

MARIA CAROLINA A. N. GAVIOLI

Proteômica e histopatologia associadas aos mecanismos de infecção e defesa da videira (*Vitis sp*) ao patógeno *Plasmopara viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & de Toni.

Tese apresentada ao Programa de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de Doutora em Ciências, Área de Concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Nascimento-Gavioli, Maria Carolina A.

Proteômica e histopatologia associadas aos mecanismos de infecção e defesa da videira (*Vitis* sp) ao patógeno *Plasmopara viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & de Toni. / Maria Carolina A. Nascimento-Gavioli ; orientador, Miguel Pedro Guerra ; coorientador, Leocir José Welter. - Florianópolis, SC, 2014.

135 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. *Vitis* sp. 3. *Plasmopara viticola*. 4. proteômica. 5. resistência. I. Guerra, Miguel Pedro. II. Welter, Leocir José. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus filhos Lucas e Vinicius, que muito me ensinam sobre amor incondicional.

“The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery every day. Never lose a holy curiosity.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Olavo, por todo amor, carinho, apoio, incentivo e principalmente pela compreensão durante este período das nossas vidas.

Aos meus pais Nelio e Jane pelo amor e apoio. Aos meus irmãos, cunhados e cunhadas, e todos os sobrinhos e sobrinhas por tantas alegrias.

Ao meu orientador Prof. Miguel P. Guerra por todos os ensinamentos, oportunidades, momentos de compreensão e principalmente por ter acreditado no meu trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Leocir José Welter pela contribuição, linha de pesquisa e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos demais professores que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial Prof. Aparecido Lima da Silva (UFSC) e ao prof. Rubéns Onofre Nodari por me ajudarem quando precisei.

A Sarah pelas contribuições importantíssimas e pela amizade. Aos demais colegas que compartilharam comigo esta jornada, em especial à Gabriela, Denise, Vinicius, Gustavo, Daniela, Rafael e demais colegas do LFDGV.

Aos professores que gentilmente aceitaram fazer parte da banca de avaliação deste trabalho. Aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pelos ensinamentos compartilhados.

Ao laboratório central de microscopia eletrônica desta universidade (LCME) e a Genøk, Center for Biosafety pelas análises realizadas. Aos funcionários da universidade, em especial a Bernadete (CCA/ Fitotecnia).

A CAPES pelo apoio financeiro e a todos os demais que de alguma forma contribuíram para a minha formação e a realização deste trabalho, recebam a minha gratidão!

Resumo: O cultivo de espécies frutíferas no Brasil encontra na incidência de pragas e doenças suas principais limitações. Uma estratégia adequada para o controle das moléstias é o uso dos mecanismos de defesas natos das plantas. Para isto as plantas apresentam um sistema de resposta basal associado a um sistema de defesa específica para cada tipo de patógeno, o que gera respostas sistêmicas e duradouras, como transdução de sinais e transcrição dos genes de defesa. As proteínas relacionadas a patogênese (PR) bem como os fitohormônios, importantes na sinalização, são alvos importantes de estudos relacionados à resistência contra patógenos. Dentre as doenças de grande impacto em culturas com relevância econômica está o míldio da videira (*Plasmopara viticola*). A videira (*Vitis vinifera*) além da sua importância econômica é a primeira espécie frutífera cujo genoma foi sequenciado, tornando-se assim um ótimo modelo de estudo. Análises proteômicas possibilitam avanços significativos no conhecimento dos mecanismos moleculares de resistência a patógenos e a associação de diferentes técnicas relacionadas a proteômica para estudar as diversas partes do mecanismo de resistência na planta pode auxiliar no entendimento da relação planta-patógeno. Assim, o presente estudo tem como objetivo contribuir para o esclarecimento dos mecanismos moleculares e bioquímicos associados à resistência à doença causada por *Plasmopara viticola* em videira (*Vitis sp.*). Os estudos histológicos tiveram como objetivo caracterizar o desenvolvimento do *P. viticola*, bem como determinar diferenças estruturais nas variedades escolhidas para o estudo: uma resistente (Bordô) e outra susceptível (Cabernet Sauvignon). Nessas avaliações histológicas foram observadas diferenças estruturais e bioquímicas entre as duas variedades como presença de pêlos e mesofilo mais compactos na var. resistente. Já para o desenvolvimento do patógeno constatou-se a dificuldade dos esporos na penetração dos tubos germinativos através dos estômatos também na variedade resistente. Para as análises da expressão proteica foi utilizado uma combinação de eletroforese bidimensional (2-DE) associado ao nanoLC- MS/MS. Foram observadas diferenças proteicas quantitativas e qualitativas nos diferentes tempos após a inoculação. Foram identificadas 44 proteínas exclusivas, sendo 33 da var. resistente e 10 da var. susceptível. A ativação da resposta de defesa foi observada somente na var. Bordô com aumento constante na expressão das proteínas no decorrer dos tempos analisados, principalmente as 96 hpi (horas após a infecção). As análises do proteoma das linhagens de videira contendo o locus de resistência Rpv1 e Rpv3 também estudadas nesse projeto apresentaram resultados semelhantes os da var. Bordô. Nessas análises foram identificados 41 proteínas. As proteínas foram classificadas em diferentes categorias funcionais: metabolismo energético, metabolismo de proteínas, resposta ao estresse e resposta de resistência. Proteínas relacionadas à resistência estavam presentes apenas as 96 hpi. A ativação de uma reação de defesa, com um aumento da expressão das proteínas foi observada mais frequentemente em 48 hpi, o que é consistente com o estabelecimento da interação incompatível para *P. viticola*.

Palavras-chave- Interação planta-patógeno, proteômica, análises histológicas, Bordô, Cabernet Sauvignon e *Plasmopara viticola*.

Abstract: Cultivation of fruit species in Brazil has its limitations due to the incidence of pests and diseases. An adequate strategy for disease control is the use of a basal response system intrinsic to the plant. For that, plants show a basal response system associated with a specific defense system for each type of pathogen, which creates lasting and systemic responses, such as signal transduction and transcription of defense genes. Pathogenesis-related proteins (PR), as well as phytohormones (important for signaling), are important targets for studies related to resistance against pathogens. The Grapevine Powdery Mildew (*Plasmopara viticola*) is among the diseases of great impact in economically relevant cultures. Grapevine (*Vitis vinifera*), besides its economic importance, is the first fruit species whose genome was sequenced, becoming a great model of study. Proteomic analyzes enable significant advances in knowledge of molecular mechanism on pathogen resistance and the association of different techniques to study different parts of resistance mechanisms in plants can help to understand the plant-pathogen relation. Therefore, this study aimed to contribute to the elucidation of the molecular and biochemical mechanisms associated to disease resistance caused by *Plasmopara viticola* in Grapevine (*Vitis* sp.). Histological studies aimed to characterize the development of *P. viticola*, as well as to determine structural differences in the chosen varieties for the study: a resistant one (Bordo) and susceptible one (Cabernet Sauvignon). Structural and biochemical differences were observed between the varieties on the histological analyzes, such as presence of leaf hair and more compact mesophyll on the resistant variety. For the pathogen development it was found a difficulty for the spores to penetrate the germ tubes through stomata for the resistant variety. The combination of bidimensional electrophoresis (2-DE) associated with nanoLC - MS/MS was used for the protein expression analyzes. Quantitative and qualitative differences were found in the protein analyzes for different hour after infection. 44 exclusive proteins were found, 34 for the resistant variety and 10 for the susceptible variety. The activation of defense response was observed only in the Bordo variety with a constant increase on protein expression over time, mainly at 96 hours after infection. Proteomic analyzes of Grapevine lines containing Rpv1 and Rpv3 resistant locus, also studied in this project, showed similar results to the Bordo variety, where 41 proteins were identified. The proteins were classified in different functional categories: energetic metabolism, protein metabolism, stress response and resistance response. Proteins related to resistance were present only at 96 hours after infection. The activation of a defense reaction with an increase of protein expression was observed most often at 48 hours after infection, which is consistent with the establishment of incompatible interaction for *P. viticola*.

Key words: Plant-pathogen interaction, proteomic, histological analyzes, Bordo, Cabernet Sauvignon and *Plasmopara viticola*.

LISTA DE TABELAS

Capítulo III

- Tabela 1.** Proteínas totais e spots detectados nas diferentes amostras analisadas de folhas de videira das var. Cabernet Sauvignon (CS) e Bordô, associadas ao desvio padrão (DP) em quatro replicatas biológicas.....83
- Tabela 2.** Proteínas exclusivas as 24, 48 e 96 horas após a infecção (HAI) das variedades de videira resistente (Bordô) e suscetível Cabernet Sauvignon (CS), infectadas com *P. viticola* e identificadas por análise de 2-DE/MSMS. As proteínas foram classificadas em categorias funcionais com base no banco de dados Gene Ontology. Categorias adicionais foram incluídas quando necessário. A tabela também informa o número match (ID), número de acesso e nome da proteína, juntamente com o número de peptídeos identificados, pontuação no Mascote e ponto isoelétrico e massa molecular experimental e teórico.....85

Capítulo IV

- Table 1.** Total protein content and number of detected spots on control and infected grapevine breeding lines resistant to *Plasmopara viticola*.....123
- Table 2.** Exclusive proteins, at 24, 48, and 96 hpi in grapevine breeding lines resistant infected with *P. viticola*, and identified by 2-DE/MS analysis. Proteins were included in the list when they showed a fold in infected vs. mock-inoculated control samples, with a p value < 0.05 (Student's t-test). Proteins were classified in functional categories based on the KEGG PATHWAY Database. Additional categories are included when necessary. The Table also reports spot number (Spot no.), accession number and protein name, together with number of identified peptides, Mascot score, experimental and theoretical Mr and pI.....123
- Table 3.** RT-PCR expression analysis of nine selected grapevine genes and comparison with levels of differential protein expression. Modulations are reported as the fold change in infected vs. control samples.....124

Supplemental Material

- Table S1.** Grapevine breeding lines resistant showing two resistance genes (RPV-4 and Rpv1). The markers are on chromosome 18 and 12 for downy mildew resistance. Chromosome 18 has two resistance alleles in heterozygosity and the markers are GF18 and GF18-06-08. The chromosome 12 alleles are heterozygotes and markers are Sc34_8 and Sc35_2.....127
- Table S2.** Primers used for RT-PCR.....140

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figure 1. Análise histológica da colonização do patógeno *P. viticola* e do mecanismo de defesa da videira em tecido foliar da var. resistente (Bordô) e suscetível (var. Cabernet Sauvignon). Foram realizadas secções transversais coradas com azul de toluidina em diferentes horas após a inoculação (hai). A- Secção transversal da var. Cabernet Sauvignon antes da inoculação do patógeno, com presença de idioblastos (seta); B- Secção transversal da var. Bordô antes da inoculação do patógeno; C- Secção da var. Cabernet Sauvignon 48 hai com a presença de hifas nos espaços intercelulares esses com membranas bem delimitadas e núcleos; D- Secções da var. Bordô 48 hai evidenciando células compactas no mesófilo e presença de hifas degradadas (seta); E- Secção da var. Cabernet Sauvignon 72 hai com grande parte do mesófilo ocupado pelo patógeno, .F- Secção da var. Bordô 72 hai com ausência de hifas do patógeno; G- Secção da var. Cabernet Sauvignon 96 hai com emissão do esporângioforos através dos estômatos e evidencia de haustório nas células do hospedeiro (cabeça seta); H- Secção da var. Bordô 96 hai mostrando compactação das células do mesófilo e presença de grânulos de cloroplastos e amido nas células do Pp e Pl (seta); I - Secção da var. Cabernet Sauvignon 120 hai com ruptura da parede celular e desorganização celular.; J-Secção da var. Bordô evidenciando a manutenção da estrutura celular após a infecção com o patógeno; K- Secção transversal da var. Cabernet Sauvignon evidenciando a incapacidade das hifas de transpor as nervuras se limitando ao espaço delimitado pelo esclerênquima. Barra-100µm. Eps- epiderme superior; Epi-epiderme inferior;Pp-parenquima paliçádico; Pl- parênquima lacunoso; Id- idioblastos; H-hifas; Es- estômatos; CE- cavidade estomática;Fv- feixe vascular; H- hifas e Pe- fenóis.....55

Figure 2 .Características diferenciais, morfológicas e de comportamento de duas variedades de videira: Cabernet Sauvignon (suscetível) e Bordô (resistente) infectadas com *P. viticola* em diferentes horas após a inoculação (hai) por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A- Discos foliares da var. Cabernet Sauvignon com esporulação na face abaxial (96hai), B- Discos foliares da var. Bordô com pontos de necrose na face abaxial de disco foliar (96hai), C- Superfície da epiderme abaxial da var. Cabernet Sauvignon, D- Superfície abaxial da var. Bordô mostrando grande quantidade de pêlos e presença de esporos com emissão de hifas na superfície do pêlos, E- Estômato característico presente na superfície abaxial da var. Cabernet Sauvignon, F- Estômato característico da var. Bordô,G- Germinação e penetração dos tubos germinativos de *P. viticola* na var. suscetível, H- Germinação dos tubos germinativos longe dos estômatos evidenciando falta de eficiência na orientação e penetração pelos estômatos na var. resistente.....58

Figura 3. Análise em MEV de discos foliares de videira da var. suscetível Cabernet Sauvignon infectados com *P. viticola*; A- Presença de esporângios e zoósporos na superfície da folha; B- Germinação dos esporos encistados 12 horas após a infecção (hai); C- Germinação de esporos 24 hai com presença de esporângios maduros; D- Esporângioforos emergindo através dos estômatos, mas sem esporângios ou com esporângios ainda em formação com 72 hai; E- Esporângioforos com esporângios totalmente desenvolvidos com 96 hai, F- Esporulação de *P. viticola* na superfície inferior da folha ao longo da nervura principal 120 hai.....59

Capítulo III

- Figura 1.** Teores de proteínas totais obtidos a partir de extração fenólica de amostras foliares das variedades de videira Cabernet Sauvignon e Bordô submetidas à inoculação com *Plasmopara viticola* e controle (sem inoculação). Avaliações foram realizadas 24, 48 e 96 horas após a inoculação do patógeno (hai).....89
- Figure 2.** - Análise dos componentes principais (PCA) de videiras, var. resistente (Bordô) e suscetível (Cabernet Sauvignon), submetidas ao *P. viticola* as 24, 48 e 96 horas após a infecção.(hai). Os componentes principais PC1, PC2 e PC3 foram 10,8%, 10,5% e 10%, respectivamente. O gráfico de dispersão PCA agrupou os 48 mapas individuais distintamente. As plantas da var. suscetível Cabernet Sauvignon, tanto no controle, quanto inoculadas com *P. viticola*, ficaram agrupadas (1). A principal variação foi a separação da variedade resistente Bordô (96 hai) (2) dos demais tratamentos.....90
- Figura 3.** Géis 2-D de proteínas extraídas de folhas da videira var. Bordô, infectadas ou não com *Plasmopara viticola* e coletadas nos tempos 24, 48 e 96 horas após a infecção (HAI). Proteínas foram focalizadas em strips IPG com pH 3-10 (13 cm) e separadas por SDS-PAGE (12%). Géis foram corados com comassie.....91
- Figura 4.** Geis 2-D de proteínas extraídas de folhas da videira var. Cabernet Sauvignon, infectadas ou não com *Plasmopara viticola* e coletadas nos tempos 24, 48 e 96 horas após a infecção (HAI). Proteínas foram focalizadas em strips IPG com pH 3-10 (13 cm) e separadas por SDS-PAGE (12%). Géis foram corados com comassie Blue.....92
- Figura 5.** Teores de proteínas totais obtidos a partir de extração fenólica de amostras foliares de videira var. Cabernet Sauvignon e Bordô, submetidas à inoculação com *Plasmopara viticola*. Avaliações foram realizadas no momento da inoculação 24, 48 e 96 horas após a inoculação do patógeno (hai).....93
- Figure 6.** Distribuição de proteínas moduladas de videiras identificadas de acordo com as funções biológica usando GO (Gene Ontology). Quando nenhuma anotação GO (Gene Ontology) estava disponível, as proteínas foram anotadas manualmente com base na literatura. Resultados das proteínas para amostras infectadas das variedades suscetíveis e resistentes foram apresentados em gráficos separados, figura 6A e 6B, respectivamente.....94

Capítulo IV

- Figure 1.** Principal component analysis (PCA). The principal components PC1 and PC2 were 26.6% and 17.6% respectively. The PCA scatterplot distinctly clustered the 24 individual maps. All observations were clustered into three experimental conditions corresponding to the three time-point sample collection (24, 48 and 96 hpi) but control plants clustered all together with time-point 24 hpi of infected plants. ‘Hpi’ means hours post-inoculation; circles, squares and triangles indicate samples at 24, 48 and 96 hpi respectively, filled and white symbols indicate infected and control samples.....120
- Figure 2.** Representative two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) maps of the proteome of control and infected grapevine breeding lines with *Plasmopara viticola* collected at time 24 hpi (Figure 2a control and 2b infected), 48 hpi (Figure 2c control and 2d infected) and 96 hpi (Figure 2e control and 2f infected). Linear isoelectric focusing pH 3–10 for the first dimension and 12% SDS–PAGE gels in the second dimension were used. Molecular masses ranging from 10 to 250 kDa are given on the left side. Gels were stained with Coomassie Blue. The arrows point to differentially expressed

protein spots selected for mass spectrometry identification. ID of identified proteins from Table 2 are indicated in boxes.....121

Figure 3. Distribution of modulated proteins of grapevines with positive identifications according to biological functions assigned using the GO (Gene Ontology) annotation. When no GO (Gene Ontology) annotation was available, proteins were annotated manually based on literature. Protein results for infected and control samples are presented in separated graphics, Figure 3a and 3b respectively.....122

LISTA DE ABREVIATURAS

2-DE- Eletroforese bidimensional
2D-PAGE *Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
APX- Ascorbato peroxidase
AS- Ácido jasmônico
ATP- Adenosina trifosfato
Avr- Avirulência
C. V.- Coeficiente de variação
CHAPS-3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate
DNA- *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)
DTT- *1,4-dithio-DL-threitol*
EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético) em SDS
ET- Etileno
GL- Gay Lussac
GO- Gene ontology
GTS Glutathione S- transferase
Hai- Horas após a infecção
HR- Resposta de hipersensibilidade
IEF- Focalização isoeletrica
IPG- *Immobilized pH gradients* (tiras de gradients de pH imobilizado)
JÁ- Ácido salicílico
kDa: kilodalton
M- Molar
m/z- Razão entre massa e carga
mA: Milliampere
MET- Microscopia eletrônica de transmissão
MEV- Microscopia eletrônica de varredura
Min- Minuto
mL- Mililitros
mM- Milimolar
MM- Massa molecular
MS- *Mass Spectrometry* / Espectrometria de Massas
NADPH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P reduzido
nanoLC-ESI-MS/MS- Eletroforese Bidimensional em Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida eletrospray e espectrometria de massas
NO- Oxido nítrico
PCA- Análise componentes principais
QTLs-*Quantitative trait locus*
Rt- PCR-*Reverse transcription Polymerase Chain Reaction*
pI- Ponto isoeletrico
PMSF- Phenylmethanesulfonyl fluoride
PR- Proteínas relacionadas a patogênese
RGA – Resistance gene analog
RNA- *Ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)
ROS- Espécie reativas a oxigênio
SAR- *Systemic Acquired Resistance* (Resistência Sistêmica Adquirida)
SDS- *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE *SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
g- Gramas
SOD- Superóxido dismutase

TEMED- *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine

Tris- Tris-[hidroximetil] aminometano

UR- Umidade relativa

Vh- Volts hora

µg- Microgramas

µL-Microlitros

µm-Micrômetro

Sumário

Capítulo I.....	21
Estado da Arte.....	21
1.Introdução.....	23
2.Objetivo Geral.....	25
2.1.Objetivos Específicos.....	25
3. Revisão Bibliográfica.....	26
3.1. Videira.....	26
3.2. Míldio (<i>Plasmopara viticola</i> (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & de Toni).....	28
3.3. Mecanismos de resistência na interação planta-patógeno.....	30
3.4. Proteômica.....	32
3.4.1. Proteômica em interações entre plantas-microorganismos.....	34
4. Referências Bibliográficas.....	36
Capitulo II.....	45
Resumo.....	47
1. Introdução.....	51
2. Material e métodos.....	53
2.1.Material vegetal e isolamento do patógeno.....	53
2.2.Inoculação do patógeno.....	53
2.3.Análises Microscópicas.....	53
3.Resultados.....	54
3.1. Histologia das var. Cabernet Sauvignon e Bordô.....	54
3.2. Sintomatologia e caracterização do desenvolvimento de <i>P. viticola</i>	56
4.Discussão.....	60
5. Referências Bibliográficas.....	63
Capitulo III-.....	65
Resumo.....	67
1. Introdução.....	73
2. Material e métodos.....	75
2.1.Material vegetal e isolamento do patógeno.....	75
2.2.Inoculação do patógeno.....	75
2.3.Extração e solubilização das proteínas.....	75
2.4.2D-PAGE da proteína total extraída.....	76
2.5. Sequenciamento dos peptídeos por nanoHPLC-ESI-MS/MS.....	77
2.6.Análises estatísticas.....	77
3. Resultados.....	79
4. Discussão.....	81
5.Conclusão.....	83
6.Referências Bibliográficas.....	95
Capitulo IV.....	99
1.Introduction.....	107
2.Material and methods.....	108
2.1.Plant material.....	108
2.2.Inoculum and pathogen infection.....	108
2.3.Protein extraction and solubilization.....	108
2.4.Two-dimensional IEF/SDS–PAGE and protein staining.....	108
2.5.Differential quantitative analysis of infected grapevines.....	109
2.6.Peptide sequencing by nanoHPLC-ESI-MS/MS.....	109
2.7.Real-time qRT-PCR.....	110
2.8.Statistical analysis.....	110

3.Results and Discussion	112
3.1.Proteomic profiling changes in infected versus control grapevine leaves	112
3.2.Confirmatory data on biologically important differences in protein expression	113
3.3.Proteins related to the energy metabolism.....	114
3.4.Resistance and stress-related proteins	115
3.5.Protein metabolism.....	116
3.6.Transport-related proteins	116
3.7.Overall defense response in <i>Rpv2</i> and <i>Rpv3</i> -dependent resistance to grapevine downy mildew	117
4.Conclusions.....	119
5.References.....	129
Considerações finais e perspectivas futuras.....	135

Capítulo I

Estado da Arte

1. Introdução

Desde os primórdios da agricultura as doenças vêm desafiando o cultivo de plantas de interesse agrônomo. A uniformização dos cultivos, associada à expansão das áreas cultivadas favoreceu o desenvolvimento de epidemias. Hoje as mesmas, em geral, são combatidas com a aplicação massiva de produtos químicos sintéticos, aumentando assim os custos de produção, a demanda energética e a agressão à saúde ambiental e humana.

