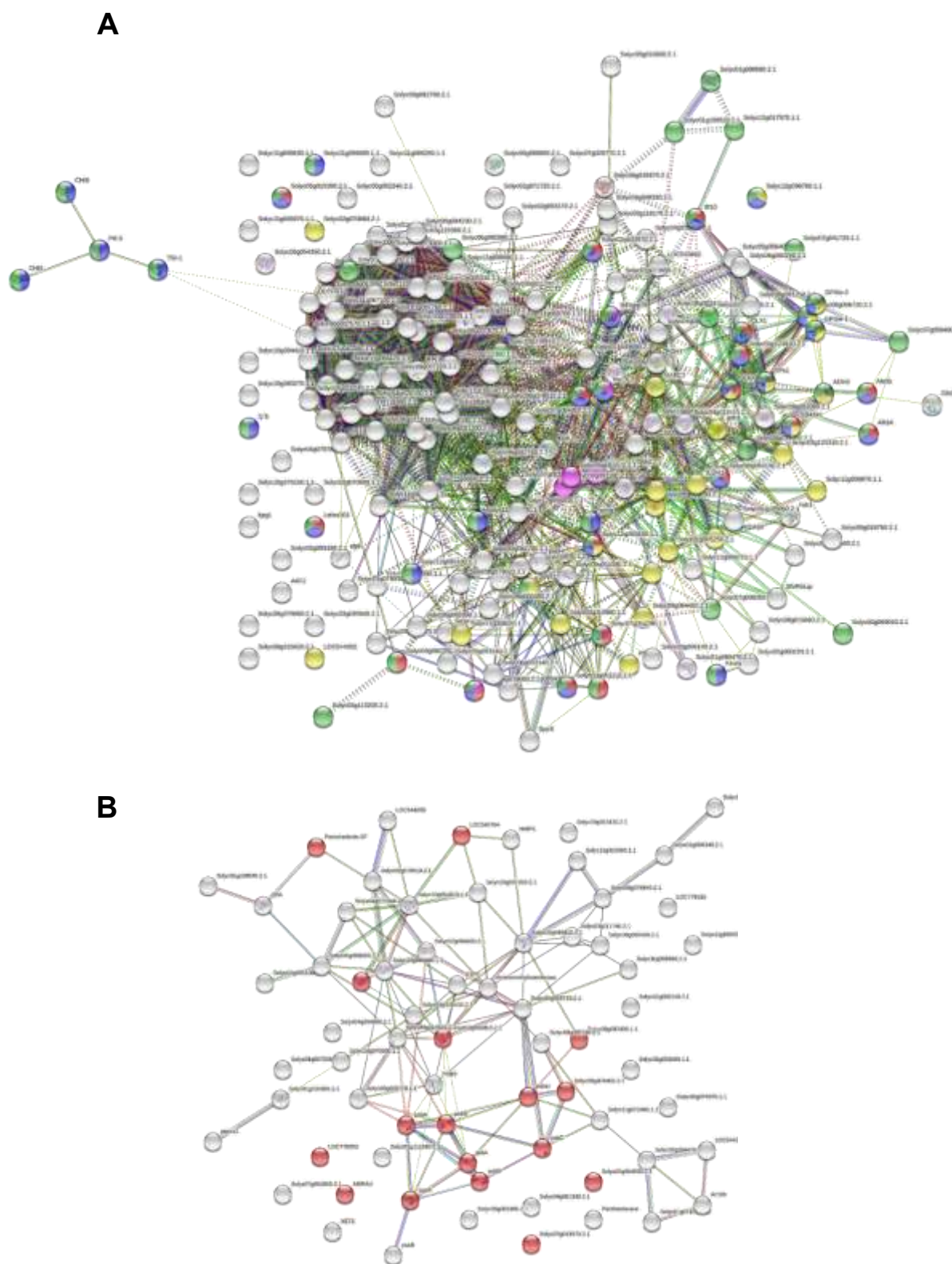
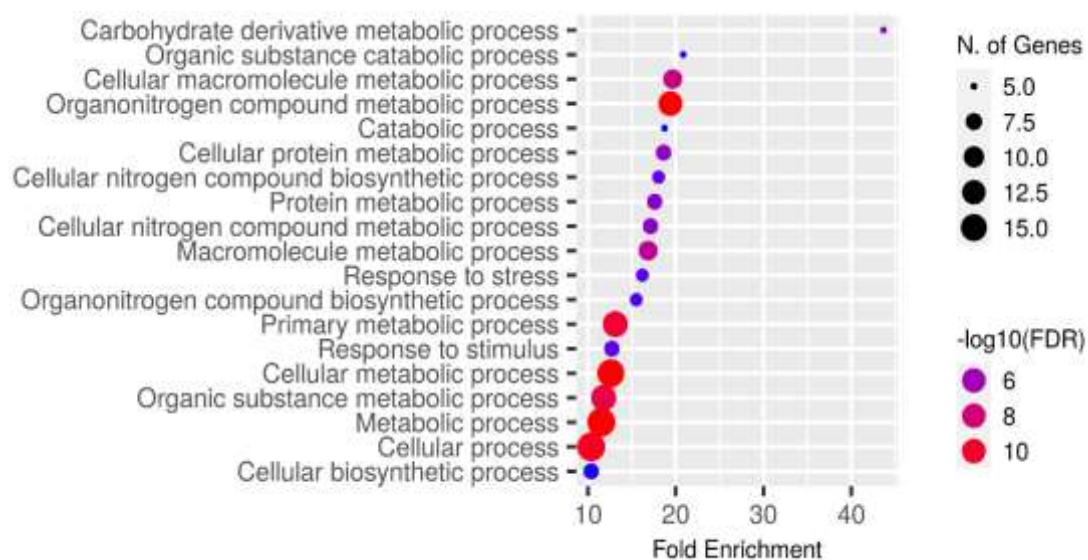