Para espécies frutíferas no Brasil as doenças continuam sendo um dos principais fatores limitantes para o cultivo. Uma das estratégias mais adequadas no controle dessas doenças reside no uso dos mecanismos de defesas natos das plantas. Para isso estudos relacionados à biologia celular e molecular, sinalização de resistência, processos bioquímicos e fisiologia planta-hospedeiro, necessitam ser aprofundados.

Pertencente à família *Vitaceae*, a videira, acompanhou o nascimento da civilização humana e se diversificou por meio de mutações somáticas ou por cruzamentos adquirindo assim múltiplas formas e variações, estimando-se que hoje, *Vitis vinifera L.*, possua aproximadamente 10 mil variedades (SOUZA & MARTINS, 2002).

Por sua importância, a videira foi a primeira espécie frutífera cujo genoma foi sequenciado (Jaillon et al., 2007; Velasco et al., 2007) e assim se configura como um modelo biológico relevante para espécies frutíferas no que tange os estudos de biologia molecular.

No cenário internacional a vitivinicultura brasileira ocupou em 2007, o 17º lugar em área cultivada com uvas e o 19º em produção, segundo dados da FAO. No que se refere às transações internacionais, dados da mesma fonte revelam que o Brasil foi o 11º colocado em quantidade de uvas exportadas, o 7º em valor das exportações de uvas e o 10º maior exportador de suco de uvas, em quantidade e em valor. Atualmente o Brasil produz cerca de 709.623.689Kg de uvas sendo que 82.673.731Kg corresponde a uvas viníferas e 626.949.958Kg a uvas comuns (UVIBRA, 2012)

Como mencionado, a videira apresenta inúmeros problemas fitossanitários por ser sensível a um amplo espectro de patógenos. O míldio causado por *Plasmopora viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & Toni, é uma doença importante em muitas áreas vitícolas do mundo. Seu agente causal é um parasita obrigatório que para se desenvolver, necessita de material vivo do hospedeiro. Em condições climáticas favoráveis e quando medidas de controle não são aplicadas, o míldio pode destruir até 75% da produção e, assim, seu controle requer frequentes aplicações de fungicidas para evitar perdas significativas da cultura (AMORIM & KUNIYUKI, 2005). Diante das mudanças climáticas atuais, o aumento das temperaturas e das chuvas tornaram o ambiente mais propício ao desenvolvimento desta doença. Contudo, a crescente preocupação com o impacto dos pesticidas sobre o meio ambiente está motivando a investigação de estratégias alternativas do controle de doenças da videira, incluindo a ativação de defesa nata da planta.

Com o advento das modernas biotecnologias, proteômica, avanços significativos foram alcançados em termos da interação patógeno/hospedeiro. Estes estudos permitiram desvendar diversos mecanismos moleculares envolvidos no sistema de defesa de plantas ao ataque de patógenos, levando a identificação de fitohormônios sinalizadores e genes envolvidos neste processo (UKNES et al., 1993; RYALS et al., 1994). Diante disso, conhecer os mecanismos moleculares envolvidos no sistema de defesa contra doenças é primordial para o desenvolvimento de novas estratégias biotecnológicas de controle de doenças.

Os recentes avanços nas pesquisas mostraram que as plantas são capazes de induzir diferentemente amplos espectros de mecanismos de defesa, dependendo do tipo invasor encontrado. Os salicilatos (AS) e os jasmonatos (JA) são compostos importantes na complexa rede de sinalização e estão envolvidos em uma reação de defesa refinada (PIETERSE & VAN LOON, 1999; PIETERSE et al., 2001), onde induzem a produção de compostos

antimicrobianos, como fitoalexinas e as proteínas relacionadas à patogênese (PRs) (UKNES et al., 1993; RYALS et al., 1994, 1996; STICHER et al., 1997).

As proteínas relacionadas à patogênese (PR) representam uma porção importante no mecanismo de resistência das plantas e das alterações decorrentes da interação planta-patógeno. Sabe-se que estudos de proteômica durante interações planta-patógeno são relevantes já que a maioria das vias usadas tanto por plantas quanto por patógenos dependem da síntese e atividade de proteínas. A indução de PR foi descrita em muitas espécies vegetais sob infecção de fungos, bactérias, vírus ou pelo ataque de insetos. Elas ocorrem através de elicitores produzidos pelo patógeno no momento do estabelecimento do contato com a planta. Originalmente, as PR foram classificadas com base nas suas características de proteínas vegetais induzidas ou relacionadas com situações patológicas. No entanto, observações posteriores indicaram a presença de PR em plantas na ausência de patógenos. Dessa forma, o termo “proteínas relacionadas à patogênese” tornou-se mais abrangente, incluindo as proteínas induzidas por micróbios ou pelo ataque de insetos e seus homólogos presentes nos processos de desenvolvimento de tecidos e órgãos ou em situações de estresse em geral (VAN LOON E VAN STRIEN, 1999; PRZYMUSINSKI *et al.*, 2004; VAN LOON *et al.*, 2006).

Nas videiras ainda pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares de defesa contra doenças. Estudos genéticos permitiram a localização de fatores de resistência (QTLs) associados a algumas doenças, tais como o oídio e o míldio (WELTER et al., 2007). Genes candidatos análogos a genes de resistência, (RGA – resistance gene analog) co-localizados com os fatores de resistência foram identificados, sendo que estes poderão agora ser utilizados para auxiliar no isolamento dos genes de resistência correspondentes (WELTER et al., 2008a). Marcadores moleculares associados aos genes de resistência contra o míldio e oídio foram testados com sucesso quanto ao seu potencial uso para a seleção indireta de plantas resistentes e a sequência completa de uma família de genes CC-NBS-LRR, candidatos à resistência contra o míldio, foi isolada a partir uma variedade resistente de videira (WELTER et al., 2008b). Estes genes apresentam elevada similaridade com genes de resistência isolados de outras plantas. No entanto, o envolvimento destes genes com a resistência contra o míldio não foi ainda experimentalmente confirmada.

Assim o presente estudo tem como objetivo melhor compreender as proteínas expressas relacionadas à patogênese envolvidas na resistência das plantas aos patógenos. No escopo do trabalho, busca-se a comparação entre cultivares de videira resistente e suscetível ao patógeno *Plasmopora viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & de Toni, bem como estudos em híbridos interespecíficos de videiras contendo quatro alelos de resistência piramidados para infecção com *P.viticola*. Análises histopatológicas bem como microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas para um melhor entendimento da relação planta-hospedeiro. Estudos proteômicos e análises bioquímicas permitiram um avanço no conhecimento dos mecanismos moleculares de resistência ao patógeno.

2. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo principal contribuir para o esclarecimento dos mecanismos moleculares, histológicos e estruturais associados à resistência à doença causada por *Plasmopara viticola* em videira (*Vitis ssp*)

2.1. Objetivos Específicos

1. Caracterizar e comparar as diferenças histológicas e estruturais do desenvolvimento de *Plasmopara viticola* entre as variedades Cabernet Sauvignon (suscetível) e Bordô (resistente);
2. Caracterizar e comparar o processo de infecção do *Plasmopara viticola* na var. Cabernet Sauvignon (suscetível) e na var. Bordo (resistente) por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica;
3. Identificar as proteínas exclusivas e diferencialmente expressas em plantas da var. Cabernet Sauvignon (suscetível) e da var. Bordo (resistente) em resposta ao patógeno *P. viticola*, visando determinar diferenças no perfil protéico entre uma variedade resistente e uma suscetível e que estejam envolvidas no sistema de defesa desta interação planta-patógeno.
4. Identificar as proteínas exclusivas e diferencialmente expressas em híbridos interespecíficos de videira resistentes ao *P. viticola*, visando relaciona-las com o sistema de defesa desta planta;

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Videira

A videira pertence à família *Vitaceae* e sua domesticação ocorreu no Oriente, mais precisamente na Região do Cáucaso, entre o Mar Negro e o Mar Cáspio, a partir da espécie selvagem *Vitis vinifera caucasica* (SOUZA, 1996).

Dentre os 19 gêneros pertencentes a esta família, o *Vitis* é o que apresenta importância econômica, social e histórica, compreendendo todas as videiras de produção comercial. O gênero *Vitis* possui 108 espécies, sendo a *Vitis vinifera* L., a espécie que apresenta maior importância e cultivo mais antigo, com relatos de mais de 3.000 anos a.C. (SOUZA & MARTINS, 2002). Esta espécie também é conhecida como “videira européia”, diferindo das “videiras americanas” asiáticas produtoras de uvas, pertencentes principalmente à espécie *Vitis labrusca* L. (SOUZA, 1996).

Por ser uma planta que acompanhou a civilização humana, a videira foi se diversificando através de mutações somáticas ou por cruzamentos, adquirindo múltiplas formas e variações (SOUZA, 1996). Atualmente, estima-se que a *Vitis vinifera* L., possua aproximadamente 10 mil variedades (SOUZA & MARTINS, 2002).

A videira apresenta porte arbustivo e sarmentoso, necessitando de um tutor para sua sustentação. O intervalo de tempo entre o início da brotação e a queda das folhas define o ciclo vegetativo da videira. O tempo que as plantas permanecem sem atividade metabólica ou sem crescimento visível define o período de repouso vegetativo ou estágio de dormência (LANG, 1987).

Os cachos e as bagas têm formas e dimensões diferenciadas, de acordo com as variedades, apresentando variação na coloração da casca, consistência, sabor e aroma (SOUZA, 1996).

Essa espécie é cultivada em quase todas as partes do mundo e se adapta em uma diversidade de condições climáticas, sendo uma alternativa para o cultivo em regiões que apresentam condições climáticas extremas, onde o relevo é acidentado e onde os demais cultivos tornam-se menos viáveis.

No Brasil, os investimentos em viticultura vêm aumentando e seu cultivo vem avançando para regiões não tradicionais de cultivo. Os principais estados produtores são Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco, Bahia, Paraná, Santa Catarina e Minas Gerais (EPAGRI, 2005). Sua cadeia produtiva representa uma parcela econômica e social importante na fruticultura do país movimentando cerca de R\$ 2,5 bilhões/ano. Enquanto nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, a maior parte da colheita é destinada à produção de vinho, suco e derivados, nas regiões Sudeste, Nordeste e no Paraná, a viticultura ainda é predominantemente voltada às cultivares de uva de mesa, fina e rústica, para consumo *in natura* (EMBRAPA, 2011).

Em Santa Catarina, o cultivo data da chegada dos portugueses, porém o maior impulso ocorreu com a vinda dos imigrantes italianos. Nos últimos anos, em função dos bons preços para uva e seus derivados, principalmente para as cultivares viníferas, novos plantios estão ocorrendo em todas as regiões, inclusive em áreas não tradicionais para o cultivo, tais como as regiões de altitudes elevadas. Aliado a isso, os resultados de pesquisa solucionaram vários problemas limitantes ao cultivo e colaboraram com a melhoria da viticultura ao oferecer maior segurança, especialmente, na vida útil de novos vinhedos (EPAGRI, 2005)

A variedade de videira Carbenet Sauvignon, originária de Bordeaux, França, é descrita como “a mais renomada variedade de uva na produção de vinhos finos” e é progênie do cruzamento de duas outras variedades de Bordeaux, a Cabernet Franc e a Sauvignon Blanc (BOWERS & MEREDITH, 1997).

Esta variedade apresenta brotação e maturação tardias, sendo relativamente vigorosa, com ramos novos e porte ereto, de média produção e qualidade elevada para vinificação (RIZZON & MIELE, 2002). Foi introduzida no Brasil em 1921, mas somente da década de 80 seu plantio foi realizado no Rio Grande do Sul (BRASIL, 1996). Em Santa Catarina o plantio de uvas de *V. vinifera* vem se difundindo desde 2000, sendo a variedade Cabernet Sauvignon a mais cultivada.

De sabor herbáceo, destina-se à elaboração de vinho tinto de guarda, o qual requer amadurecimento e envelhecimento, ou de vinho para ser consumido jovem (RIZZON & MIELE, 2002). Apresenta os cachos cilíndricos e longos, pesando em média 130 a 170 g, sendo as bagas pequenas, esféricas e pretas (POMMER et al., 2003). Sua produtividade varia de 15 a 20 t ha⁻¹, com teores de açúcar entre 16 e 18 °Brix (GIOVANINNI, 2001).

Uma das principais dificuldades para seu cultivo são as doenças que reduzem a produtividade e causam a morte precoce das plantas. As principais regiões vitícolas do Sul e Sudeste do Brasil são caracterizadas por apresentarem umidade e temperaturas elevadas, aliadas a precipitações frequentes durante o ciclo vegetativo da videira. Essas condições impõem maiores dificuldades no cultivo, principalmente no que se refere à maior ocorrência de doenças, derivadas de fungos e oomicetos, da parte aérea e no controle das mesmas (SÔNEGO et al., 2005).

Em contraponto as variedades derivadas de *V. vinifera* encontram-se as variedades derivadas de *Vitis labrusca* que correspondem às cultivares americanas e seus híbridos. Essas representam mais de 85% do volume de uvas processadas no país (POMMER et al., 2003). No Brasil estas variedades se adaptaram melhor as condições de clima mais temperado, embora nos últimos anos seu cultivo em zonas tropicais do país tem sido alcançado com sucesso. Uma característica importante dessas variedades é a alta capacidade produtiva e a baixa susceptibilidade as principais doenças que atacam a videira. Dentre as variedades de *V. labrusca* as principais utilizadas para elaboração de sucos e vinhos de mesa são a Isabel, Bordô e Concord (CAMARGO & MAIA, 2011)

Originária dos EUA a var. Bordô, em meados de 1850 despertou interesse dos viticultores europeus devido à resistência ao oídio (*Uncinula necator*), doença que no período causava um enorme prejuízo à viticultura mundial (GRIGOLETTI & SÔNEGO, 1993). No Brasil foi introduzida no Rio Grande do Sul com o nome de Ives, obtida por Henry Ives. Sua expansão deu-se devido a fácil adaptação, a boa produtividade, longevidade e a relativa rusticidade, apresentando alta resistência às doenças fúngicas (ZANUZ, 1991; CAMARGO, 1994). Também chamada de Folha de Figo, é cultivada nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e na região de Caldas MG em área considerável. Os cachos são pequenos (150g), cilíndricos, as vezes alados e medianamente compactos. As bagas são pequenas (2 a 3 g), arredondadas, pretas, com polpa de textura fundente a média e sabor foxado (POMMER et al., 2003).

Na maioria dos países produtores de vinho, por ser considerada uma *Vitis labrusca* a var. Bordô não é cultivada e por isso a literatura mundial sobre essa cultivar e seus produtos é praticamente inexistente. No entanto, no Brasil, não há restrição quanto ao seu cultivo e mesmo assim trabalhos sobre o comportamento agrônomo e biológico dessa videira e sobre a composição físico-química da uva e do vinho são escassos (TECCHIO et al., 2007).

Outro grupo de videiras são aquelas obtidas por cruzamentos interespecíficos. Nos séculos 18 e 19 surgiram os trabalhos de hibridação controlada de *V. vinifera* com as espécies americanas. Estes híbridos eram plantados em pé-franco e foram criados para incorporar a resistência as doenças foliares das uvas americanas com as características dos frutos das videiras européias, o chamado “produtor direto” (POMMER, 2003). Assim o melhoramento genético de plantas com interesse agrônomo visa fundamentalmente obter cultivares capazes de reunir características associadas à resistência a fatores bióticos ou abióticos e as condições

de adaptação e elevada produtividade. No caso da videira, o melhoramento genético é voltado para o desenvolvimento de novas variedades de copa e de porta-enxerto (CAMARGO, 2000).

A realização da hibridação tem por finalidade combinar em um mesmo indivíduo dois ou mais fenótipos desejáveis e que se encontram em indivíduos diferentes. Por meio do cruzamento entre estes indivíduos, é gerada uma população com variabilidade genética. Posterior ao processo de hibridação, a seleção e a clonagem (propagação vegetativa) das melhores combinações, seguidas de avaliação clonal, podem resultar em novas cultivares (BOREM, 2001). O melhoramento da videira é baseado principalmente em hibridações controladas (BURGER; BOUQUET; STRIEM, 2009), sendo que os métodos mais utilizados são os cruzamentos biparentais e cruzamentos interespecíficos (LEAO; BORGES, 2009). Em fruteiras, uma das limitações deste procedimento, quando comparado às espécies anuais propagadas sexuadamente, são o número de combinações híbridas que podem ser avaliadas, o número limitado de indivíduos que podem ser avaliados por ciclo, a baixa previsibilidade dos resultados dos cruzamentos devido a alta heterozigosidade dos progenitores, além do tempo requerido para se completar um ciclo de seleção e do espaço físico requerido (BRUCKNER, 2008).

Hibridações de espécies de *Euvitis* com *Vitis rotundifolia* vem sendo realizadas por muitos anos (JELENKOVIC; OLMO, 1968; OLMO, 1971, 1986; GOLDY, 1992; REISCH; PRATT, 1996; LU; SCHELL; RAMMING, 2000; BOUQUET *et al.*, 2000). Entretanto, o número de plântulas híbridas obtidas tem sido baixo, principalmente quando se utiliza *Vitis rotundifolia* como o parental feminino (OLMO, 1971). A dificuldade na obtenção destes híbridos pode estar associada a fatores genéticos de incompatibilidade ou a barreiras de pré-fertilização tais como a inibição do crescimento do tubo polínico, a falta de germinação dos grãos de pólen e a produção de substâncias inibidoras no pistilo das cultivares de *Vitis rotundifolia*, mecanismos estes que impedem a fertilização (LU; LAMIKANRA, 1996; LU; SCHELL; RAMMING, 2000). Entretanto, a ampla resistência de *Vitis rotundifolia* a doenças e os bons resultados já obtidos com seus híbridos enxertados com alguns cultivares comerciais, fazem com que essa linha de trabalho não seja descartada.

3.2. Míldio (*Plasmopara viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & de Toni)

Doença é o mau funcionamento de células e tecidos do hospedeiro que resulta da sua contínua irritação por um agente patogênico ou fator ambiental e que conduz ao desenvolvimento de sintomas (AGRIOS, 1988). Consiste em uma condição envolvendo mudanças anormais na forma, fisiologia, integridade ou comportamento da planta. Tais mudanças podem resultar em dano parcial ou na morte da planta ou de suas partes.

A importância das doenças das plantas é medida pelos danos diretos que causam, pelos custos despendidos nas medidas de controle e pelas limitações impostas ao uso de determinada variedade. Um patógeno pode ser muito mais destrutivo, quando introduzido numa região diferente daquela de sua origem, pois as condições climáticas podem ser mais favoráveis ao seu desenvolvimento ou o hospedeiro ser mais suscetível. A variabilidade dos microorganismos torna temerária a disseminação de um patógeno de uma região para outra, onde ela já existe, pois pode dar origem a novas raças, tão prejudiciais como se tratasse de um novo organismo (RIBEIRO, 2003).

Dentre os microrganismos patogênicos, os fungos são os responsáveis por mais de 80% das doenças vegetais já descritas. A maioria desses organismos carbono-heterotróficos vive uma relação benéfica com as plantas; outros são saprófitos e degradam matéria vegetal morta, reciclando nutrientes e tornando-os disponíveis para as plantas vivas. Assim apenas poucas espécies de fungos se especializaram e quebraram as interações mutualísticas, tornando-se patógenos de plantas (GRAYNER & KOKUBUN, 2001).

Outros patógenos que causam doenças devastadoras em diferentes hospedeiros e que têm um enorme impacto na agricultura são os oomicetos (LATIJNHOUWERS et al., 2003). Esses apresentam características morfológicas semelhantes as dos fungos filamentosos, no entanto por apresentar uma estreita relação com organismos fotossintetizantes, como as algas, foram transferidos do reino Fungi para o reino Chromista. Entre as características que motivou essa mudança estão a presença de celulose na parede celular ao invés de quitina, hifas não septadas, estado vegetativo com núcleos diploides e zoósporos biflagelados (VAN DER AUWERA et al., 1995).

Os Oomycetes de uma forma geral são um grupo diversificado de organismos que vivem como saprófitas ou como patógenos de plantas (Govers e GIJZEN, 2006). Os oomicetos fitopatogênicos englobam um grande número de espécies que variam em seu estilo de vida, dependendo de sua interação com a planta, podendo ser biotróficos, hemibiotróficos ou necrotróficos. (RIBEIRO, 1996; AGRIOS, 2005).

Uma característica distintiva dos patógenos biotróficos obrigatórios que englobam alguns fungos e oomicetos é a formação de uma estrutura especializada chamada haustório. Durante a infecção, o patógeno penetra a parede celular, invagina a membrana plasmática da célula hospedeira e desenvolve o haustório. Sua importância se deve a diferentes funções que este desempenha na relação biotrófica, sendo essencial na aquisição de nutrientes pelo patógeno (HAHN & MENDGEN, 2001) além de existirem evidências de que essas estruturas estão envolvidas no redirecionamento do metabolismo e a supressão de defesas do hospedeiro (VOEGELE & MENDGEN, 2003) e funcionam como meio de comunicação celular que permite importantes trocas de informações entre o hospedeiro e patógeno para o estabelecimento de uma relação biotrófica bem-sucedida (HEATH, 1997; VOEGELE & MENDGEN, 2003). Coletivamente, os patógenos produtores de haustório incluem alguns dos parasitas de plantas mais destrutivos, que causam enormes perdas econômicas em importantes indústrias agrícolas além da destruição ambiental em ecossistemas naturais. No entanto, pouco se sabe sobre a base molecular da patogênese nesta importante classe de patógenos de plantas, isso, devido principalmente ao fato, de que a maioria destes organismos é de difícil cultura e, portanto, não são facilmente passíveis de abordagens genéticas moleculares (CATANZARITI et al., 2007).

As videiras são suscetíveis ao ataque de diversos patógenos, incluindo fungos, oomicetos, bactérias e vírus, e, assim, seu cultivo depende do uso intensivo de fitoquímicos. Estima-se que a União Europeia emprega 68000 toneladas/ ano de fungicidas para o controle das doenças por fungos ou oomicetos, enquanto que a sua área ocupa somente 3,3% dos solos aráveis da região (MUTHMANN 2007).

No Brasil, os primeiros relatos da ocorrência de doenças na videira datam do século XIX e doenças tais como o míldio (*Plasmopara viticola*), antracnose (*Elsinoe ampelina*) e podridão (*Sclerotinia fuckeliana*) da uva já eram conhecidas no fim daquele século. Supõe-se que os primeiros patógenos de videira no Brasil tiveram sua origem nos Estados Unidos e foram introduzidos pelas castas americanas importadas (RIBEIRO, 2003). No cultivo convencional de videiras derivadas de *V. vinifera* no Estado do Rio Grande do Sul, são realizadas, em média, 14 pulverizações com fungicidas, representando aproximadamente 30% do custo de produção (FREIRE et al., 1992). Destas aplicações, 8 a 10 são efetuadas para o controle do míldio da videira (MENDES, 2002).

O míldio da videira é uma das doenças mais importantes de países produtores de uvas onde o verão é úmido (AMORIM & KUNIYUKI, 2005). Esta doença causa perda parcial ou total de safras e apresenta vários impactos ambientais secundários significativos, devido a repetidas aplicações de fungicidas (GRENVILLE-BRIGGS & WEST, 2005). As variedades derivadas de *V. vinifera* são altamente suscetíveis a *P. viticola*, enquanto espécie *V. muscadinia* e inúmeras variedades das espécies americanas e asiáticas apresentam variados níveis de resistência (BELLIN et al., 2009; GRANDO et al., 2003)

O agente causal do míldio é originário da América do Norte e provocou enormes prejuízos em variedades de *V. vinifera* introduzidas no continente europeu em 1875, sendo ainda a doença mais destrutiva da videira na Europa. Em condições climáticas favoráveis e quando medidas de controle não são aplicadas, o míldio pode destruir até 75% da produção (AMORIM & KUNIYUKI, 2005). A primeira constatação de míldio no Brasil foi em 1981 nas videiras existentes no instituto Agronômico de Campinas (RIBEIRO, 2003).

O agente causal do míldio da videira é um parasita biotrófico obrigatório que para se desenvolver necessita de material vivo do hospedeiro. Pertence ao reino Chromista, classe dos Oomycetes, que engloba os organismos que se reproduzem assexuadamente através de zoósporos biflagelados. Por meio dos haustórios, o patógeno retira diretamente das células do hospedeiro os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento (RIBEIRO, 2003).

O patógeno infecta a planta pelos estômatos, driblando barreiras pré-formadas da superfície do tecido hospedeiro, tais como cutícula e parede celular da epiderme. Posteriormente os zoósporos encistam com formação da parede celular seguido do desenvolvimento de um tubo germinativo que se expande pelos poros estomáticos (KIEFER et al., 2002). Durante o período de incubação, *P. viticola* se estabelece na cavidade subestomática e coloniza o espaço intercelular do mesófilo. No final desse período, os primeiros sintomas aparecem nas folhas infectadas, inflorescência e bagas. Já a esporulação só ocorre quando a umidade relativa do ar excede 92% no período da noite e, sob tais condições, os esporângioforos emergem de dentro dos estômatos com formação de esporângios em suas extremidades (RUMBOLZ et al., 2002).

Os sintomas do míldio ocorrem em todos os órgãos verdes da planta, particularmente nas folhas. Nesse órgão, os sintomas iniciam-se por um encharcamento do mesófilo, formando o sintoma conhecido como “mancha de óleo”, uma mancha pálida, pequena, de bordas definidas, mais facilmente visíveis por transparência contra a luz. Em condição de alta umidade, na face inferior da folha, sob a mancha de óleo observa-se uma eflorescência branca, densa, de aspecto cotonoso, constituída pela frutificação do oomiceto. Com o passar do tempo, a área infectada necrosa e as manchas tornam-se avermelhadas. Folhas severamente infectadas geralmente caem. Esta desfolha reduz o acúmulo de açúcares nos frutos e enfraquecem a planta, comprometendo a produção no ano seguinte (AMORIM & KUNIYUKI, 2005). Assim, está doença reduz a qualidade dos frutos e produtividade tanto por infecção direta das bagas ou como resultado na redução de fotossíntese e vigor das plantas causadas pela infecção das folhas (KORTEKAMP, 2006).

Para combater este patógeno empregam-se fungicidas a base de cobre. No entanto, sua aplicação em longo prazo e subsequentes lavagens das plantas tratadas ocasionam um acúmulo de cobre nos solos dos vinhedos (KOMAREK, 2010). Diante da crescente preocupação ambiental, da saúde humana, bem como o desenvolvimento de cepas resistentes de *P. viticola* (CHEN et al., 2007) e a necessidade de testes toxicológicos e de campo antes do lançamento de qualquer novo produto químico, o uso do fungicida tornou-se limitado. Assim, um dos métodos de potencial redução da severidade da doença é a manipulação dos mecanismos naturais de defesa das plantas.

3.3. Mecanismos de resistência na interação planta-patógeno

A interação planta/patógeno vem sendo estudada intensivamente ao longo de anos, tanto do ponto de vista da planta quanto do patógeno. Um entendimento de como plantas e patógenos se reconhecem para estabelecer uma interação compatível ou não é crucial neste domínio da investigação (MEHTA et al., 2008).

A resistência a doenças pode ser definida como a habilidade da planta em prevenir ou restringir o crescimento do patógeno e sua multiplicação em seus tecidos. Dois tipos de resistência, designadas de acordo com a especificidade das interações controlam as infecções

por fungos e oomicetos: a resistência inespecífica, na qual a planta é considerada não - hospedeira e que confere proteção a uma grande diversidade de patógenos, e a resistência raça-específica, a qual atua somente contra raças específicas de patógenos. Esta última, denominada de resistência gene-a-gene, é condicionada à interação de um par de genes, ou seja, sua ativação depende do reconhecimento por parte da planta (que contém um gene dominante de resistência R) e de um patógeno que possui um gene dominante de avirulência (Avr) (JACKSON & TAYLOR, 1996; KNOGGE, 1996; MYSORE & RYU, 2004).

Os mecanismos de defesa da planta, o reconhecimento e a sinalização de eventos que ocorrem nas células vegetais em resposta a microrganismos, precisam ser rápidos e específicos tornando-se parte de uma estratégia evolutiva para sua permanência na natureza (ALFANO et al., 2004). Esses mecanismos podem ser constitutivos (pré-existent), ou induzidos, quando resultantes da interação hospedeiro-parasita (DIXON et al., 1994)

Neste último tipo enquadram-se repostas de defesa como a reação de hipersensibilidade (HR), caracterizada pela morte rápida e localizada de células junto ao sítio de infecção. A função da HR é conter o patógeno, sendo caracterizada por gerar perturbações bioquímicas, o que inclui alterações em fluxos de íons, hiperoxidação de lipídios, fosforilação proteica, produção de óxido nítrico e de compostos antimicrobianos (ALFANO & COLLMER 2004), a produção de proteínas relacionadas a patogênese (PR), as quais possuem propriedades antimicrobianas; alterações estruturais na parede celular vegetal, tais como a deposição de lignina e proteínas ricas em hidroxiprolina, o desenvolvimento de resistência sistêmica adquirida (SAR), a qual confere resistência às infecções subsequentes; e a resposta de defesa induzida com a síntese de metabólitos secundários antimicrobianos, denominados fitoalexinas (CÔTÉ et al., 1995; HARBORNE, 1999).

A resistência induzida é baseada na interação de moléculas presentes nas superfícies da planta e do patógeno em potencial. Dessa forma, ela inclui eventos associados à percepção de um sinal pelo hospedeiro, a transdução intracelular deste sinal de reconhecimento e a ocorrência de mudanças físicas e bioquímicas que inibem o desenvolvimento do patógeno (DIXON et al., 1994).

Estas moléculas, liberadas durante o estágio inicial de interação planta-microrganismo e capazes de ocasionar mudanças na cascata de sinalização intracelular que leva a ativação da transcrição de genes de defesa, são denominadas elicitores (TARCHEVSKY, 2000; SUDHA & RAVISHANKAR, 2002).

Durante a interação planta-patógeno, moléculas eliciadoras podem ser liberadas da parede celular do patógeno por meio de autólise que ocorre durante o processo normal de germinação dos esporos e crescimento das hifas. A ação de enzimas derivadas das plantas, tais como quitinases e β -glucanases que despolimerizam polissacarídeos presentes na parede celular patógeno (no caso, quitina e glucanos, respectivamente) e causam a ruptura de células do patógeno, inibindo o crescimento do mesmo, também podem gerar moléculas eliciadoras. Adicionalmente, os patógenos, para facilitar a penetração de suas hifas nos tecidos vegetais, também secretam enzimas que digerem os polímeros da parede celular do hospedeiro, liberando oligossacarídeos sinalizadores de repostas de defesa, denominados eliciadores endógenos. Dessa forma, a parede celular vegetal, além de representar uma barreira física de defesa ao ataque de microrganismos, participa ativamente na interação molecular entre plantas e patógenos (BRAGA *et al.* 1993; ESQUERRÉ-TUGAYÉ *et al.*, 2000, VORWERK *et al.*, 2004).

Diversos estudos têm mostrado que o reconhecimento de eliciadores pelas plantas está relacionado à presença de proteínas na membrana plasmática das células vegetais, que agem como receptores (CHEONG & HAHN, 1991; BAUREITHEL et al., 1994; HAHN, 1996). A ligação dos eliciadores aos receptores de membrana dispara vários eventos que amplificam as vias de sinalização intracelulares e levam a ativação de fatores de transcrição dos genes de defesa da célula vegetal. Esse processo ocorre principalmente pela geração e

interação de mensageiros secundários e moduladores da regulação de mecanismos de defesa (BENHAMOU, 1996; TARCHEVSKY, 2000; NÜRNBERGER & SCHEEL, 2001).

Um dos eventos primários que ocorre após o reconhecimento, além da desorganização do citoesqueleto, é a produção de intermediários reativos de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$). Acredita-se que as ROS agem como mensageiros secundários nas vias de transdução de sinais mediadas por eliciadores (DIXON et al., 1994).

Além da geração de ROS, uma rápida alteração na permeabilidade da membrana plasmática ao Ca^{2+} , K^+ e Cl^- tem sido observada após o tratamento com eliciadores. O fluxo de Ca^{2+} é considerado como um evento chave nas vias de sinalização de eliciadores. O aumento de Ca^{2+} intracelular é de extrema importância para processos como o reforço da parede celular; a ativação de proteínas por fosforilação e por AMP cíclico e a formação do complexo cálcio-calmodulina associado ao citoesqueleto (STÄB & EBEL, 1987; BENHAMOU, 1996). O óxido nítrico (NO) também tem sido relatado como um mensageiro secundário na ativação de genes de defesa em planta (NÜRNBERGER & SCHEEL, 2001; MODOLO et al., 2002).

Outros compostos estão envolvidos na transdução de sinais intracelulares para o núcleo, entre eles: o etileno (ET); o ácido jasmônico (JA), que é um derivado bioativo de ácidos graxos, originado a partir do ácido linoléico pela ação de lipooxigenases; e o ácido salicílico (SA), um produto da via de fenilpropanóides. Estas moléculas são parte de duas grandes vias de sinalização de respostas de defesa, uma dependente de SA, e outra independente desse composto, mas dependente de etileno e JA (Montesano et al., 2003). Quando a planta entra em contato com patógenos necrotróficos, suas respostas de defesa em geral são dependentes da via de sinalização do JA e ET, já para patógenos biotróficos a via de sinalização ativada é do SA (THOMMA et al., 1998).

O SA, JA, ET induzem a produção de compostos antimicrobianos, tais como as fitoalexinas e as proteínas relacionadas à patogênese (LAMB & DIXON, 1997). A sinalização dependente de ET é importante para a resposta de plantas à patógenos, ferimento mecânico e ferimento produzido por herbívoros. A sinalização dependente de SA é crítica para o estabelecimento da resistência local e sistêmica a bactérias, enquanto que a sinalização dependente de JA é induzida principalmente em resposta ao ferimento. A intercomunicação entre as vias de sinalização permite a planta ajustar as respostas de defesa, dependendo do tipo de invasor que encontrar (DANGL, 2001).

Em contrapartida no que se refere aos patógenos, a capacidade de superar a defesa vegetal, protegendo-se dos estresses oxidativos ativados pela planta, é de extrema importância. Para tanto, são induzidos vários genes relacionados a patogênese, tais como catalases e superóxido dismutase (SOD), que são responsáveis pela inativação de H_2O_2 e O_2 . Além disto, proteínas expressas pelos patógenos são essenciais para colaborar na repressão da resistência por meio da modificação de proteínas receptoras específicas. A secreção de enzimas extracelulares como pectina esterases, poligalacturonases, xilanases e celulasas é outro processo essencial para colonização e patogenicidade. (VAN SLUYS et al., 2002)

Com o aumento dos estudos genômicos e pós genômicos, considerável volume de informações foi gerado e avanços têm sido alcançados na compreensão de mecanismos de defesa das plantas, bem como estratégias de patogêneses empregadas por organismos patógenos (MEHTA et al., 2008).

3.4. Proteômica

O sequenciamento completo de genomas abriu as portas para um novo universo de estudos dentro da biologia. Cada componente do dogma central da biologia passou a ter uma área de estudo própria, que emprega uma abordagem em larga escala e é associada a genômica.

De acordo com PATTERSON & AEBERSOLD (2003), a integração das ‘ômicas’ servirá de subsídio para o desenvolvimento da biologia de sistemas, termo que os autores denominam de “estudo de um sistema biológico pela análise sistemática e quantitativa de todos os componentes que constituem o sistema”.

Nesse contexto as proteínas formam a ponte central entre os genes e os metabolitos, e a proteômica está intrinsecamente ligada a genômica, transcriptômica e metabolômica. As análises globais da expressão do gene, as funções das proteínas, e os perfis de metabolitos podem revelar propriedades novas nos sistemas biológicos (GUTIERREZ et al., 2005). Assim, a combinação destes dados, integrados em rede poderá fornecer um conhecimento abrangente dos circuitos regulatórios e metabólicos dos sistemas biológicos. Por exemplo, a combinação de dados de microarranjos com análise proteômica poderá revelar o regulador que controla a expressão do gene (IDEKER et al., 2001). A conexão proteômica e metabolômica poderá desvendar os mecanismos pelos quais proteínas controlam padrões metabólicos nas plantas. Dessa forma, um dos objetivos reais de integrar a genômica funcional é vincular espécie de proteína e suas atividades a um gene bem como interligar proteínas e metabolitos que foram produzidos ou afetados, com objetivo de formar uma rede de conhecimento com os dados fornecidos pelas “ômicas” do genoma funcional.

O termo proteômica pode ser definido como sendo a análise de proteínas em grande escala (BESTEL-CORRE et al., 2004). Proteoma e proteômica como objeto e meio de estudo, respectivamente, foram vinculados conceitualmente a genoma e genômica, representando o encadeamento e associação entre DNA e proteínas, genes e produtos da expressão de genes.