Figure 3. Protein-protein interactions obtained in String software. Hawaii 7996 (A) and Yoshimatsu (B) cultivars in response to *Ralstonia pseudosolanacearum*.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

A



B

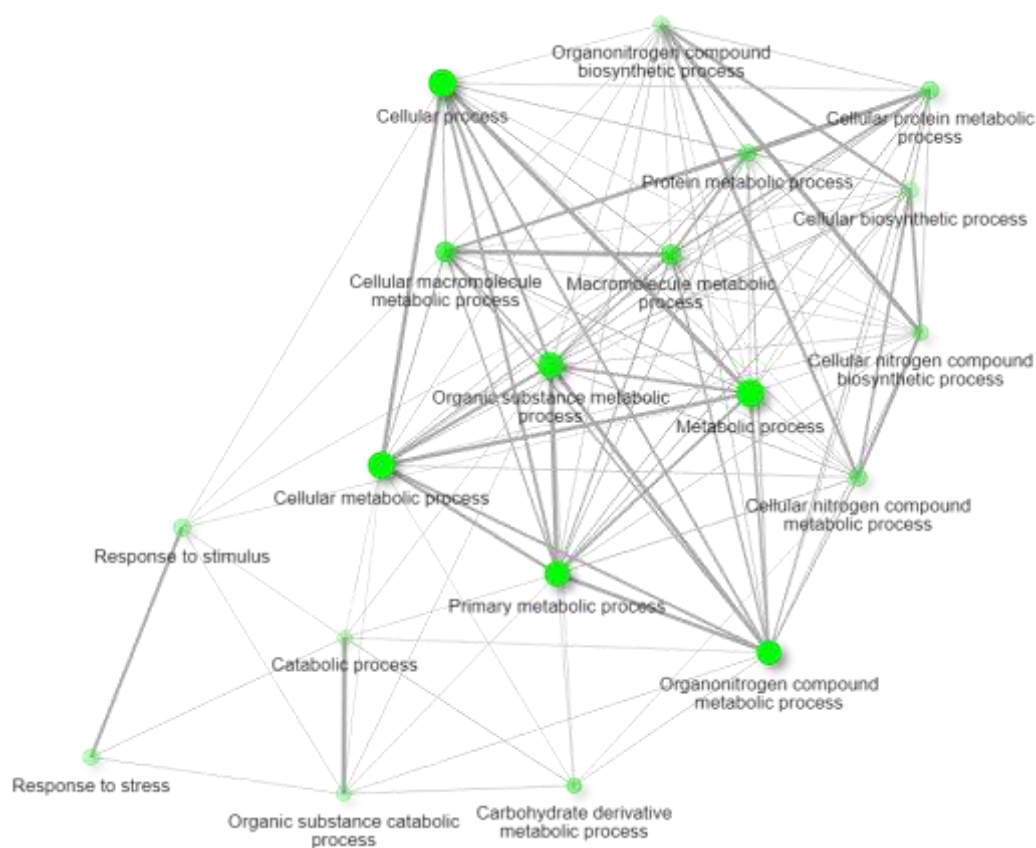


Figure 4. GO term distribution after enrichment analysis of cultivar Hawaii 7996 in response to *Ralstonia pseudosolanacearum*. A) Dot plot of biological process GO terms; B) Correlation network among identified categories.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