Esta técnica permite a análise global de um do produtos dos gene,a proteína, em vários tecidos e estados fisiológicos de células. Com a finalização dos projetos de sequenciamento genômico e o desenvolvimento de métodos analíticos para a caracterização protéica, a proteômica tornou-se um importante campo da genômica funcional. Inicialmente, a proteômica tinha como objetivo a identificação em grande escala de todas as espécies de proteína em uma célula ou tecido. Hoje as aplicações estão se diversificado para analisar vários aspectos funcionais das proteínas, tais como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, atividades e estruturas (SHEVCHENKO et al., 1996; WILKINS et al.,1996).

Admite-se que o proteoma inclui todas as espécies de proteínas que resultam de expressão de genes em uma célula, organela, tecido ou organismo e por meio de proteômica busca-se identificar e caracterizar padrão de expressão, localização celular, atividade, regulação, modificações pós-tradução, interações moleculares, estruturas tridimensionais e funções de cada proteína em um sistema biológico (FINNIE, 2006). Dessa forma, a análise sistemática de proteomas poderá proporcionar entendimento mais direto das funções e da regulação dos processos metabólicos a partir do gene. (BERTONE & SNYDER, 2005).

Com o objetivo de adquirir um perfil protéico a partir de amostras biológicas, a proteômica tem sido associada às técnicas de eletroforese bidimensional em gel (2DE) e espectrometria de massa (MS) (SHEVCHENKO et al., 1996; WILKINS et al.,1996). Por eletroforese bidimensional em géis de poliacrilamida, é possível separar, mapear e quantificar polipeptídeos de proteínas desnaturadas. Na primeira dimensão, os peptídeos são separados de acordo com gradientes de pH e na segunda dimensão, pelo volume molecular (BESTEL-CORRE et al., 2004). No entanto, no início da proteômica, os géis 2DE apresentavam limitações na resolução e reprodutibilidade, os quais foram superados com o uso das tiras imobilizadas com gradiente de pH (IPG) (GORG, 1991).

O maior avanço veio com o desenvolvimento da espectrometria de massa (MS) e o crescimento dos bancos de dados. A técnica de MS, desenvolvida para ionização de proteínas e peptídeos, consiste no tempo de voo com relação à massa/carga dos peptídeos e oferece uma sensibilidade de alta precisão (AEBERSOLD & MANN, 2003).

A relação entre as proteínas e os genes correspondentes pode ser feito a partir da sequência completa do genoma do organismo em questão ou da base de dados de DNA

complementar, feitos por transcrição reversa do RNA mensageiro (PATTERSON & AEBERSOLD, 2003). Dependendo do tipo de espectrômetro de massa utilizado, a identificação de proteínas pode ser feita também por meio de algoritmos para dados de espectrometria de massa, alguns até disponíveis on-line, ou por homologia de proteínas já identificadas com sequência armazenadas em base de dados (BESTEL-CORRE et al., 2004).

Enfim, na era pós genômica, a proteômica está posicionada no centro da genômica funcional com objetivo de estudar a função do gene em larga escala do genoma. Esta técnica revela proteínas em uma célula ou tecido em qualquer momento ou estado fisiológico com a viabilidade de analisar as mudanças que ocorrem nas proteínas e que não podem ser previstas a partir da sequência genômica. No entanto a proteômica apresenta limitações que são comumente pesquisadas para definir melhores estratégias, e assim certamente proporcionar poderosas ferramentas para revelar a função do gene na biologia vegetal (PARK, 2004).

3.4.1. Proteômica em interações entre plantas-microorganismos

Interações planta-patógeno estão entre as associações mais complexas e interessantes para se estudar. Essas interações envolvem organismos vivos que são capazes de iniciar inúmeras infecções e desenvolver estratégias de patogênese. Por meio da co-evolução ambos, plantas e seus patógenos, moldaram estratégias para sobreviver e, eventualmente, ganhar a luta contra seus respectivos invasores ou hospedeiros. Isto ocorre através de constantes batalhas, envolvendo um conjunto de vias e redes de sinalização que forma a patogênese, com mecanismos de defesas das plantas e contra-ataques dos patógenos (EL HADRAMI et al., 2009; EL HADRAMI et al. 2011).

Nos últimos anos, o estudo com patógenos em plantas tem sido realizado pela disponibilidade das suas sequências genômicas e dos recursos para análise da genômica funcional, incluindo transcriptômica, proteômica e metabolômica (TAN et al., 2009). No decorrer do tempo a proteômica se tornou um componente de integração entre todas as “ômicas” e um sistema apropriado para compreender a enorme complexidade da bioquímica dos fungos e oomicetos (DOYLE, 2011). Assim esses estudos têm sido realizados a fim de compreender a interação planta-patógenos e identificar produtos de genes com um papel chave na patogênese e virulência (MEHTA et al., 2008, BHADAURIA et al., 2010).

Sabe-se que estudos de proteômica durante interações planta-patógeno são cruciais, já que a maioria das vias usadas tanto por plantas quanto por patógenos dependem da síntese e atividade de proteínas. Deste modo, por décadas, estudo tem sido realizados para a caracterização das muitas famílias de proteínas envolvidas na defesa das plantas, denominadas de proteínas relacionadas a patogênese (PRs) bem como outras também envolvidas a neste mecanismo (VAN LOON, et al., 2006).

Nos últimos anos, novas ferramentas de bioinformática têm surgido, acelerando assim a descoberta e informações dessas inúmeras proteínas (EL HADRAMI et al., 2011). A tecnologia de eletroforese de gel de poliacrilamida (2D -PAGE) vem sendo associada aos novos instrumentos analíticos, tais como a cromatografia líquida de nanofluxo, acoplado a espectrometria de massa (LC-MS/MS) para estabelecer mapas de proteoma e explicar aspectos específicos da interações planta-patógeno [EL-BEBANY, et al., 2010; BHADAURIA, et al., 2010). Outras abordagens que não requerem o uso de PAGE também já foram desenvolvidas (GOODLETT & YI, 2002) e bases de dados têm sido cada vez mais atualizados com proteínas recém-descobertas com base no peso molecular (MW), ponto isoelétrico (IEF) e característica MS / MS com espectros de m/Z (massa sobre carga) (BHADAURIA et al., 2010).

Assim a proteômica pode ser aplicada para elucidar os processos moleculares que ocorrem no reconhecimento de patógenos pelas plantas, durante o processo de infecção e nas respostas de defesa da planta (KAV et al., 2007; KIM & KANG, 2008). A comparação de perfis protéicos permite observar indução na expressão de genes pela presença de patógenos,

auxiliando na identificação de grupos de proteínas específicas envolvidos na resistência de plantas aos patógenos (COLDITZ et al., 2007; KIM & KANG, 2008).

As avaliações de modificações pós-traducionais tais como a fosforilação ou glicosilação, são informações úteis em estudos de proteomas de interações patogênicas, ainda mais que tais modificações não são identificadas no transcriptoma. A fosforilação de proteínas é a modificação pós-tradução predominante em respostas a patógenos (THURSTON et al., 2005), regulando processos de respostas de defesa estimulados por elicitores e atuando provavelmente nas rotas de sinalização após percepção de microorganismos.

A identificação de proteínas quinases e fosfatases e respectivos substratos são informações importantes para esclarecer os primeiros passos das interações planta-microorganismo (COLDITZ et al., 2007). Outra possibilidade é a análise de proteomas de membranas plasmáticas, que permitem identificar proteínas envolvidas na identificação de elicitores e nos primeiros passos de sinalização intercelular (THURSTON et al., 2005). Enfim, a identificação de proteínas e o conhecimento das respectivas funções em interações entre plantas e patógenos podem ser usados em programas de seleção e melhoramento de plantas e desenvolvimento de novas linhagens com maior resistência.

No entanto, apesar dos progressos significativos realizados até o momento, as ferramentas proteômicas disponíveis atualmente ainda não apresentam sensibilidade necessária para detectar peptídeos que sejam transitórios ou que estejam em baixa abundância e, infelizmente, isso se aplica a muitas proteínas de sinalização, tais como fatores de transcrição e proteínas quinases, das quais tem sido comprovado atuar como reguladoras chaves nas interações planta- patógeno (EL HADRAMI et al. 2012).

Resolver identificação inequívoca de proteínas entre os tratamentos contrastantes continua a ser um desafio importante em proteômica. Embora se possa comparar manualmente vários géis com um número limitado de proteínas diferencialmente expressas as dificuldades surgem quando a análise é realizada com alta resolução em 2D -PAGE , particularmente após o uso de IEF em fase líquida ou outros métodos de pré- triagem. Teoricamente, nestes géis, até 15.000 pontos de proteína podem ser detectados mas, na prática apenas um terço do número ou menos pode ser resolvido com precisão e analisados. Um extenso desenvolvimento de hardware e software para analisar precisamente essas imagens ocorreu nos últimos anos com objetivo de maximizar anotações locais, estabelecer padrões de proteínas, resolver pontos coalescentes, e fornecer uma comparação rigorosa entre os tratamentos testados. Correspondência em bancos de dados disponíveis é muitas vezes dificultada por uma extensa presença de proteínas hipotéticas sem função atribuída e/ou pelo falta de seqüências de proteínas completas (EL HADRAMI et al. 2011).

Assim combinar abordagens de transcriptoma e proteoma muitas vezes produz uma correlação precisa entre a variação da expressão do gene e as alterações nos níveis das proteínas detectadas, permitindo uma exata definição da identidade e função das proteínas. Estes podem também ser complementados com uma análise a partir de matriz de in silico para prever a localização do compartimento, estruturas e funções (EL HADRAMI et al. 2011).

Somando a isso, um melhor conhecimento dos patossistemas considerados para análise proteômica por meio de outras abordagens moleculares, bioquímicas, fisiológicas e epidemiológicas auxilia a interpretação mais confiável dos dados recolhidos. (EL HADRAMI et al. 2012).

4. Referências Bibliográficas

AFROZ, A.; ALI, G. M.; MIR, A.; KOMATSU, S. Application of proteomics to investigate stress-induced proteins for improvement in crop protection. **Plant Cell Reports**, v. 30 (5), p. 745–763, 2011.

AGRIOS, G. N. **Plant Biology**. San Diego: Academic Press, 1988.

AKKURT, M., et al. Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). **Molecular Breeding**, v.19, p.103 - 111, 2006.

ALFANO, JR.; COLLMER, A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defence. **Annual Review Phytology**, v. 42, p. 385–414, 2004.

AMORIM, L.; KUNIYUKI, H. Doenças da videira In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; FILHO, A. B.; CAMARGO. L.E.A. **Manual de fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Agronomica Ceres, v. 2, 2005.

ANDRADE, E. R. de; SCHUCK, E.; DAL BÓ, M. A. Avaliação da Resistência de *Vitis* spp. a *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis* em condições controladas. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 11, p. 1287-1290, 1994.

BAUREITHEL, K.; FELIX, G., BOLLER, T. Specific, high-affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitoooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.17931-17938, 1994.

BELLIN, D., et al. The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. **Plant Cell**, v.11, p.781–791, 1999.

BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defence pathways. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 233-240, 2009.

BERTONE, P.; SNYDER, M. Prospects and challenges in proteomeics. **Plant Physiology**, v. 138, n. 2, p. 560-562, 2005.

BESTEL-CORRE, G.; GIANINAZZI, S.; DUMAS-GAUDOT, E. Impact of sewage sludges on *Medicago truncatula* symbiotic proteome. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, n. 11, p. 1.651-1.659, 2004.

BHADAURIA, V.; et al. Proteomic studies of phytopathogenic fungi, oomycetes and their interactions with hosts. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126 (1), p. 81–95, 2010.

BHADAURIA, V.; et al. Proteomic studies of phytopathogenic fungi, oomycetes and their interactions with hosts. **European Journal os Plant Phatology**, v. 126, p. 81–95, 2010.

BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteômics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Treds Biothecnology**, v.17, p.121-127, 1999.

BOREM, A. **Melhoramento de Plantas**. Vicoso: Editora UFV, 3 ed., 2001.

- BOUWER, J. E.; MEREDITH, C.P. The parentage of a classical wine grape, Cabernet Sauvignon. **Nature Genetics**, v.16,p.84-87,1997.
- BRADFORD, M.M.. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, M.R., COSTA, A. P.P.; DIETRICH, S.M.C. Cell wall carbohydrates as trigger of defensive responses in plants. **Ciência e Cultura**, v. 45, p. 76-80, 1993.
- BRUCKNER, C.H. **Fundamentos do Melhoramento de Fruteiras**. Vicosas: UFV, 2008.
- BURGER, P.; BOUQUET, A.; STRIEM, M.J. Grape Breeding. In: JAIN, S.M.; PRIYADARSHAN, P.M. **Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species**. Springer-Verlag: New York, p.161-189, 2009.
- CAMARGO, U. A. Melhoramento genético da videira. In: LEO, P. C. de. S.; SOARES, J. M. **A viticultura no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Arido, p.93-128, 2000.
- CAMARGO, U. A.; et al. Nova cultivar de uva para suco e vinho de mesa. Brasília: Embrapa. Comunicado Técnico, v. 63, 2005. Disponível em: <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot063.pdf>. Acesso em 24 jul. 2012.
- CAMARGO, U.A. **Uvas do Brasil**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Uva e Vinho – SP, doc. 09, 1994.
- CHEONG, J. J. & HAHN, M. G.. A specific, high-affinity binding site for the hepta β -glucoside elicitor exists in soybean membranes. **The Plant Cell**, v.3. p.137-147, 1991.
- CHISHOLM, S. T., COAKER, G., DAY, B. E STASKAWICZ, B. J. Host–microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v.124, p.803– 814, 2006.
- CHOQUER, M.; et al. Botrytis cinerea virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. **FEMS Microbiology. Letters**, v.277 (1), p.1–10, 2007.
- COLDITZ, F.; KRAJINSKI, F.; NIEHAUS, K. Plant proteomics upon fungal attack. In: ŠAMAJ, J.; THELEN, J. (Ed.). **Plant proteomics**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. p. 283-309.
- CÔTÉ, F.; CHEONG, J.; ALBA, R. & HAHN, M. G. Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside elicitors of phytoalexin synthesis in soybean. **Physiologia Plantarum**, v. 93, p. 401-410,1995.
- DANGL, J.L., DIETRICH, R.A., AND RICHBURG, M.H. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant–microbe interactions. **Plant Cell**, v. 8, p.1793–1807, 1996.
- DANGL, J.L.; E JONES, J.D. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411,p. 826–833, 2001.

DINESH-KUMAR, S.P., AND BAKER, B.J. Alternatively spliced *N* resistance gene transcripts: Their possible role in tobacco mosaic virus resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.97, p.1908–1913,1999.

DIXON, R. A., HARRISON M. J.; LAMB, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 479-501, 1994.

DOYLE, S. Fungal proteomics: From identification to function. **FEMS Microbiology**, v. 321 (1), p. 1–9, 2011.

EIBACH, R., ZYPRIAN, E., WELTER, L. J., TOEPFER, R. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. **Vitis**, v.46, p.120 - 124, 2007.

EL HADRAMI, A.; ADAM, L.R.; DAAYF, F. Biocontrol treatments confer protection against *Verticillium dahliae* infection of potato by inducing anti-microbial metabolites. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, p. 328–335, 2011.

EL HADRAMI, A.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F. Suppression of Induced Plant Defense Responses by Fungal Pathogens. In: BOUARAB. K.; BRISSON; N.; DAAYF, F. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. CABI, Oxfordshire, UK, p. 231–268, 2009.

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

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S. A.. **Normas técnicas para o cultivo da videira em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 1998.

ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T., BOUDART, G.; DUMAS, B. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p.157-163, 2000.

FINNIE, C. E. Plant proteomics. **Annual Plant Reviews**, v. 28, p. 275, 2006.

FITZGERALD, D. Non-two-dimensional gel electrophoresis approach for the proteomic analysis of membrane proteins. **Application Note**, p. 16-17, 2001.

FREIRE, L.M.M.; FREIRE, J.M.; CALDART, V.Z. **Transformação na estrutura produtiva dos viticultores da Serra Gaúcha: 1985- 1991**. Bento Gonçalves: EMBRAPA-CNPUV, Doc. 07,1992.

GIOVANNINI, E. **Uva agroecológica**. Porto Alegre: Renascença, 2001.

GOLDY, R.; ONOKPISE, O.U. Genetics and breeding. In: BASIOUNY, F.M.; HIMELRICK, D.G. (Ed.). **Muscadine grapes**. Blacksburg: ASHA, p.51-90, 2001.

GONZALEZ-FERNANDEZ, R.; PRATS, P.; JORRIN-NOVO, J. V. Proteomics of plant pathogenic fungi. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

- GOODLETT, D.R.; YI, E.C. Proteomics without polyacrylamide: Qualitative and quantitative uses of tandem mass spectrometry in proteome analysis. **Functional & Integrative Genomics**, v. 2, p. 138–153, 2002.
- GORG, A. Two-dimensional electrophoresis. **Nature**, v.349, p.545-546, 1991.
- GRAYER, R. J. & KOKUBUN, T. Plant-fungal interaction: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry**, v.56, p. 253-263, 2001.
- GRENVILLE-BRIGGS LJ, VAN WEST P. The biotrophic stages of oomycete-plant interactions. **Advances in Applied Microbiology**, v.57, p.217-243, 2005.
- GRIGOLETTI JR., A.; SÔNEGO, O.R. **Principais doenças fúngicas da videira no Brasil**. Bento Gonçalves: EMBRAPA/CNPUV, Circular Técnica 17,1993.
- GUTIERREZ, R. A., SHASHA, D. E., CORUZZI, G. M. Systems biology for the virtual plant. **Plant Physiology**, v.138, p.550–554, 2005.
- HAAS, B. J.; et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. **Nature**, v. 461, p. 393–398, 2009.
- HADWIGER, L. A. Localization predictions for gene products involved in non-host resistance responses in a model plant/fungal pathogen interaction. **Plant Science**, v.177 (4), p. 257–265, 2009.
- HAHN, M.; MENDGEN, K. Signal and nutrient exchange at biotrophic plant–fungus interfaces. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 322–327, 2001.
- HARBORNE, J. B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.27, p. 335-367,1999.
- HEATH, M. C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. **Annals of Botany**, v. 80, p. 713–720, 1997.
- IDEKER, T., GALITSKI, T., HOOD, L. **Annual Reviews Genomics and Human Genetics**. v. 2, p. 343–372, 2001.
- RUMBOLZ, J.; et al. Sporulation of *Plasmopara viticola*: differentiation and light regulation, **Plant Biology**, v.4, p. 413-422, 2002.
- JACKSON, A. O.; TAYLOR, C. B. Plant-microbe interactions: life and death at the interface. **The Plant Cell**, v.8, p. 1651-1668, 1996.
- JAILLON, O. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. **Nature**, v. 449, p. 463-467, 2007.
- JELENKOVIC, G.; OLMO, H. P. Cytogenetics of *Vitis*. Partially fertile F1 diploid hybrids between *Vitis vinifera* L. X *Vitis rotundifolia* Michx. **Vitis**, v.7, p.281-293, 1968.
- KAV, N. N. V.; et al. Application of proteomics to investigate plant-microbe interactions. **Current Proteomics**, Sharjah, v. 4(1), p. 28-43, 2007.

KIEFER, B.; et al. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. **Planta**, v. 215, p. 387-393, 2002.

KIM, S. T.; KANG, K. Y. Proteomics in plant defense response. In: AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R. (Ed.). **Plant proteomics: technologies, strategies, and applications**. New Jersey: John Wiley & Sons, p. 587-604, 2008.

KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **The Plant Cell**, v. 8, p.1711-1722, 1996.

KOMARE, K. M.; et al. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. **Environment International**, v. 36, p. 138-151, 2010.

KORTEKAMP, A. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 58 - 67, 2006.

LAMB, C., DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review Plant Physiology**, v.48, p.251–275. 1997.

LANG, G.A. Dormancy: A new universal terminology. **Hortscience**, v. 22(5), p. 817-820, 1987.