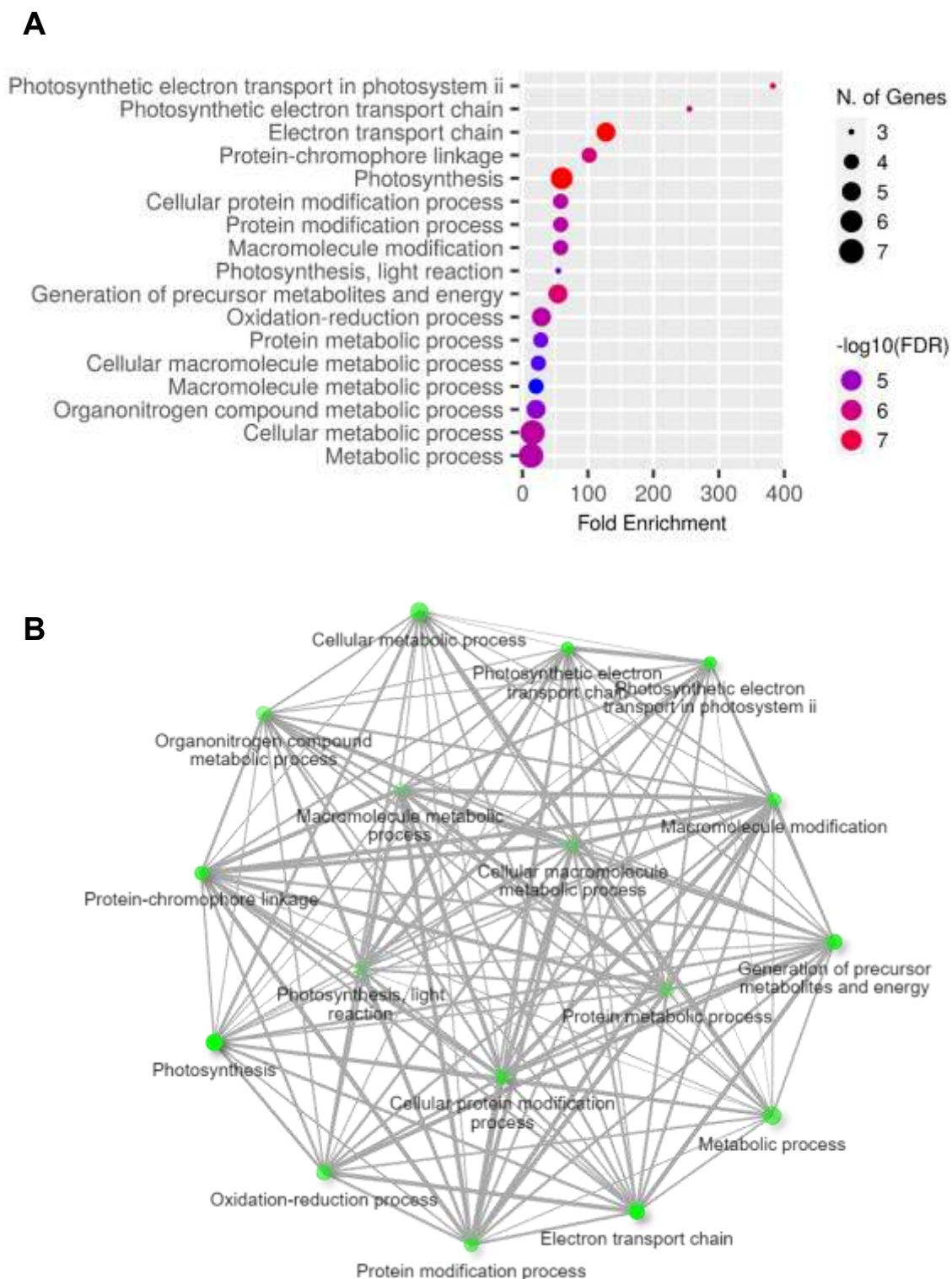


Figure 5. Distribution of GO terms after enrichment analysis of cultivar Yoshimatsu in response to *Ralstonia pseudosolanacearum*. A) Dot plot of biological process GO terms; B) Correlation network among the identified categories.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

4. Discussion

Resistance mechanisms can protect plants against pathogens; however, little is known about the similarities and differences among such immune responses in different resistant cultivars. Considering that the current knowledge on *Rp* resistance mechanisms in tomato needs further study, in the present study we proposed to characterize two tomato cultivars resistant to *Ralstonia pseudosolanacearum*, using large-scale proteomic analysis, and to indicate functional markers useful for tomato breeding.

4.1. Gene ontology, protein-protein interaction and enrichment analysis

Overall, we observed a contrasting behavior of the resistant cultivars in response to the presence of the pathogen. The analyses demonstrated that the cultivar Hawaii 7996, considered a resistance standard in several studies, induced a higher accumulation of defense-related DAPs compared to Yoshimatsu, which invested in cell wall strengthening and photosynthetic mechanisms, revealing different defense mechanisms.

4.2. DAPS related to antioxidant mechanism

The production of reactive oxygen species (ROS) can be an effective strategy in controlling the spread of the pathogen, however, it is also necessary the activation of mechanisms for detoxification of ROS that, in high concentrations, can lead to damage to cellular structures (Huang et al., 2019). In this sense, the cultivar Hawaii 7996 had a higher number of DAPs involved in the antioxidant system, revealing greater efficiency of Hawaii in maintaining redox homeostasis.

Protein disulfide-isomerase (PDI) (A0A3Q7GX88 and A0A3Q7HI26) is an oxidoreductase enzyme belonging to the thioredoxin superfamily. PDI is mainly localized in the luminal region of the endoplasmic reticulum (ER), catalyzing the reduction, oxidation and isomerization of disulfide bridges on cysteine residues, thus holding important function

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

as an oxidative chaperone in the ER (Tu et al., 2000; Khan and Mutus, 2014). This protein participates in various aspects of plant physiology, especially regulating cellular antioxidant metabolism (Huang et al., 2005). Recently, Li et al. (2020) identified that overexpression of the tomato PDI gene (*SIPDI*) in transgenic plants infected with tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) made this cultivar more resistant to the virus, from the increase of antioxidant enzymes such as SOD and POD, and by reducing cytoplasmic H₂O₂ levels.

Superoxide dismutase (SOD) (Q43779) is an important antioxidant enzyme considered as a first line of defense in the face of ROS, performing catalytic action involved in the dismutation of superoxide radicals (O₂^{•-}), forming in this process H₂O₂ and O₂. (SOD [Cu-Zn] can be found in the cytosol (SOD I [Cu-Zn]) or in chloroplasts (SOD II [Cu-Zn]) (Singh et al., 2016). However, the production of H₂O₂ by the action of SOD is harmful as it can easily diffuse across the membrane and damage other cellular compartments. Thus, peroxidases such as glutathione peroxidase (APX) (A0A3Q7HK83, A0A3Q7JAZ2, O24031) and glutaredoxin-dependent peroxiredoxin (Q7Y240) are responsible for detoxifying H₂O₂ and organic hydroperoxides, catalyzing the reduction of H₂O₂ into molecules with low or no toxicity such as H₂O, O₂ and alcohol (Bréhélin et al., 2003; Kumar and Prasad, 2018).

Annexins (A0A3Q7G528) are a family of proteins associated with vital cellular functions such as cytoskeleton organization, vesicle transport, signal transduction, as well as favoring ion permeability between cell membranes (Mortimer et al., 2008). These proteins have great relevance in cell signaling to environmental stresses through intracellular Ca²⁺ transport. Different studies have already observed the induction in annexin expression in plants under the attack of phytopathogens and pest insects, indicating its importance in signaling and activation of general defense mechanisms against these invaders (Ahmed et al., 2018). About *S. lycopersicum* it was found, in a proteometabolomics study, that annexin expression was induced in fruits of the transgenic tomato cultivar E8.2-OXDC infected by the fungus *Sclerotinia rolfsii* (Ghosh et al., 2016).