LEAO, P.C.S.; BORGES, R.M.E. Melhoramento Genético da Videira. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. 61p. (Embrapa Semiárido. Série Documentos, 224). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 14 jan. 2014.

LU, J.; LAMIKANRA, O. Barriers to intersubgeneric crosses between *Muscadinia* and *Euveitis*. **HortScience**, v. 31, p. 269-271, 1996.

MARTENS, C.; VANDEPOELE, K.; VAN DE PEER, Y. Whole-genome analysis reveals molecular innovations and evolutionary transitions in chromalveolate species. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 105, p. 3427–3432, 2008.

MEHTA, A.; et al. **Flutuação de inóculo no ar, desenvolvimento e validação de um sistema de previsão do míldio-da-videira**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 123 f. 2002.

MODOLO, L.V., CUNHA, F.Q., BRAGA, M. R. & SALGADO, I. Nitric oxide synthasemediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. **Plant Physiology**, v.130, p. 1288-1297, 2002.

MONTESANO, M., BRADER, G. & PALVA, T. 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, p. 73-79, 2003.

MURAD, A.M.; et al. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.142, p. 365–370, 2006.

- MYSORE, K. S.; RYU, C. M. Nonhost resistance: how much do we know? **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 97-104, 2004.
- NÜRNBERGER, T.; SCHEEL, D. Signal transmission in the plant immune response. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 372-379, 2001.
- OHKMAE K. P. Proteomic Studies in Plants **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37(1), p. 133-138, 2004.
- OLMO, H.P. The potential role of *Vitis vinifera* × *Vitis rotundifolia* hybrids in grape variety improvement. **Experientia**, v.42, p.921–26, 1986.
- OLMO, H.P. *Vitis vinifera* × *Vitis rotundifolia* hybrids as wine grapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.22, p.87-91, 1971.
- PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature Genetics**, v. 33,(3) (suplemento), p. 311-323, 2003.
- PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Salicylic acid-independent plant defence pathways. **Trends Plant Science**, v. 4, p.52-8. 1999.
- PIETERSE, C. M. J.; TON, J.; VAN LOON, L. C. Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden? **AgBiotechNet**, v.3, p.68. 2001.
- POMMER, C. V.; TERRA, M.M; PIRES, E.J.P. Cultivares, melhoramento e Fisiologia. In: POMMER, C. V, (Eds) **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.109-249, 2003.
- PRZYMUSINSKI, R.; RUCINSKA, R.; GWOZDZ, E. A. Increased Accumulation of Pathogenesis- Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopatology**, 44, 135-162, 2006.
- R.; ROCHA, T. L. Plant-pathogen interactions: What is proteomics telling us? **FEBS Journal**, v. 275 (15), p. 3731–3746, 2008.
- REISCHT, B.I.; PRATT, C. Grapes. In: JANICK, J.; MOORE, J.N. (Ed.). **Fruit breeding: vine and small fruits**. New York: John Wiley, v.2, p.297-369, 1996.
- RIBEIRO, D.W. **Metodologias para a propagação *in vitro* da videira: variedades Paulsen 1103, VR 043-43 e Cabernet Sauvignon**. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.
- RIBEIRO, I. J. A. Doenças e Pragas. In: POMMER, C. V, (Eds) **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.109-249, 2003.
- RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet sauvignon para elaboração de vinho tinto. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 192-198, 2002.
- RYALS, J.A., UKNES, S., WARD, E. Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, v.104, p.1109–1112, 1994.

SANTOS, P. M.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. A Análise Proteômica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos. **Boletim de Biotecnologia**, p 7-17, 2004.

SCHOTTENS-TOMA, I. M. J.; DE WIT, P. J. G. M. Purification and primary structure of a necrosis-inducing peptide from the apoplastic fluids of tomato infected with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 33 (1),p. 59–67, 1988.

SCHUCK, E.; et al Novas alternativas na busca de soluções para o controle do declínio da videira. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 6, n. 4, p. 48-50, 1993.

SCHUCK, E.; et al. **Avaliação de cultivares para o estado de Santa Catarina 2004/2005**. Florianópolis: EPAGRI, p. 139-141, 2004. (EPAGRI, Boletim Técnico no. 125).

SHEVCHENKO, A.; et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proceedings of National Academy. Science**, v. 93, p.14440-14445, 1996.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. da R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 32p. (Circular Técnica, 56).

SOUZA FILHO, J.M. Vinho e Saúde. In: Regina, M.A. et al. **Viticultura e enologia: atualizando conceitos**. Caldas: EPAMIG-FECD, p. 1-16, 2002.

SOUZA, J.S.I. **Uvas para o Brasil**. Piracicaba: FEALQ, 1996.

STÄB, M. R.; EBEL, J. Effects of Ca²⁺ on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 257, p.416-423, 1987.

STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J.P.. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, v.35, p. 235–270, 1997.

SUDHA, G.; RAVISHANKAR, G. A. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 71, p. 181-212. 2002.

TAN, K.; et al. Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. **Molecular Plant Pathology**, v.10 (5), p.703–715, 2009.

TARCHEVSKY, I. A. Elicitor-induced signaling pathways and their interaction. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 47, p. 285-294, 2000.

TECCHIO, F.M., MIELE, A., RIZZON, L. Notas Científicas - Características sensoriais do vinho Bordô. **Pesquisas Agropecuarias Brasileira**, v. 429 (6), p. 897-899, 2007.

TESTOLIN, R.; DI GASPERO, G. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine ‘Bianca’ is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. **Theoretical and Applied Genetics**, v.120, p.163-176, 2009.

THOMMA, B.P.H.J.; et al. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p.15107-15111,1998.

THURSTON, G.; et al. Proteomic and phosphoproteomic approaches to understand plant-pathogen interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 66, n. 1-2, p. 3-11, 2005.

UKNES, S.; et al. Biological induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v.6, p. 692–698, 1993.

UVIBRA - União Brasileira de Vitivinicultura e Secretaria da Agricultura do RS. Disponível em: http://www.uvibra.com.br/dados_estatisticos.htm. Acessado em: 24 de set. 2012.

VAN DE WOUW, A. P.; HOWLETT, B. J. Fungal pathogenicity genes in the age of ‘omics’. **Molecular Plant Pathology** , v. 12 (5), p. 507–514, 2011.

VAN KAN, J. A. L. Licensed to kill: The lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. **Trends Plant Science**, v. 11 (5), p. 247–253, 2006.

VAN LOON, L. C., REP, M., PIETERCE, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Voegele RT & Mendgen K (2003) Rust haustoria: nutrient uptake and beyond. **New Phytologist**, v. 159, p. 93–100, 2003.

VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 203-209, 2004.

W.J. CHEN.; et al. At least two origins of fungicide resistance in grapevine downy mildew populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p. 5162-5172, 2007.

WELTER, L. J.; et al. Untersuchungen potentieller Mehlauresistenzgene der Weinreben (Análise de genes potencialmente envolvidos na resistência contra oídio e míldio da videira) In: EUGEN, U. **Deutsches Weinbau Jahrbuch 2008 (Livro Anual da Vitivinicultura Alemã)**. Stuttgart: p. 66-71, 2008.

WELTER, L. J.; et al. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L). **Molecular Breeding** , v.20, p.359 - 374, 2007.

WELTER, L.; et al. Identification, isolation and characterization of a CC-NBS-LRR candidate disease resistance gene family in grapevine. **Molecular Breeding**, v. 22, p. 421-432, 2008.

WILKINS, M. R., et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, v.14, p.61-65, 1996.

ZANUZ, M.C. **Efeito da maturação sobre a composição do mosto e qualidade do suco de uva**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 117 p. 1991.

Capítulo II

Caracterização histopatológica em tecidos foliares de variedade resistente e suscetível de *Vitis* *sp* infectadas com *Plasmopara viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & de Toni

Resumo

Plasmopara viticola, agente causal do míldio na videira, é um oomiceto obrigatório que se desenvolve nos espaços intercelulares dos tecidos do hospedeiro. Para visualizar o desenvolvimento das estruturas de infecção desse patógeno, observações histológicas são os métodos mais eficazes. Com o objetivo de obter informações sobre a resposta do hospedeiro ao míldio, o desenvolvimento do patógeno foi comparado em duas cultivares de videira, uma susceptível (Cabernet Sauvignon) e uma resistente (Bordô) em diferentes horas após a inoculação (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120). Para essas análises, microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram utilizadas. Em microscopia óptica foi utilizado azul de toluidina para as análises do desenvolvimento do patógeno nos espaços intercelulares do mesofilo, bem como, avaliaram-se as mudanças bioquímicas ocorridas no hospedeiro durante a infecção. A MEV mostrou em alta resolução, contrastes entre as estruturas das cultivares em estudo e diferenças de comportamento do patógeno nas duas variedades hospedeiras. Foi possível observar diferenças estruturais nos estômatos, bem como diferenças e alterações nas células do mesofilo da cultivar resistente após a infecção. Em MEV, para a cv. Cabernet Sauvignon detectaram-se as etapas do desenvolvimento do patógeno: encistamento, penetração do tubo germinativo, crescimento do micélio nos espaços intercelulares do mesofilo, emissão dos esporângioforos com formação dos esporângios seguida de ruptura da parede celular e desorganização do mesofilo. Já para a cv. Bordô devido a grande quantidade de pêlos na superfície epidérmica a MEV não possibilitou observar todas as etapas do desenvolvimento do patógeno, mas seu emprego foi importante para visualizar a deficiência na orientação dos esporos para emissão dos tubos germinativos através dos estômatos, característica essa não desenvolvida pelos esporos na superfície foliar da cv. susceptível.

Abstract: *Plasmopara viticola*, causal agent from the Grapevine Powdery Mildew, is a mandatory oomycete that develops itself on intercellular spaces in the host tissues. To visualize the development of infection structures from this pathogen, histological observations are the most effective methods. In order to obtain information about host response to Powdery Mildew, this study aimed to compare the pathogen development between two Grapevine varieties, a susceptible one (Cabernet Sauvignon) and a resistant one (Bordo) in different time after inoculation (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120). Optical Microscopy and Scanning Electronic Microscope (SEM) were used for these analyzes. For the Optical Microscopy, toluidine blue was used for the analysis of pathogen development in the mesophyll intercellular spaces, and we also analyzed the biochemical changes occurred on the host during the infection. The SEM showed, in high resolution, contrasts between the structures of the studied varieties and differences in pathogen behavior for the two host varieties. Structural differences were also observed in stomata, as well as differences in mesophyll cells from the resistant cultivar after infection. For the Cabernet Sauvignon variety, the following stages of pathogen development were observed using SEM: encystment, germ tube penetration, growing of the mycelium in the mesophyll intercellular spaces, sporangiophores emission with formation of sporangia followed by cell wall break and mesophyll disorganization. For the Bordo variety, due the high amount of hair on the epidermal surface, it was not possible to observe all the pathogen development stages using SEM, however, the use of SEM was important to visualize the deficiency on the spore orientation to emit the germ tubes trough the stomata, with this characteristic not being developed by the spores in the leaf surface from the susceptible cultivar.

1. Introdução

A videira (*Vitis vinifera* L.) é susceptível a inúmeras infecções microbianas, exigindo assim intensivo programa de controle baseado no uso de fitoquímicos. Diante dos custos econômicos e do impacto negativo ao meio ambiente decorrente dessas aplicações, o interesse a busca por estratégias alternativas envolvendo ativação do sistema nato de defesa das plantas vem aumentando nos últimos anos (CHONG et al., 2008).

Um dos patógenos de grande importância na videira é a *Plasmopara viticola* que, ao longo do tempo, se tornou um grande problema em todo o mundo causando perdas expressivas devido à infecção das folhas, inflorescência e cachos. Em condição de alta umidade, ele pode se espalhar rapidamente em grandes áreas e em um período de tempo muito curto (MULLER & SLEUMER, 1934). Na primavera, o primeiro inóculo deriva da hibernação de oósporos sexuais (VERCESI et al., 1999). Na sequência, em condições ideais, tais como umidade e temperaturas elevadas, ocorre a rápida propagação do patógeno através de esporos assexuados provocando epidemias graves e tornando a *P. viticola* uma séria ameaça à viticultura (MULLER & SLEUMER, 1934).

Alguns autores acreditam que a resistência ou suscetibilidade da videira a esse patógeno, ou os fatores do hospedeiro que regulam seu desenvolvimento, estão relacionadas a características evolutivas. Fortes evidências históricas sugerem que o *P. viticola*, originário da América do Norte, co-evoluiu com espécies de *Vitis* nativas americanas, resultando no aparecimento de mecanismos de resistência nestas espécies. Fato similar também poderia ter ocorrido na Ásia, onde espécies relacionadas, tais como *Plasmopara cissii* e *Plasmopara amurensis* presumivelmente também co-evoluíram com espécies nativas de *Vitaceae*, em sua área de distribuição, tornando-as também resistentes. No entanto, na Europa, a espécie *V. vinifera* evoluiu na ausência de espécies de *Plasmopara*, e essa falta de interação pode explicar a susceptibilidade dessa espécie ao patógeno (DICK, 2002).

O ciclo biológico do míldio compreende uma fase de multiplicação assexuada que ocorre durante o período vegetativo e uma fase sexual que assegura a sobrevivência do patógeno durante o inverno. A fase assexuada inicia quando zoósporos lançados de esporângios maduros encistam próximos aos estômatos. Em seguida o tubo germinativo é formado, ocorrendo penetração na cavidade subestomática e o desenvolvimento da hifa primária que irá se ramificar nos espaços intercelulares do tecido do mesófilo e expandir para formação de uma rede de micélios (UNGER et al., 2007). Como o agente do míldio na videira realiza seu ciclo de vida essencialmente no interior das folhas, o início da infecção não é detectável e é muitas vezes reconhecida devido as típicas manchas de óleo que aparecem tardiamente durante o processo de colonização. Assim, muitos aspectos da infecção no âmbito celular ainda são desconhecidos.

Em observações microscópicas foi possível observar que os primeiros passos no processo de infecção são essencialmente os mesmos em videira sensíveis e resistentes (KORTEKAMP, 2005). Isto indica que a limitação do desenvolvimento da doença observado nas plantas resistentes baseia-se nos mecanismos pós-infecção. A resistência a *P. viticola*, exibida por videiras americanas pode ser observada após o primeiro haustório ter estabelecido contato com as membranas das células do mesófilo, com temporização e magnitude da infecção variando com as características genotípicas do hospedeiro. Esses mecanismos de resistência pós-infecção em videiras resistentes incluem o acúmulo de espécies reativas a oxigênio, o aumento dos compostos fenólicos antimicrobianos, bem como a ação de proteínas relacionadas à patogênese (PR) e aumento da atividade da peroxidase (KORTEKAMP & ZYPRIAN, 2003; KORTEKAMP, 2005; VANDELLE et al., 2006). Estes eventos conduzem a alterações morfológicas nas células, incluindo espessamento da parede celular, deposição de calose em

estômatos, necrose e em alguns casos ativação da resposta de hipersensibilidade (HR) (KORTEKAMP, 2006; ALLEGRE et al., 2007; DIEZ-NAVAJAS et al., 2008).

Dentre as técnicas utilizadas para realizar essas observações estão à microscopia de luz e mais recentemente a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). A MEV tem sido utilizada por diferentes autores (PALLIOTTI et al., 2000; GINDRO et al., 2003; MUSETTI et al., 2005; BEN SALEM-FNAYOU et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2009) com o objetivo de estudar as características de superfície das folhas, o desenvolvimento anatômico e morfológico de flores, brotos, gavinhas e de sementes ao longo do ciclo de crescimento da videira (BLANKE et al., 1999; GERRATH et al., 2004; LONGBOTTON et al., 2008; ROYTCHEV, 2009), além de acompanhar o desenvolvimento de fungos no interior dos órgãos das plantas infectadas. Desta maneira, Stevenson et al. (2004) observaram a progressão da doença de Pierce na folha e pecíolo; Rügner et al. (2002) acompanharam o crescimento e desenvolvimento de *Erisiphe necator Schw.* em diferentes órgãos e Guido e Madariaga (2003) determinaram a presença de fitoplasmas em *Vitis vinifera* L.

A variedade Bordô, objeto de estudo nesse trabalho, originária dos EUA e constituindo uma das principais variedades de *Vitis labrusca*, apresenta características fenotípicas de resistência ao míldio (GRIGOLETTI & SÔNEGO, 1993). Por não ser cultivada na maioria dos países produtores de vinho e por ser uma uva americana, a literatura mundial sobre essa variedade e seus produtos é praticamente inexistente. No Brasil não há restrição quanto ao seu cultivo e constitui a base da produção de vinhos de mesa e de suco de uva no Brasil representando mais de 85% do volume de uvas industrializadas no País (CAMARGO et al., 2005). A demanda por essa variedade é bem elevada, 32.000 t, principalmente para elaboração de vinho tinto, suco, vinagre, geléias e para consumo *in natura* devido sua precocidade (RIZZON et al., 2000). No entanto, trabalhos sobre o comportamento agrônomo e biológico dessa videira e sobre a composição físico-química da uva e do vinho são escassos (TECCHIO et al., 2007). Assim, diante da sua importância sócio-econômica no mercado nacional e de suas características fenotípicas de resistência ao míldio, há o interesse de melhor compreender o mecanismo de resistência ao míldio presente na variedade.

Dessa forma a comparação do desenvolvimento do patógeno na variedade Bordô com uma variedade suscetível, pode fornecer informações relevantes sobre a natureza dos mecanismos de defesa do hospedeiro resistente, como ela afeta o crescimento e o desenvolvimento do patógeno após a penetração, promovendo um melhor conhecimento sobre o mecanismo de interação planta- patógeno na videira.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal e isolamento do patógeno

Empregou-se como material vegetal para as análises, tecido foliar de mudas de *V. vinifera* var. Cabernet Sauvignon e *V. labrusca* var. Bordô, suscetível e resistente a infecção do *P. viticola*, respectivamente. As mudas foram produzidas no Viveiro Vivae San Michele (Rodeio-SC) e mantidas em vasos plásticos individuais (3L), contendo uma mistura de Plantmax®:areia (2:1, v/v) e cultivadas em casa de vegetação, sob luz natural, com fotoperíodo 16h:8h (claro:escuro), na Estação Experimental da EPAGRI de São Joaquim SC.

Esporos do patógeno foram coletados em áreas experimentais de videira na mesma estação experimental. O patógeno foi mantido em *V. vinifera* var. Cabernet Sauvignon em casa de vegetação e periodicamente a superfície abaxial das folhas jovens foi inoculada com suspensão contendo 2×10^4 esporângios/ml. Após 5-6 dias em casa de vegetação, as plantas foram mantidas durante a noite em câmara úmida com elevada humidade relativa (HR>96%) para induzir a esporulação. Esporângios formados foram embebidos em água destilada estéril para preparação das suspensões e subsequente inoculação dos discos foliares.

2.2. Inoculação do patógeno

Para as análises histológicas, folhas das cultivares em estudo foram destacadas, lavadas com água destilada e secas com papel filtro. Discos foliares de 11 mm de diâmetro foram excisados com o auxílio de furador de cortiça, de tal modo que não possuíssem grandes nervuras. Os discos foliares foram colocados com a superfície abaxial voltada para cima, sobre papel filtro umedecido com quatro mililitros de água destilada estéril e acondicionados em placas de petri. Sobre os discos foliares foram pipetados 50µl da suspensão contendo 5×10^4 esporângios/ml. Em seguida, as placas de petri contendo os discos foram acondicionadas em sala de crescimento a 24°C no escuro durante a noite e em seguida as placas foram colocadas sob a luz com fotoperíodo 16/8h (claro/escuro, respectivamente). A progressão da infecção foi interrompida nos diferentes tempos das análises: 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após a infecção (hai). Para as duas cultivares analisadas, as inoculações foram realizadas em três repetições, com 15 discos foliares por repetição para cada tempo de análise.

2.3. Análises Microscópicas

Para as análises de MEV, os discos foliares foram fixados em solução de 2,5% Glutaraldeído e 0,1 M de tampão fosfato. Após 48 horas em solução de fixação, as amostras foram desidratadas em álcool etílico em concentração crescente de 10 a 100°GL (10 em 10), realizadas em replicatas de 15 minutos por concentração. Em seguida as amostras foram desidratadas em ponto crítico EM-CPD-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha). Subsequentemente, as amostras foram aderidas a suportes metálicos e metalizadas (Metalizador Blatec, CED 030) com ouro. Posteriormente, os discos foliares foram visualizados e fotografados em MEV Jeol 6390 LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japão, a 15 kV) no LCME-UFSC.

Para a descrição histológica em microscópio óptico os discos foliares foram fixados em paraformaldeído 4% em 0,1M de tampão fosfato. Após 48 horas em solução de fixação, as amostras foram desidratadas em álcool etílico em concentração crescente de 30, 50, 70 e 100°GL, realizadas em replicata de 15 minutos por concentração, seguido por encapsulamento com resina Leica. As secções histológicas (5 mm) foram feitas usando um micrótomo rotativo Slee cut 4055. Todas as secções foram coradas com azul de toluidina, visualizadas com microscópio invertido motorizado IX81 Olympus.

3. Resultados

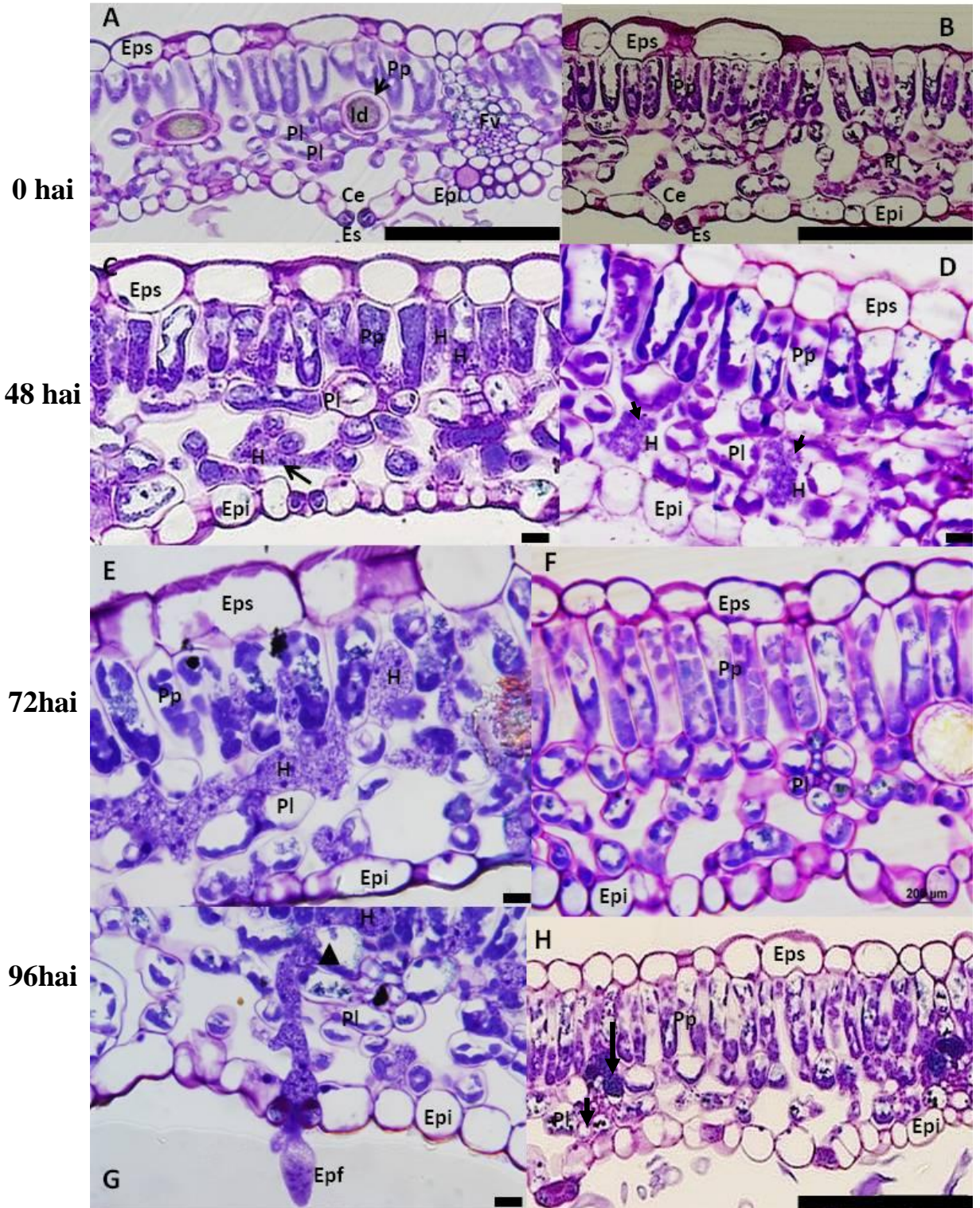
3.1. Histologia das var. Cabernet Sauvignon e Bordô.

As duas variedades avaliadas apresentaram características estruturais similares. Nas secções transversais foi possível observar e distinguir as diferentes estruturas do tecido foliar, cutículas (superior e inferior), epiderme abaxial e adaxial, tecidos parenquimáticos (paliçádico e esponjoso) assim como células especializadas (idioblastos) e estômatos (Figura 1A e 1B).

As cutículas se apresentaram tanto na face adaxial quanto abaxial; a epiderme (abaxial e adaxial) uniestratificada apresentou células com formato alongado e paredes delgadas. Os estômatos estavam presentes somente na face abaxial da folha, apresentando morfologia característica, com duas células guardas típicas ao redor do poro e uma cavidade subestomática logo abaixo do estômato (Figura 1A e B). No entanto, as células epidérmicas ao redor dos estômatos se diferenciam entre as duas variedades: na var. Bordô estas células apresentaram-se mais elevadas e protuberantes (Figura 2E e F). Nas células do mesófilo, o parênquima paliçádico também apresentou algumas similaridades, com somente uma camada de células alongadas. No entanto na var. Bordô essas células apresentaram-se bem mais compactas quando comparadas a var. Cabernet Sauvignon. O parênquima esponjoso estava disposto com 3-5 camadas de células pequenas e grandes espaços intercelulares (Figura 1A e B). Na var. Bordô essas células também eram mais compactas, com maior número de células e menor espaço intercelular e esse processo foi incrementado ao longo do processo de colonização (Fig. 1C, D). Foi observada a presença de idioblastos, estruturas de resistência com ráfides de oxalato de cálcio, em ambas as variedades (Fig. 1A, J). Uma diferença marcante entre as duas foi associada a uma maior ocorrência de pilosidade na var. resistente Bordô (Fig. 2C, D).

Cabernet sauvignon

Bordô



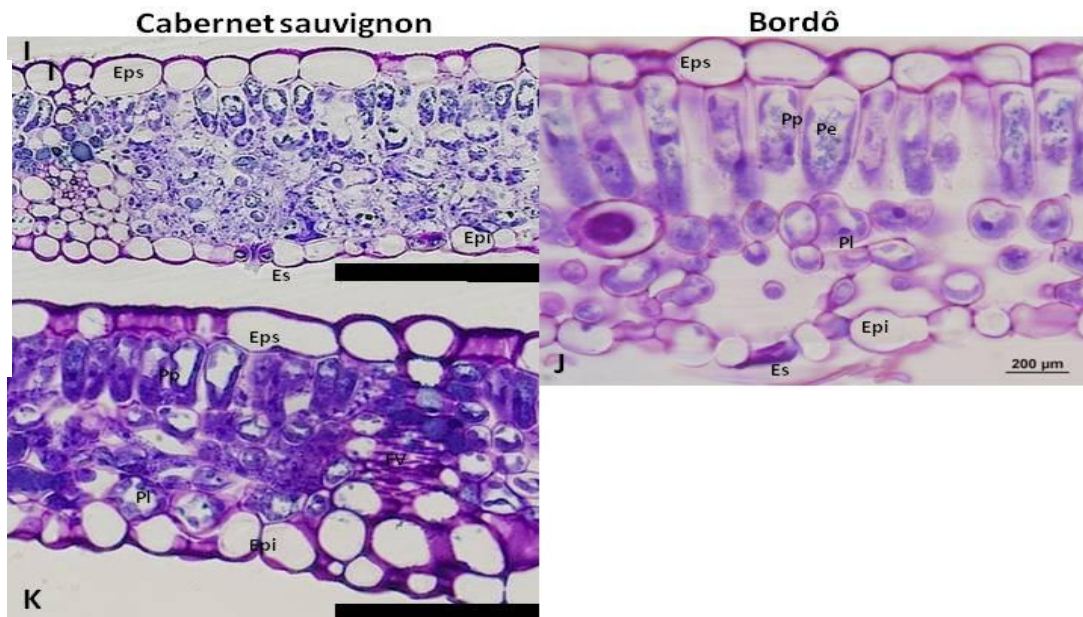
120
hai

Figure 1- Análise histológica da colonização do patógeno *P. viticola* e do mecanismo de defesa da videira em tecido foliar da var. resistente (Bordô) e suscetível (var. Cabernet Sauvignon). Foram realizadas secções transversais coradas com azul de toluidina em diferentes horas após a inoculação (hai). **A-** Secção transversal da var. Cabernet Sauvignon antes da inoculação do patógeno, com presença de idioblastos (seta); **B-** Secção transversal da var. Bordô antes da inoculação do patógeno; **C-** Secção da var. Cabernet Sauvignon 48 hai com a presença de hifas nos espaços intercelulares esses com membranas bem delimitadas e núcleos; **D-** Secções da var. Bordô 48 hai evidenciando células compactas no mesófilo e presença de hifas degradadas (seta); **E-** Secção da var. Cabernet Sauvignon 72 hai com grande parte do mesófilo ocupado pelo patógeno, **F-** Secção da var. Bordô 72 hai com ausência de hifas dos estômatos; **G-** Secção da var. Cabernet Sauvignon 96 hai com emissão do esporângioforo através dos estômatos e evidencia de haustório nas células do hospedeiro (cabeça seta); **H-** Secção da var. Bordô 96 hai mostrando compactação das células do mesófilo e presença de grânulos de cloroplastos e amido nas células do Pp e Pl (seta); **I-** Secção da var. Cabernet Sauvignon 120 hai com ruptura da parede celular e desorganização celular.; **J-** Secção da var. Bordô evidenciando a manutenção da estrutura celular após a colonização com o patógeno; **K-** Secção transversal da var. Cabernet Sauvignon evidenciando a incapacidade das hifas de transpor as nervuras se limitando ao espaço delimitado pelo esclerênquima. Barra-100µm. Eps- epiderme superior; Epi-epiderme inferior;Pp-parenquima paliçádico; Pl- parênquima lacunoso; Id- idioblastos; H-hifas; Es- estômatos; CE- cavidade estomática;Fv- feixe vascular; H- hifas e Pe- fenóis.

3.2. Sintomatologia e caracterização do desenvolvimento de *P. viticola*

Diferenças marcantes foram encontradas entre as var. Cabernet Sauvignon (susceptível) e Bordô (resistente). O desenvolvimento de *P. viticola* na var. Cabernet Sauvignon resultou em sintomas macroscópicos visíveis, entre eles mancha de óleo e esporulação na face abaxial da folha 96 hai (Fig. 2A). Nas folhas da var. Bordô estas características não foram observadas, no entanto, pequenas lesões necróticas locais encontravam-se visíveis (Figura 2B).

Para a caracterização do desenvolvimento do patógeno foram utilizados MEV e secções finas. As secções finas foram coradas com azul de toluidina, um corante policromático que penetra na resina e revela diferenças estruturais do hospedeiro e do patógeno bem como deposição de parede celular ou acúmulo de compostos fenólicos.

Para a variedade resistente Bordô, devido a grande quantidade de pêlos na superfície do tecido foliar, comparativamente à var. suscetível Cabernet Sauvignon (Figura 2C e D),

algumas fases do desenvolvimento do patógeno não foram observadas. No entanto, algumas diferenças marcantes do comportamento do *P. viticola* e da morfologia entre as duas cultivares foram identificadas.

Na var. Cabernet Sauvignon foram observados esporos fixados na superfície adaxial da folha ao redor dos estômatos 6 hai (Fig. 3A), seguido da emissão e penetração do tubo germinativo para interior da cavidade subestomática 12 hai, com número de esporos variando de 1 a 4 esporos por estômato (Fig. 3B). Esse processo se manteve durante 24 hai, com presença de esporângios maduros zoósporos penetrando pelos poros na epiderme no tecido foliar (Fig. 3C). Hifas foram observadas nos espaços intercelulares 48 hai com células homogêneas e formação de haustórios nas células hospedeiras, os quais foram visualizados somente as 72 e 96 hai (Fig. 1E, J). Entre 72-96 hai os espaços intercelulares já estavam praticamente todos preenchidos por hifas (Fig. 1E, G), e essas não apresentavam a capacidade de transpor as nervuras se limitando ao espaço delimitado pelo esclerênquima (Fig. 1 K). O patógeno atingiu a cavidade subestomática 72 hai e esporângióforos emergiram dos estômatos. No entanto, esses esporângióforos não apresentavam esporângios formados ou ainda estavam em formação (Fig. 3D). Sintomas macroscópicos foram visíveis 96 hai com presença de esporângios nas extremidades dos esporângióforos (Fig. 3E), mas somente 120 hai foi possível observar a ruptura da parede celular e desorganização celular (Fig. 1I) com grande número de esporângióforos e esporângios na superfície (Fig. 3 F) dando aspecto cotonoso, característico da doença.

Já na var. Bordô foi observada uma grande quantidade de esporângios fixados na superfície dos pêlos, com emissão de hifas que também se desenvolveram na superfície e dessa forma não penetraram através dos estômatos (Fig. 2D). Outra característica de comportamento contrário ao ocorrido na var. Cabernet Sauvignon foi a dificuldade dos esporos em se orientarem para emitir os tubos germinativos, sendo observada uma grande quantidade de esporos emitindo tubos germinativos, mas com pouca eficiência na penetração. Essa deficiência ficou evidente em esporos presentes sobre os estômatos, mas que emitiram seus tubos germinativos para direções diferentes as da cavidade estomática (Fig. 3H).

Assim, na var. Bordô a frequência de esporos que penetraram pelo tecido foliar foi inferior ao que ocorreu na cv. Cabernet Sauvignon. Associado a isso, alterações metabólicas relacionadas à resistência foram visualizadas no interior do tecido foliar, o que não ocorreu na var. suscetível. Foi observado na var. resistente entre 48 e 96 hai, um aumento no número de células do parênquima esponjoso e compactação das células do parênquima paliçádico acarretando em uma diminuição do espaço intercelular. Observou-se um aumento de grânulos de protoplastos e de amido nas células do parênquima paliçádico e lacunoso com possível objetivo de aumentar a atividade nas células para respostas de resistência (Fig. 1D, H). Observou-se a presença de hifas com aspecto danificado 48 hai, com ausência da integridade da membrana ao redor das hifas e estrutura celular desorganizada (seta) (Figura 1D). O crescimento do patógeno foi interrompido 72 hai, ao contrário do que ocorreu com a cv. suscetível (Fig. 1E, F). As células do parênquima paliçádico e lacunoso apresentaram 96 hai acúmulo de compostos fenólicos no seu interior, seguido de deposição de parede celular, o que pode ter impedido o desenvolvimento do patógeno pelos espaços intercelulares (Fig. 1H).

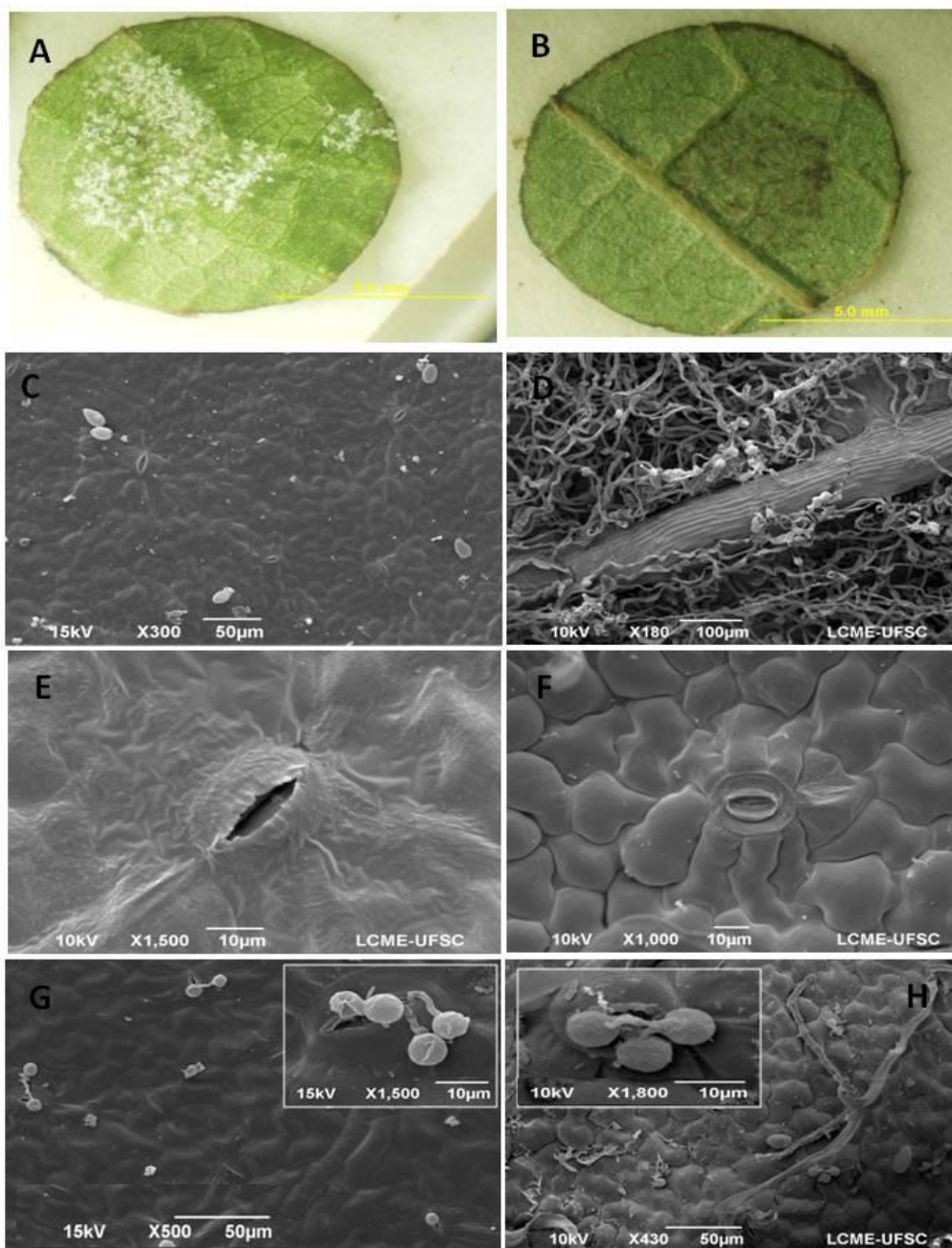


Figure 2 .Características diferenciais, morfológicas e de comportamento de duas variedades de videira: Cabernet Sauvignon (suscetível) e Bordô (resistente) infectadas com *P. viticola* em diferentes horas após a inoculação (hai) por microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A-** Discos foliares da var. Cabernet Sauvignon com esporulação na face abaxial (96hai), **B-** Discos foliares da var. Bordô com pontos de necrose na face abaxial de disco foliar (96hai), **C-** Superfície da epiderme abaxial da var. Cabernet Sauvignon, **D-** Superfície abaxial da var. Bordô mostrando grande quantidade de pêlos e presença de esporos com emissão de hifas na superfície do pêlos, **E-** Estômato característico presente na superfície abaxial da var. Cabernet Sauvignon, **F-** Estômato característico da var. Bordô, **G-** Germinação e penetração dos tubos germinativos de *P. viticola* na var. suscetível, **H-** Germinação dos tubos germinativos longe dos estômatos evidenciando falta de eficiência na orientação e penetração pelos estômatos na var. resistente.