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

In contrast to cultivar Hawaii 7996, Yoshimatsu did not show a large number of DAPs related to the antioxidant system. Among these, methionine (S)-S-oxide reductase (MSRs) (G3K2M4) stands out, an enzyme capable of reducing methionine sulfoxide (MetO), a product originating from the oxidation of methionine (Met). These reductases perform direct antioxidant function to preserve cellular structures via protein repair, preventing oxidative damage, thus assisting in maintaining cellular redox homeostasis (Rey and Tarrago, 2018).

4.3. DAPS related to pathogenesis

Plants have developed, throughout evolution, a fantastic surveillance system to detect phytopathogens (Meng and Zhang, 2013), in order to prevent their harmful effect. This system can prevent the plant from being infected, kill or remove the pathogen or even reduce its harmful effect. After pathogen detection, a number of defense mechanisms are activated, among them: rapid oxidative detoxification, callose deposition and antimicrobial compounds, leading to the presence of pathogenesis-related (PR) proteins (Bigeard et al., 2015).

PR family proteins are antimicrobial or pathogenesis-related, small (approximately 17kDa) and slightly acidic that act in the cytoplasm in response to injury or pathogen attack. They are accumulated mainly at the site of infection and in systemic tissues, provide broad spectrum systemic resistance (Wu et al., 2014; Zeilinger et al., 2016).

Many PR proteins act in the degradation of the polysaccharide structure of fungi and bacteria, preventing or impairing the development of these microorganisms in the plant, as they have activity such as chitinases, glucanases and some proteins that bind to chitin (Zareie et al., 2002).

In the cultivar Hawaii 7996, PR5 (Q05539 and Q05538) and PR14 (A0A3Q7HZ96 and Q4A1N1) were accumulated exclusively and PR10 (A0A3Q7I9H4 and A0A3Q7FV86) differentially. Since this group of proteins is directly related to plant protection from pathogen attack, their greater presence in the Hawaii 7996 cultivar may be a strong

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

indication of the cultivar's ability to more quickly detect the pathogen and fight it, and may constitute an important factor in the defense of this species to be tested by functional genomics.

Proteins of the LRRNT_2 class were accumulated exclusively in the Hawaii 7996 cultivar. Leucine-rich repeats (LRRs) are described in the literature as an important class of biotic stress response proteins and involved in structural functions of cell walls and membranes in crops such as grapes, cocoa and barley (Wang et al., 2012; Wójcik-Jagla et al., 2021; Baruah et al., 2022). This defense mechanism associated with cellular structures may be an indication for a resistance differential of cultivar Hawaii 7996 to *Ralstonia* sp.

4.4. Cell wall-related DAPS

The plant cell wall represents the first barrier to pathogens. Most of them need to degrade the wall components to penetrate and colonize host tissues and release nutrients to sustain their growth. Thus, cell wall integrity affects the susceptibility of the plant to pathogens. Several studies have shown that pectic enzymes are virulence factors in plant-pathogen interaction (Lionetti et al., 2012).

Expression of xyloglucan endotransglucosylases/hydrolases (XET) was detected in tomato resistant to dodder attack, suggesting that both host and parasite use these enzymes in their "arms race" (Olsen et al., 2016). This protein was uniquely accumulated in the Yoshimatsu cultivar when inoculated by *Rp*, and may contribute to the cultivar's own defense mechanisms.