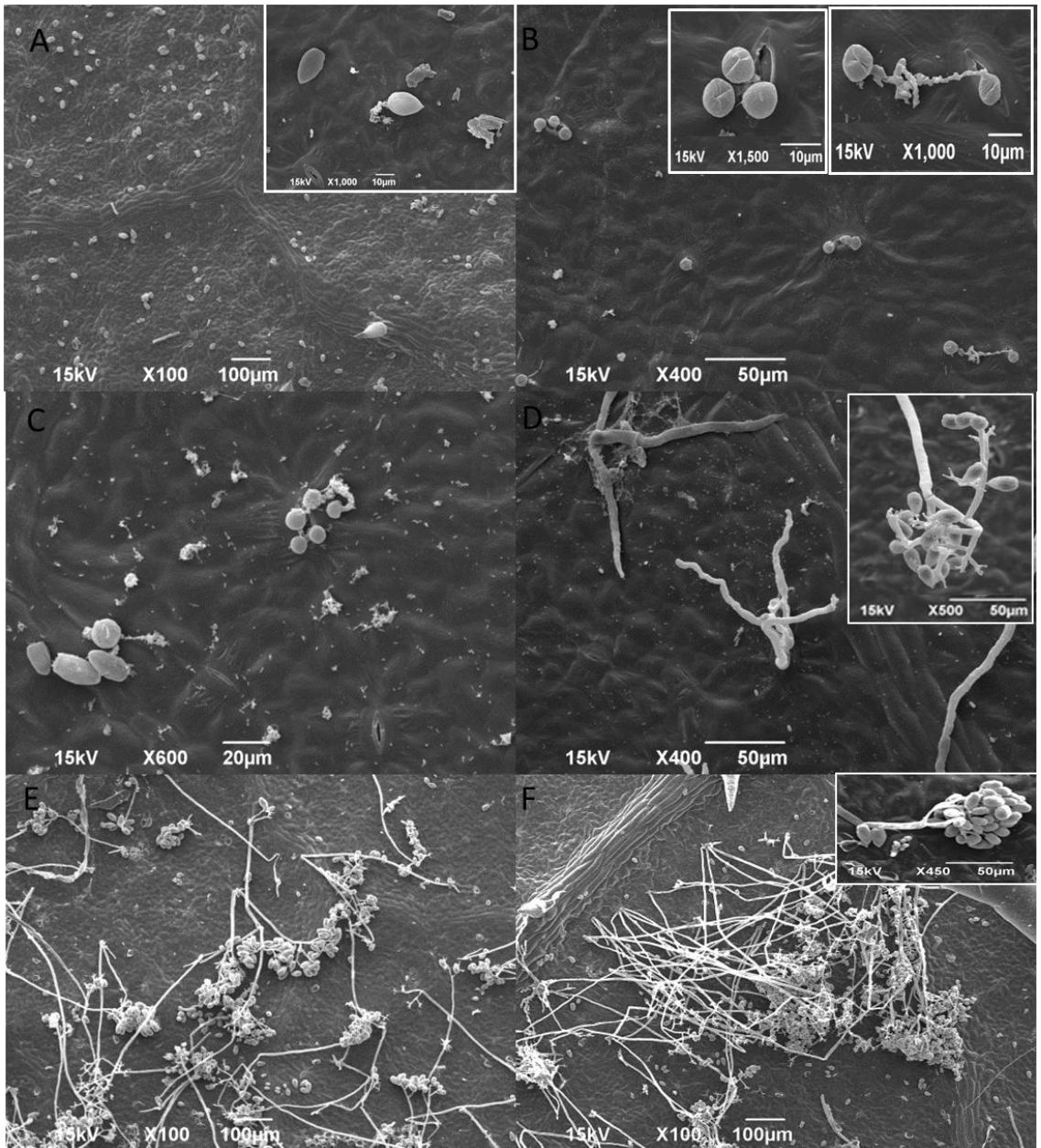


Figura 3 - Análise em MEV de discos foliares de videira da var. suscetível Cabernet Sauvignon infectados com *P. viticola*; **A**- Presença de esporângios e zoósporos na superfície da folha; **B**- Germinação dos esporos encistados 12 horas após a infecção (hai); **C**- Germinação de esporos 24 hai com presença de esporângios maduros; **D**- Esporângióforos emergindo através dos estômatos, mas sem esporângios ou com esporângios ainda em formação com 72 hai; **E**- Esporângióforos com esporângios totalmente desenvolvidos com 96 hai, **F**- Esporulação de *P. viticola* na superfície inferior da folha ao longo da nervura principal 120 hai.

4. Discussão

As interações de compatibilidade entre planta-patógeno são caracterizadas por manifestações de sintomas na planta hospedeira e a capacidade do agente patogênico finalizar seu ciclo de colonização e se propagar (KRANZ, 2003). De acordo com essa definição, a progressão do *P. viticola* ao longo das diversas fases de desenvolvimento, culminando na expressão de manchas de óleo e formação de esporângioforos plenamente desenvolvidos com esporângios na var. suscetível Cabernet Sauvignon representa uma interação compatível. Em contraste, na var. resistente Bordô, a ausência das manchas de óleo e de esporulação, somado à presença de lesões necróticas pontuais, bem como, respostas bioquímicas como compactação do mesófilo para diminuição do espaço intercelular, acúmulo de protoplastos e fenóis pode ser atribuída a uma interação de incompatibilidade desta variedade com *P. viticola*.

Quando comparado o desenvolvimento do patógeno nas duas variedades estudadas, na var. Cabernet Sauvignon o desenvolvimento rápido do patógeno refletiu o progresso contínuo em um hospedeiro suscetível. Em contrapartida, as lesões no genótipo resistente (Bordô) cessaram no início do desenvolvimento do patógeno (48hai). De acordo com BUSAM et al. (1997), DAI et al. (1995) e KORTEKAMP et al., (1998) nos genótipos resistentes de *Vitis*, transcritos de genes de defesa e a peroxidase são ativados até as 48 hai com *P. viticola*. Dessa forma, em genótipos resistentes, a significativa redução do crescimento das hifas e a frequência elevada de lesões com o desenvolvimento interrompido do agente patogênico na fase inicial de colonização podem ser atribuídos a uma resposta de resistência.

As análises histológicas das células do mesófilo possibilitaram observar que a var. Bordô apresentou células mais compactas e menores do que as células do mesófilo da var. Cabernet Sauvignon. Sabe-se que *P. viticola* coloniza os espaços intercelulares do mesófilo, e, conseqüentemente, mesófilos mais compactos têm uma maior probabilidade de limitar o crescimento do micélio no tecido hospedeiro. Assim, os dados do presente estudo estão de acordo com os relatos de RIBEREAU-GAYÓN e PEYNAUD (1982), de que a estrutura do mesófilo pode influenciar a disseminação e progressão do patógeno em videira. Nesta direção, mais recentemente UNGER et al. (2007) descreveram que células mais agrupadas do tecido foliar formam uma barreira estrutural no tecido do hospedeiro, impedindo um maior desenvolvimento do patógeno no mesófilo foliar.

Durante o ciclo de vida do *P. viticola*, os estômatos desempenham um papel importante para as infecções e estágios de esporulação (GINDRO et al., 2003; ALLÈGR et al., 2007). No que diz respeito ao processo de infecção, os estômatos representam aberturas naturais que dão acesso direto ao mesófilo para os esporos encistados de *P. viticola*.

Em trabalho realizado, comparando espécies de videira resistentes, suscetíveis e espécies herbáceas não hospedeiras de *P. viticola* observaram-se diferenças importantes sobre o encistamento dos esporos nos estômatos. Observou-se que o número de esporos encistados por unidade de área foliar foi equivalente em todas as espécies analisadas, mas a distribuição na epiderme foliar foi diferente. Aglomerados de esporos encistados em estômatos foram observados em variedades suscetíveis de *V. vinífera* e espécies não hospedeiras, mas raramente em espécies resistentes de videira (DÍEZ-NAVAJAS et al., 2008), reforçando os resultados do presente trabalho. De acordo com KIEFER et al. (2002) os zoósporos são direcionados por fatores liberados pelos estômatos abertos do hospedeiro, tais como aminoácidos, pectinase (LEANO et al., 1998), isoflavonóides (MORRIS et al., 1992). Apesar destas substâncias não serem consideradas específicas para o alcance do patógeno ao hospedeiro, elas são capazes de direcionar os zoósporos a pontos definidos na planta e favorecer a entrada do parasita de acordo com seu modo de penetração (HARDHAM et al., 2007). Dessa forma o comportamento desorientado apresentado pelos esporos na variedade resistente em estudo pode estar ligado a um mecanismo de resistência associado a esses compostos.

Outra característica que não foi possível visualizar com as metodologias utilizadas na cultivar resistente, mas que pode dificultar ainda mais o sucesso da infecção, é a presença de uma borda cuticular interna aos estômatos. Esta cutícula interna já foi observada em *Vitis rupestris*, *Vitis californica*, *Vitis riparia* e *Vitis amurensis* (JURGES et al., 2009) e todas as espécies foram capazes de deter a colonização iniciada no mesófilo, sugerindo que essa relação é de significado funcional. Assim, embora a cutícula interna provavelmente não esteja envolvida na supressão de rastreamento de zoósporo acredita-se que ela esteja envolvida nos mecanismos de defesa da planta. Ainda segundo JURGES et al. (2009) as espécies americanas presumivelmente co-evoluíram com *P. viticola* e a borda cuticular interna pode ser interpretada como um mecanismo pré-formado de resistência, evoluída como uma consequência da corrida entre a planta hospedeira e o patógeno, objetivando prejudicar ou pelo menos atrasar o crescimento do tubo germinativo através dos estômatos.

Em *P. viticola* os esporos se anexam aos estômatos onde encistam e desenvolvem o tubo germinativo que cresce na cavidade subestomática. Após a formação de um septo no vértice do tubo germinativo, uma vesícula subestomática se desenvolve seguido do crescimento da hifa primária (KIEFER et al., 2002). Com isso, a primeira interação celular verdadeira entre planta-patógeno é atrasada até a hifa primária atingir uma célula do mesófilo. O rompimento da parede celular devido à ação de células do secretoma leva a formação de haustórios. Somente quando haustórios estão funcionais e visíveis é que se inicia a ativação das respostas de defesa tanto em videiras susceptíveis quanto resistentes, levando a crer que a resposta de defesa é dependente de efetores citoplasmáticos produzidos por haustórios operacionais de *P. viticola* (DIEZ-NAVAJAS, 2008). A necrose é uma resposta típica da infecção por *P. viticola* em videiras resistentes e parcialmente resistentes. Em videiras totalmente resistentes como *Vitis rotundifolia muscadine* a resposta de hipersensibilidade RH ocorre horas após a inoculação; já em espécies parcialmente resistentes como *V. rupestris* (DAÍ et al., 1995 & UNGE et al., 2007) e Solaris (GINDRO et al., 2003) esse sintoma aparece alguns dias após a infecção. Apesar do atraso para reconhecimento do haustório, uma interação de incompatibilidade clássica ocorre nos diferentes graus de resistência, em videira resistente, levando a morte das células em contato com o primeiro haustório e cessando o crescimento da hifa. Dessa forma, acredita-se que a cv. Bordô apresenta uma resistência parcial ao *P. viticola* com aparecimento de necroses as 96 hai.

Outra observação importante foram as limitações encontradas pelo micélio nas nervuras em folhas expandidas na var. suscetível indicando que as hifas não são capazes de ultrapassar a limitrofe esclerenquimática. Dessa forma, acredita-se que o micélio se desenvolve preenchendo todo espaço intercelular de um genótipo susceptível até 96 hai e, em seguida, inicia-se a formação de esporângióforos nas cavidades subestomáticas e a formação dos primeiros sintomas. Esses resultados estão de acordo com aqueles comumente observados sobre o período de incubação descrito para cultivares de *V. vinifera* por MULLER E SLEUMER (1936). De acordo com estes autores o período de incubação em condições ótimas é de 96 hai e a esporulação é regulada pelo fotoperíodo (RUMBOLZ et al., 2002). Associado a isso, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem também que a abundância de hifas no mesófilo pode ajudar a desencadear a esporulação, o que também foi observado em UNGER et al (2007).

Diante desses resultados acredita-se que a var. Bordô apresenta uma resistência parcial, envolvendo mecanismos de resistência basal associada a sua grande quantidade de pêlos, parênquima paliçádico mais compacto; bem como mecanismos de resistência sistêmicos associados à resposta de hipersensibilidade e formação de necrose, mudanças na estrutura das células com aumento no número de células no parênquima esponjoso, aumento no número de cloroplastos e síntese de amido nas células adjacentes à colonização e em outras regiões do parênquima paliçádico e esponjoso após a colonização. Para combater o desenvolvimento do

patógeno nessa variedade alguns mecanismos de resistência são ativados diminuindo a eficiência na orientação dos tubos germinativo dos esporos através dos estômatos.

Já a var. Cabernet Sauvignon apresenta-se completamente suscetível, (BOSO & KASSEMAYER, 2008) permitindo o desenvolvimento completo do patógeno, com o aparecimento dos sintomas entre 72 e 96 hai, no entanto esses autores não evidenciaram todo o desenvolvimento do patógeno nessa variedade como apresentado neste trabalho.

Tomando em conjunto, os resultados do presente trabalho evidenciaram diferenças histológicas contrastantes e expressivas na interação planta patógeno entre uma var. de videira resistente (Bordô) e outra suscetível (Cabernet Sauvignon). Estes resultados podem fornecer informações importantes sobre os mecanismos de suscetibilidade e ou resistência e que podem resultar em estratégias mais apropriadas para controle de patógenos no campo.

5. Referências Bibliográficas

- ALLÈGRE, M.; et al. Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola* infected grapevines leaves. **New Phytology**, v.173, p. 832-840, 2007.
- BEN SALEM-FNAYOU, A.; et al. Adapted anatomic characteristics of grapevine leaves in the south of Tunisia. **Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin**, v. 39, p. 11–18, 2005.
- BLANKE, M. M.; SPRING, R. J.; BAKER, E. A. Structure and elemental composition of grape berry stomata. **Journal Plant Physiology**, v. 154, p.477–481, 1999.
- BUSAM, G., KASSEMEYER H. H., AND MATERN, U. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. **Plant Physiology**, v.115, p.1029-1038, 1997.
- CHONG J.; et al. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p.469-481,2008.
- CONRATH, U.; et al. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.19, p.1062-1071, 2006.
- DAI, G. H.; et al. Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. **Physiology Molecular and Plant Pathology**, v. 46, p.177- 188, 1995.
- DICK M.W. Towards an understanding of the evolution of the downy mildews. In: SPENCER-PHILLIPS P. T. N.; GISI U.; LEBEDA, A. (Eds), **Advances in Downy Mildew Research**, Vol. 1. Kluwer, Dordrecht: p. 1–59, 2002.
- DIEZ-NAVAJAS A. M.; et al. Nonhost versus host resistance to the grapevine downy mildew, *Plasmopara viticola*, studied at the tissue level. **Phytopathology**, v. 98, p. 776-780, 2008.
- DURRANT, W .E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review Phytopathology**, v. 42, p.185-209, 2004.
- GERRATH, J.M., WILSON, T., POSLUSZN, U. Morphological and anatomical development in the Vitaceae. VII. Floral development in *vitis riparia*. **Canadian journal of botany**, v. 66(7), p. 1334-1351, 1988. .
- GERRATH, J.M., WILSON, T., POSLUSZN, U. Morphological and anatomical development in the Vitaceae. VII. Floral development in *Rhoicissusdigitata* with respect to other genera in the family. **Canadian journal of botany**, v. 82(2),p. 198–206, 2004.
- GINDRO, K.; PEZET, R.; VIRET, O. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. **Plant Physiology. Biochemistry**, v.41, p. 846-853, 2003

GUIDO, H. M., MADARIAGA, M. V. Immunological, microscopical and molecular evidence of phytoplasma in grapes. **Agricultura Técnica**, v.63 (1), p. 15-22, 2003.

HARDHAM, A. R. Cell biology of plant-oomycete interactions. **Cell Microbiology**, v.9, p.31-39, 2007.

JURGES, G.; et al. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. **Plant Biology**, v. 11, p. 886 – 898, 2009

KIEFER, B.; et al. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. **Planta**, v. 215, p. 387-393, 2002.

KORTEKAMP, A.; ZYPRIAN E. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using in vitro plants. **Journal Plant Physiology**, v. 160, p.1393-1400, 2003.

KORTEKAMP A. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. **Plant Physiology Biochemistry**, v.44, p.58-67, 2006.

KORTEKAMP A. Growth, occurrence and development of septa in *Plasmopara viticola* and other members of the *Peronosporaceae* using light- and epifluorescence-microscopy. **Mycology Research**, v.109, p.640-648, 2005.

KRANZ, J. **Comparative Epidemiology of Plant Diseases**. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2003.

LEANO, E. M.; VRIJMOED, L. L. P.; AND JONES, E. B. G. Zoospore chemotaxis of two mangrove strains of *Halophytophthora vesicula* from Mai Po Hong Kong. **Mycologia**, v. 90, p. 1001-1008, 1998.

LONGBOTTON, M.L.; FRY, P.R.; SEDGLEY, M. Observations on the morphology and development of star flowers of *Vitis vinifera* L. cvs Chardonnay and Shiraz. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.14, p. 203–210, 2008.

MORRIS, P. F.; AND WARD, E. W. B. Specificity in the chemoattraction of zoospores of *Phytophthora sojae* by soybean isoflavones. **Canadian journal of botany**, v.14, p. 246, 1992.

MÜLLER, K.; SLEUMER, H. iologische Untersuchungen über die Peronosporakrankheit des Weinstocks mit besonderer Berücksichtigung ihrer Bekämpfung nach Inkubationsmethode. **Zeitschrift für Wissenschaftliche Landwirtschaft**, v.79, p.509–576, 1934.

MÜLLER, K., AND SLEUMER, H. Biologische Untersuchungen über die *Peronospora*-Krankheit des Weinstocks unter besonderer Berücksichtigung ihrer Bekämpfung nach der Inkubationskalendermethode. **Landwirtsch. Jahrb**, v. 79, p.509-576, 1936.

MUSETTI, R.; et al. Ultrastructural analysis of *Vitis vinifera* leaf tissues showing atypical symptoms of *Plasmopara viticola*. **Micron**, v. 36, p. 73–80, 2005.

PALLIOTTI, A., CARTECHINI, A., FERRANTI, F. Morpho-anatomical and physiological characteristics of primary and lateral shoot leaves of Cabernet Franc and Trebbiano Toscano

grapevines under two irradiance regimes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, p. 122–130, 2000.

RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. **Traité d'Ampélogie. Sciences et Techniques de la Vigne. Tome 1: Biologie de la Vigne, Sols de Vignobles. Tome 2: Culture, Pathologie, Défense Sanitaire de la Vigne.** Ed Dunod, Paris. 1982.

ROYTCHEV, V. Application of cluster analysis and principal component analysis in palynobiometric studies of seedless cultivars and hybrid vine forms (*Vitis vinifera* L.). **Bulg. Journal Agricultural Science**, v.15, p.31–40, 2009.

RUMBOLZ, J.; et al. Sporulation of *Plasmopara viticola*: differentiation and light regulation. **Plant Biology**, v. 4, p.413-422, 2002.

STEVENSON, J.F.; et al. Grapevine susceptibility to Pierce's disease II, progression of anatomical symptoms. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 55, p. 238–245, 2004.

TEIXEIRA, G.; et al. Anatomia foliar de cultivares tintas de videira (*Vitis vinifera* L.). **Acta Horticulture**. v. 54, 2009.

UNGER, S., BÜCHE C., BOSO S., KASSEMAYER H.H. The course of the colonization of two different *Vitis* genotypes by *Plasmopara viticola* indicates compatible and incompatible host–pathogen interactions. **Phytopathology**, v.97, p. 781–786, 2007.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.; PIETERSE, C.M. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review Phytopathology** ,v. 36, p. 453-483, 1998.