Differentially expressed cell wall-related proteins were accumulated in the Yoshimatsu cultivar when inoculated by *Rp* (Q9FZ05, A0A3Q7GM93 and A0A3Q7GS13), possibly indicating a differentiated mechanism in the plant-pathogen interaction and the dynamic role of its alteration during resistance expression.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

5. Conclusions

The proteomic analysis of two tomato cultivars resistant to *Ralstonia pseudosolanacearum* (Hawaii 7996 and Yoshimatsu) allowed us to highlight their possible defense mechanisms and indicate candidates for biomarkers, since each cultivar accumulated differently and even exclusively some proteins related to defense and response to biotic stress. Among these proteins we highlight those related to pathogenesis PR5 (Q05539 and Q05538), PR10 (A0A3Q7I9H4 and A0A3Q7FV86) and PR14 (A0A3Q7HZ96 and Q4A1N1), the annexins (A0A3Q7G528), that are proteins related to the antioxidant mechanism and the pectinesterase and xyloglucan endotransglycosylase (XET) (Q9FZ05, A0A3Q7GM93 and A0A3Q7GS13), related to the cell wall.

References

- Ahmed, I., Yadav, D., Shukla, P., Kirti, P.B., 2018. Heterologous expression of *Brassica juncea* annexin, *AnnBj2* confers salt tolerance and ABA insensitivity in transgenic tobacco seedlings. *Funct. Integr. Genomics* 18, 569–579.
<https://doi.org/10.1007/s10142-018-0614-z>.
- Albuquerque, G.M.R., Souza E.B., Silva, A.M.F., Lopes, C.A., Boiteux, L.S., Fonseca, M.E.N., 2017. Genome sequence of *Ralstonia pseudosolanacearum* strains with compatible and incompatible interactions with the major tomato resistance source Hawaii 7996. *Genome Announc.* 5(36), e00982-17.
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00982-17>.
- Baruah, I.K., Ali, S.S., Shao, J., Lary, D., Bailey, B.A., 2022. Changes in gene expression in leaves of cacao genotypes resistant and susceptible to *Phytophthora palmivora* infection. *Front. Plant Sci.* 12, 780805. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.780805>.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

- Bigeard, J., Colcombet, J., Hirt, H., 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol. Plant* 8(4), 521–539. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>.
- Boller, T., Felix, G., 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Bréhélin, C., Meyer, E.H., Souris, J.-P., Bonnard, G., Meyer, Y., 2003. Resemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxiredoxins: similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. *Plant Physiol.* 132(4), 2045–2057. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022533>.
- Bykova, N.V., Keerberg, O., Pärnik, T., Bauwe, H., Gardeström, P., 2005. Interaction between photorespiration and respiration in transgenic potato plants with antisense reduction in glycine decarboxylase. *Planta* 222(1), 130–140. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1505-9>.
- Castro, R.S., Noda, H., Lourenço, J.N.P., Guimarães, R.R.P., Xisto, G.J., 2015. Resistência genética de cultivares e linhagens de tomateiro à “murcha bacteriana”, in: Congresso Brasileiro de Agroecologia, 9., Belém-PA. Resumos... *Cadernos de Agroecologia* 10(3), 1–5.
- Chambery, A., Di Maro, A., Sanges, C., Severino, V., Tarantino, M., Lamberti, A., Parente, A., Arcari, P., 2009. Improved procedure for protein binder analysis in mural painting by LC-ESI/Q-q-TOF mass spectrometry: detection of different milk species by casein proteotypic peptides. *Anal. Bioanal. Chem.* 395(7), 2281–2291. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3183-0>.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Coelho Netto, R.A., Pereira, B.G., Noda, H., Boher, B., 2004. Murcha bacteriana no estado do Amazonas, Brasil. *Fitopatol. Bras.* 29(1), 21–27. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000100004>.

Costa, K.D.S., Santos, A.M.M., Santos, P.R., Nascimento, M.R., Silva, A.M.F., Albuquerque, G.M.R., Batista R.O., Pereira, J. W. L.; Carvalho Filho, J.L.S., 2018. Inheritance of resistance to *Ralstonia pseudosolanacearum* in tomato. *Euphytica* 214(8), 137. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2217-0>.

Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>.

Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J.V., Mann, M., 2011. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* 10(4), 1794–1805. <https://doi.org/10.1021/pr101065j>.

Dahal, D., 2009. Characterization of defense responses of susceptible and resistant tomato genotypes against bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*, a proteomic approach. Dissertation (Doktors der Naturwissenschaften) – Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover, 147 p. <https://doi.org/10.15488/7188>.

Denny, T.P., 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species, in: Gnanamanickam, S.S. (Ed.), *Plant-associated bacteria*. Springer Publishing, Dordrecht, The Netherlands, pp. 573–644. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_16.

Elphinstone, J.G., 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview, in: Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C. (Eds.), *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*. APS Press, Saint Paul, pp. 9–28.

Ghosh, S., Narula, K., Sinha, A., Ghosh, R., Jawa, P., Chakraborty, N., Chakraborty, S., 2016. Proteometabolomic analysis of transgenic tomato overexpressing oxalate decarboxylase uncovers novel proteins potentially involved in defense mechanism

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

against *Sclerotinia*. J. Proteomics 143, 242–253.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.047>.

Hayward, A.C., 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 29, 65–87.

<https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>.

Huang, D.-J., Chen, H.-J., Lin, Y.H., 2005. Isolation and expression of protein disulfide isomerase cDNA from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') storage roots. Plant Sci. 169(4), 776–784. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.034>.

Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X., Yi, M., Zhao, Y., 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. Front. Plant Sci. 10, 800.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00800>.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. Divisão regional do Brasil em regiões geográficas imediatas e regiões geográficas intermediárias. IBGE, Coordenação de Geografia, Rio de Janeiro.

Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. Nature 444, 323–329.

<https://doi.org/10.1038/nature05286>.

Kelman, A., 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44, 693–695.

Khan, H.A., Mutus, B., 2014. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. Front. Chem. 2, 70.

<https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00070>.

Kumar, A., Prasad, M.N.V., 2018. Plant-lead interactions: transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. Ecotoxicol. Environ. Saf. 166, 401–418.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.113>.

Li, T., Wang, Y.-H., Huang, Y., Liu, J.-X., Xing, G.-M., Sun, S., Li, S., Xu, Z.-S., Xiong, A.-S., 2020. A novel plant protein-disulfide isomerase participates in resistance response

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

against the TYLCV in tomato. *Planta* 252, 25. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03430-1>.

Lionetti, V., Cervone, F., Bellincampi, D., 2012. Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *J. Plant Physiol.* 169(16), 1623–1630. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.006>.

Lopes, C.A., 2018. Protocolo para avaliação da resistência à murcha bacteriana em genótipos de tomate e pimentas *Capsicum*. Embrapa, Circular Técnica 164. 16 p.

Meng, X., Zhang, S., 2013. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51(1), 245–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>.

Mitchell, A.L., Attwood, T.K., Babbitt, P.C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S.D., Chang, H.-Y., El-Gebali, S., Fraser, M.I., Gough, J., Haft, D.R., Huang, H., Letunic, I., Lopez, R., Luciani, A., Madeira, F., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D.A., Necci, M., Nuka, G., Orengo, C., Pandurangan, A.P., Paysan-Lafosse, T., Pesseat, S., Potter, S.C., Qureshi, M.A., Rawlings, N.D., Redaschi, N., Richardson, L.J., Rivoire, C., Salazar, G.A., Sangrador-Vegas, A., Sigrist, C.J.A., Sillitoe, I., Sutton, G.G., Thanki, N., Thomas, P.D., Tosatto, S.C.E., Yong, S.-Y., Finn, R.D., 2019. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* 47(D1), D351–D360. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1100>.

Mortimer, J.C., Laohavisit, A., Macpherson, N., Webb, A., Brownlee, C., Battey, N.H., Davies, J.M., 2008. Annexins: multifunctional components of growth and adaptation. *J. Exp. Bot.* 59(3), 533–544. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm344>.

Olsen, S., Popper, Z.A., Krause, K., 2016. Two sides of the same coin: xyloglucan endotransglucosylases/hydrolases in host infection by the parasitic plant *Cuscuta*. *Plant Signal. Behav.* 11(3), e1145336. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1145336>.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308–316.

<https://doi.org/10.1038/nchembio.164>.

Ranjan, A., Ichihashi, Y., Sinha, N.R., 2012. The tomato genome: implications for plant breeding, genomics and evolution. *Genome Biol.* 13, 167. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-8-167>.

Rey, P., Tarrago, L., 2018. Physiological roles of plant methionine sulfoxide reductases in redox homeostasis and signaling. *Antioxidants (Basel)* 7(9), 114.

<https://doi.org/10.3390/antiox7090114>.

Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., Roby, D., Raffaele, S., 2014. Resistance to phytopathogens *e tutti quanti*: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Mol. Plant Pathol.* 15(5), 427–432. <https://doi.org/10.1111/mpp.12138>.

Santiago, T.R., Lopes, C.A., Caetano-Anollés, G., Mizubuti, E.S.G., 2017. Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. *Plant Pathol.* 66(3), 383–392. <https://doi.org/10.1111/ppa.12586>.

Silva, J.R., 2014. Diversidade de isolados de *Ralstonia solanacearum* das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 48 p.

Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2016. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Front. Plant Sci.* 6, 1143. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>.

Szklarczyk, D., Gable, A.L., Nastou, K.C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N.T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2021. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* 49(D1), D605–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

- Toukam, G.M.S., Cellier, G., Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C., Prior, P., 2009. Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. *Plant Dis.* 93, 1123-1130. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1123>.
- Tu, B.P., Ho-Schleyer, S.C., Travers, K.J., Weissman, J.S., 2000. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 290(5496), 1571–1574. <https://doi.org/10.1126/science.290.5496.1571>.
- Wang, C., Han, J., Liu, C., Kibet, K.N., Kayesh, E., Shangguan, L., Li, X., Fang, J., 2012. Identification of microRNAs from Amur grape (*Vitis amurensis* Rupr.) by deep sequencing and analysis of microRNA variations with bioinformatics. *BMC Genomics* 13, 122. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-122>.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M., Cresti, M., 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* 27(13), 2782–2786. <https://doi.org/10.1002/elps.200500722>.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., Prior, P., 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(21), 6790–6801. <https://doi.org/10.1128/AEM.00841-07>.
- Wójcik-Jagla, M., Daszkowska-Golec, A., Fiust, A., Kopeć, P., Rapacz, M., 2021. Identification of the genetic basis of response to de-acclimation in winter barley. *Int. J. Mol. Sci.* 22(3), 1057. <https://doi.org/10.3390/ijms22031057>.
- Wu, L., Chen, H., Curtis, C., Fu, Z.Q., 2014. Go in for the kill: how plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence* 5(7), 710–721. <https://doi.org/10.4161/viru.29755>.
- Yuliar, Nion, Y.A., Toyota, K., 2015. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes Environ.* 30(1), 1-11. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14144>.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

Zareie, R., Melanson, D.L., Murphy, P.J., 2002. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15(10), 1031–1039.
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.10.1031>.

Zeilinger, S., Gupta, V.K., Dahms, T.E.S., Silva, R.N., Singh, H.B., Upadhyay, R.S., Gomes, E.V., Tsui, C.K.-M., Nayak, S.C., 2016. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 40(2), 182–207.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuv045>.

Zipfel, C., 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35(7), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>.

Zohoungbogbo, H., Quenum, A., Honfoga, J., Chen, J.-R., Achigan-Dako, E., Kenyon, L., Hanson, P., 2021. Evaluation of resistance sources of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to phylotype I strains of *Ralstonia solanacearum* species complex in Benin. *Agronomy* 11(8), 1513. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081513>.

ARAÚJO, B. G. P. Prospecção de biomarcadores moleculares de resistência de tomateiro à murcha bacteriana causada pela *Ralstonia pseudosolanacearum*

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise proteômica comparativa de duas cultivares de tomate resistentes (Hawaii 7996 e Yoshimatsu) e uma cultivar susceptível Caline IPA-7 à *R. pseudosolanacearum*, revelaram proteínas diferencialmente acumuladas e exclusivas, diretamente ligadas ao mecanismo de defesa e potenciais marcadores funcionais de resistência. São elas: as proteínas relacionadas a patogênese PR1, PR5, PR10 e PR14, as Anexinas que são proteínas relacionadas ao mecanismo antioxidante e a pectinesterase e xiloglucana endotransglicosilase (XET), relacionadas à parede celular.

O acúmulo delas no tomateiro sob estresse, amplia o entendimento para diferentes estratégias de resistência ao patógeno, podendo contribuir de forma significativa nos programas de melhoramento genético do tomateiro em um processo de seleção assistida de genótipos resistentes à murcha bacteriana.

O presente estudo representa uma primeira investigação proteômica de folhas das cultivares Caline IPA-7 e Yoshimatsu, em resposta à *R. pseudosolanacearum*.