VANDELLE, E.; et al. Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.19, p.429-440, 2006.

VERCESI A, A.; et al. A cytological and ultrastructural study on the maturation and germination of oospores of *Plasmopara viticola* from overwintering vine leaves. **Mycological Research**, v.103, p.193–202, 1999.

Capítulo III

Perfil protéico comparativo entre variedades resistente e suscetível de *Vitis sp.*, associado ao desenvolvimento do patógeno *Plasmopara viticola* (Berk. & M. A. Curtis) Berl. & de Toni

Resumo

O míldio da videira, causado por *Plasmopara viticola*, causa danos expressivos nas diversas regiões produtoras do mundo. No entanto pouco se sabe sobre as respostas moleculares associadas a interação planta-patógeno, dentre elas, as proteínas que são expressas após a infecção e colonização com o patógeno. Para analisar as mudanças do proteoma no tecido foliar de videira, foi comparado o perfil protéico, proteínas exclusivas, da var. suscetível Cabernet Sauvignon e var. resistente Bordô as 24, 48 e 96 horas após a inoculação (hai) com *P. viticola*. Plantas inoculadas com água destilada foram utilizadas como controle nos mesmos tempos citados. Utilizando uma combinação de eletroforese bidimensional (2-DE) associado ao nanoHPLC-ESI-MS/MS foram observadas as diferenças protéicas quantitativas e qualitativas nos diferentes tempos após a inoculação. Foram identificadas 44 proteínas exclusivas, sendo 33 da var. resistente e 10 da var. suscetível. As proteínas moduladas foram classificadas por categorias funcionais: metabolismo energético, resposta ao estresse, fotossíntese, metabolismo de proteínas e transporte. A ativação de resposta de defesa foi observada somente na var. Bordô com aumento constante na expressão das proteínas no decorrer dos tempos analisados principalmente as 96 hai e, de forma distinta da interação compatível, acredita-se que a crescente modulação das proteínas, principalmente daquelas relacionadas ao metabolismo energético, seja de grande importância para o processo de defesa da videira a esta moléstia.

Palavras chave- Proteômica, *Plasmopara viticola*, Cabernet Sauvignon e Bordô

Abstract: Grapevine Powdery Mildew, caused by *Plasmopara viticola*, is a disease of great importance, causing expressive damage in different producing regions around the world. However, little is known about the molecular responses associated to the plant-pathogen interaction and, among them, there are proteins that are expressed after infection and colonization with the pathogen. In order to analyze changes in the leaf tissue proteome of Grapevine, protein profiles at 24, 48 and 96 hours after infection with *P. viticola* were compared between a susceptible variety (Cabernet Sauvignon) and a resistant variety (Bordo). Plants inoculated with distilled water were used as control at the same time. The combination of bidimensional electrophoresis (2-DE) associated with nanoHPLC-ESI-MS/MS was used for the protein expression analyzes. Quantitative and qualitative differences were found in the protein analyzes for different time after infection. 44 exclusive proteins were found, 34 for the resistant variety and 10 for the susceptible variety. The modulated proteins were classified in different functional categories: energetic metabolism, stress response, photosynthesis, protein metabolism and transport. The activation of defense response was observed for the Bordo variety with a constant increase on protein expression over time, mainly at 96 hours after infection and, different from the compatible interaction, we believe that the increasing modulation of proteins, mainly those related to the energetic metabolism, is of great importance for the process of Grapevine defense against this disease.

Key words: Proteomics, *Plasmopara viticola*, Cabernet Sauvignon and Bordo

1. Introdução

Os fungos e oomicetos são agentes causais das mais sérias doenças de plantas de todo o mundo, sendo os únicos patógenos microbianos capazes de romper as superfícies intactas das plantas hospedeiras, estabelecendo rapidamente a infecção e acarretando em perdas significativas no rendimento da produção agrícola em grande escala (SOANES et al., 2007)

Do ponto de vista genético e de acordo com a hipótese de interação gene-a-gene, proposta por FLOR (1942), a resistência resulta da combinação do gene dominante de avirulência (Avr) do patógeno com o gene de resistência (R) do hospedeiro e os produtos da interação de ambos os genes conduz a ativação da resposta de defesa da planta (DE WIT et al., 2009). Assim, a interação fitopatogênica depende de um reconhecimento mútuo, tanto por parte do patógeno, quanto por parte do hospedeiro, com sinalização e expressão de fatores de virulência, que poderá resultar em interações compatíveis (sensibilidade) ou incompatíveis (resistência do hospedeiro).

Nos últimos anos, devido aos avanços na pesquisa nesta área e com a disponibilidade de genomas sequenciados, o interesse por estudos relacionados ao tema aumentou. No entanto, embora as informações das sequências gênicas apresentem grande relevância como ponto de partida, elas, por si só, não são suficientes para elucidar os mecanismos de resistência, tais como sinalização, rotas bioquímicas e funções dos genes de resistência (BHADAURIA et al., 2009).

Dentro das técnicas “ômicas”, a proteômica representa pesquisa prioritária para qualquer organismo e configura uma técnica fundamental na era pós-genômica. O estudo de proteomas em respostas de defesa a patógenos é um campo ainda pouco explorado. No entanto, a proteômica pode ser aplicada para elucidar os processos moleculares que ocorrem no reconhecimento de patógenos pelas plantas, durante o processo de infecção, e nas respostas de defesa da planta (KAV et al., 2007; KIM & KANG, 2008). A comparação de perfis proteômicos permite observar indução na expressão de genes pela presença de patógenos, auxiliando na identificação de grupos de proteínas específicas envolvidas na resistência de plantas aos patógenos (COLDITZ et al., 2007; KIM & KANG, 2008). Associado aos conhecimentos produzidos pela genômica, especialmente o sequenciamento de genomas de patógenos e de plantas, será possível, por exemplo, a caracterização de proteínas e genes Avr e elicitores, (COLDITZ et al., 2007). Tais resultados também poderão ser relacionados com a suscetibilidade ou resistência de plantas.

Assim, a proteômica se torna uma ferramenta robusta para desvendar mecanismos moleculares subjacentes às interações patógeno/hospedeiro. Mudanças no proteoma das plantas hospedeiras, resistente ou suscetível ao agente patogênico, podem ser rastreadas até a identificação de um único par de genes, isso, se essa interação planta/patógeno seguir o modelo gene-a-gene, que geralmente é válida para patógenos biotróficos. Esta abordagem também pode auxiliar a desvendar os mecanismos mais complexos subjacentes a ativação da resposta de defesa da planta, bem como pode ser empregada para decifrar processos moleculares que ocorrem durante o reconhecimento de patógenos por plantas (defesa basal), independentemente do resultado final da interação (KAV et al., 2007).

Para a videira (*Vitis vinifera*), uma frutífera com grande importância comercial e que se tornou um modelo biológico para espécies frutíferas, depois da conclusão do projeto de sequenciamento genômico (JAILLON et al., 2007; VELASCO et al., 2007), os dados de proteômica são ainda escassos (GIRIBALDI & GIUFFRIDA, 2010) e poucos estudos têm abordado as interações patógeno-hospedeiro (BASHA et al., 2009; MARGARIA & PALMANO, 2011).

A videira apresenta diversos patógenos que causam danos econômicos, dentre elas o míldio, cujo agente causal *Plasmopara viticola* (Berk e Curt.) Berl., é um patógeno devastador.

Nesse patossistema, o patógeno penetra nas folhas através dos estômatos e a subsequente colonização é realizada pelo crescimento dos micélios nos espaços intercelulares, com diferenciação de estruturas especializadas (haustório), que penetram nas paredes celulares das células do parênquima, criando um contato íntimo entre o patógeno e o hospedeiro. Dessa forma, acredita-se que essa estratégia nutricional especializada, típica de patógeno biotróficos, dependa de uma manipulação pelo patógeno no metabolismo das células hospedeiras, acarretando na supressão do mecanismo de defesa do hospedeiro (O'CONNELL & PANSTRUGA, 2006; HOK et al., 2010).

Já em espécies resistentes como *V. riparia*, *V. rupestris* e *V. rotundifolia* *Muscadinia*, fontes naturais de resistência ao míldio, estão disponíveis (COSTANTINI et al., 2009). Esta resistência engloba diversos mecanismos, tais como o fechamento de estômatos, o acúmulo de compostos fenólicos antimicrobianos e fitoalexinas, o aumento da atividade da peroxidase, o acúmulo de proteínas relacionadas à patogenicidade (PR) e, em alguns casos, o impedimento da colonização por indução de morte celular, um fenômeno conhecido como reação de hipersensibilidade (HR) (ALLEGRE et al., 2007; ALLEGRE et al., 2009).

Dessa forma, estudos sobre as variações no proteoma comparativo entre uma var. resistente e uma suscetível, contrapondo proteínas exclusivas entre as duas variedades, são relevantes para ajudar a identificar proteínas específicas e processos envolvidos no progresso ou não da infecção, particularmente aquelas cuja abundância é controlada em nível pós-transcricional.

Assim, no presente trabalho foi realizada uma análise proteômica comparativa de tecido foliar da variedade resistente Bordô (*V. labrusca*) e das variedades suscetíveis Cabernet Sauvignon (*V. vinifera*) em diferentes horas após a inoculação (hai) (24, 48 e 96) com *P. viticola*, para detecção de proteínas específicas e a elucidação dos mecanismos moleculares subjacentes à infecção e colonização, bem como, a evolução da expressão das proteínas que refletem o estabelecimento de uma interação compatível ou incompatível ao patógeno.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal e isolamento do patógeno

Empregou-se como material vegetal para as análises, tecido foliar de plantas de *V. vinifera* var. Cabernet Sauvignon e *V. labrusca* var. Bordô, suscetível e resistente ao *P. viticola*, respectivamente. As mudas foram produzidas no Viveiro Vivae San Michele (Rodeio-SC) e mantidas em vasos plásticos individuais (3L), contendo uma mistura de Plantmax®:areia (2:1, v/v) e cultivadas em casa de vegetação, sob luz natural, com fotoperíodo 16h:8h (claro:escuro), na Estação Experimental da EPAGRI de São Joaquim SC.

Esporos do patógeno foram coletados em áreas experimentais de videira na mesma estação experimental. O patógeno foi mantido em *V. vinifera* var. Cabernet Sauvignon em casa de vegetação e periodicamente a superfície abaxial das folhas jovens foi inoculada com suspensão contendo 2×10^4 esporângios/ml. Após 5-6 dias, em casa de vegetação, as plantas foram mantidas durante a noite em câmara úmida com elevada humidade relativa (HR>96%) para induzir a esporulação. Foram realizados 2 ciclos para purificação do patógeno. Esporângios formados foram embebidos em água destilada estéril para preparação das suspensões e subsequente inoculação nas plantas em estudo.

2.2. Inoculação do patógeno

Isolados de *P. viticola* recém-coletados foram ressuspensos em água destilada e estéril, em uma concentração de 5×10^4 esporângios/ml e pulverizados sobre as folhas tanto na superfície abaxial quanto adaxial, até iniciar o gotejamento. Em seguida, as plantas foram colocadas em câmara de inoculação com temperatura e umidade controlada (UR>96% a 24°C), durante toda a noite. Depois, as plantas foram alocadas em casa de vegetação. Nos tempos determinados, as folhas foram destacadas das plantas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Para as plantas controle, água destilada e estéril foi pulverizada nas folhas e essas foram mantidas nas mesmas condições das plantas infectadas. As coletas foram realizadas as 24, 48 e 96 horas após a inoculação (hai). Foram realizadas quatro replicatas biológicas.

2.3. Extração e solubilização das proteínas

A extração de proteínas totais das amostras de tecido foliar das videiras foi conduzida no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, CCA-UFSC, seguindo protocolo de extração fenólica proposto por Carpentier et al. (2005).

Amostras armazenadas a -80°C foram transferidas para um almofariz e maceradas com auxílio de pistilo após adição de nitrogênio líquido. O material macerado foi homogeneizado com 10 mL de tampão de extração de proteínas (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5; Sacarose 0,7 M; KCl 0,1 M; Tiouréia 10 mM; EDTA 5 mM; β -mercaptoetanol 2%; PMSF 1 mM) e mantida a 4°C.

A suspensão obtida foi transferida para tubo do tipo falcon de 50 mL, no qual foi acrescentado 10 mL de fenol saturado com Tris-HCl, pH 7,65 (Biorad). O frasco foi mantido sob agitação horizontal (30 minutos, 220 rpm, 4°C). Em seguida, a suspensão foi centrifugada (60 minutos, 10.000 g, 4°C) e a fase fenólica superior foi coletada cuidadosamente, evitando-se remoção de material no menisco. A essa fase adicionaram-se 10 mL de tampão de extração de proteínas e em seguida repetiram-se os procedimentos de agitação e centrifugação. A fase fenólica coletada foi transferida a tubo do tipo falcon de 50 mL ao qual foram adicionados cinco volumes de acetato de amônio 0,1 M em metanol a -20°C. Após misturar por inversão do tubo, a suspensão permaneceu por uma noite a -20°C. Em seguida, as proteínas foram

precipitadas por centrifugação (60 minutos, 10.000 rpm, 4°C) e transferidas para microtubos de 2 mL.

O pellet foi lavado três vezes com 2 mL de acetona e metanol (1:1), (cinco minutos, 10.000 rpm, 4° C). O pellet foi seco e concentrado por meio de vácuo e em seguida suspenso em tampão de solubilização (uréia 7 M; tiouréia 2 M; PMSF 2 mM; Pharymalyte® pH 3-10, 0,5%; Triton X-100, 2%) por meio de vórtex durante 4 horas a 20° C. A suspensão de proteínas foi armazenada a -20°C até os procedimentos seguintes de determinação de concentração de proteínas e eletroforese bidimensional.

Para a quantificação do teor de proteínas, 5 µL da suspensão de proteínas foram adicionados a 10 µL HCl 0,1 M e 85 µL de água e homogeneizados em 3,5 mL de reagente de Bradford, de acordo com o procedimento modificado de Bradford (1976) por Ramagli & Rodriguez (1985). Após 10 min em ambiente escuro, foi procedida, em espectrofotômetro, a leitura de absorbância (λ 595 nm) da solução. Os valores obtidos foram corrigidos para µg de proteínas 100 µL⁻¹, a partir da construção de curva de calibração com padrões protéicos de albumina de soro bovino.

2.4. D-PAGE da proteína total extraída

Volume da suspensão protéica relativo a 550 µg de proteínas foi homogeneizado com tampão de reidratação (uréia 7 M; tiouréia 2 M; Triton X-100 2%; CHAPS 2%; tampão IPG pH 3-10, 0,5%; azul de bromofenol 0,002%; DTT 1%) para um volume final de 250 µL e mantidos por uma noite a temperatura ambiente em reidratação com tiras de gel de 13 cm, gradiente de pH imobilizado e escala linear de separação para pH 3 a 10 (GE Healthcare, 17-6001-14). Para a primeira dimensão, a tira de gel reidratada foi submetida à focalização isoeletrica em uma unidade Ettan-IPGPhor (GE Healthcare) a 20 °C com corrente elétrica limitada a 50 mA por tira e ajuste de voltagem de 500 V a 500 Vh (grad), 1.000 V a 1000 Vh (grad), 1000 V a 3000 Vh (grad) e 5.000 V a 10.000 Vh (grad), 5000V a 35000Vh (grad). Com total aplicado de tempo x voltagem de 54 Vh. Em seguida a tira de gel foi reduzida por 20 minutos, sob leve agitação, em 5 mL de solução de equilíbrio (Tris-HCl 75mM pH 8,8; uréia 6 M; glicerol 30%; SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) contendo DTT 125 mM e em seguida, nas mesmas condições, foi alquilada em solução de equilíbrio contendo iodoacetamida 125 mM.

Para a segunda dimensão, a tira de gel foi transferida à superfície de gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (Tris-HCl 375 mM pH 8,8; acrilamida 12%; bis-acrilamida 0,32%; SDS 0,1%; persulfato de amônio 0,1%; TEMED 0,04%) e sob gel de agarose contendo azul de bromofenol 0,01%. A eletroforese foi realizada em cuba SE 600 Ruby (GE Healthcare) a 4°C, com solução-tampão contendo Tris 0,025 M glicina 0,2 M e SDS 0,1%, aplicando-se corrente elétrica na intensidade de 40 mA por gel, durante 3 minutos, 2 mA por gel durante 60 minutos, 20 mA por gel durante 60 minutos e 30mA por gel até a linha de azul de bromofenol atingir 1 mm da base inferior do gel. Em cada gel, marcadores de massa molecular com proteínas padrões entre 10 e 250 kDa (BioRad, 161-0363) foram submetidas à co-eletroforese.

As proteínas foram reveladas com o uso do corante azul de Coomassie (Coomassie G-250 1%; H3PO4 0,1 N; (NH4)2SO4 0,6 M; metanol 20%) durante 72 h, após incubação do gel por 12 h em solução de fixação (metanol 50%; ácido acético glacial 12%). Em seguida, o gel foi lavado em água destilada até retirada do excesso de corante, em Tris-H3PO4 0,1 M, pH 6,5 por três minutos, em metanol 25% por um minuto e (NH4)2SO4 20% por três minutos. O gel foi descorado com lavagem em água destilada por 96 horas e armazenado em (NH4)2SO4 20% a 4° C até digitalização.

A análise dos géis foi realizada por meio da digitalização em ImageScanner® (GE Healthcare) e ImageMaster® 2D Platinum v 7.0 (versão teste). Os peptídios, observáveis na forma de spots individuais no gel, foram agrupados de acordo com a localização no gel pela

aplicação do programa e em seguida por inspeção visual. Foi registrado o volume relativo de cada spot, em porcentagem do volume total de spots do gel correspondente, estratégia que permite tornar os resultados independentes de variações devido às diferenças no carregamento e na coloração das proteínas. O ponto isoeletrico (pI) e massa molecular (MM) dos spots foram calculados por meio do uso desse programa para computador.

2.5. Seqüenciamento dos peptídeos por nanoHPLC-ESI-MS/MS

Os spots selecionados foram excisados e enviados para a Universidade de Tromsø Plataforma Proteômica (Tromsø , Noruega) para processamento e análise. Estes foram submetidos a uma redução em gel, alquilação e digestão triptica usando 2-10 ng / mL de tripsina (V511A ; Promega) (Shevchenko et al., 1996). Misturas de peptídeos contendo 0,1% de ácido fórmico foram carregadas em nanoACQUITY UltraPerformance LC (Waters), contendo 5µm Symmetry coluna C18 (180 µm × 20 mm; Waters) acoplado a 1.7-µm BEH130 C18 coluna analítica (100 µm × 100 mm; Waters). Os peptídeos foram separados com um gradiente de 5-95 % de acetonitrila ,0,1% de ácido fórmico, há um fluxo de 0,4 mL / min eluído a um espectrômetro de massa Q - TOF Q-TOF (Micromass/Waters). As amostras foram executadas no modo de dados ms conjunto dependente. Listas de pico foram gerados a partir de MS / MS pelo software ProteinLynx global do servidor (versão 2.2; Waters). A identificação das proteínas foi realizada através de pesquisa no National Center for Biotechnology Information Non-redundant Database (NCBIInr), utilizando o programa Mascot (<http://matrixscience.com>). Os dados foram pesquisados pela primeira vez para os contaminantes no banco de dados NCBIInr versão 20130830 'todas as entradas' (32052081 seqüências; 11116435548 resíduos). Em seguida foi realizada a pesquisa contra o banco de dados NCBIInr, com restrição taxonômica para incluir apenas o Viridiplantae (plantas verdes) (1.496.044 seqüências). Foram adotados os seguintes parâmetros para pesquisas de banco de dados: carbamidomethylation completa de cisteínas e oxidação parcial de metioninas, tolerância massa peptídeo ± 100 ppm, tolerância massa fragmento ± 0,1 Da, ausência de clivagens um e nível limiar de significância (P < 0,05) para os escores Mascote (- 10 Log (P)). Apesar de alta pontuação obtida no Mascot, uma combinação de pesquisa de banco de dados automatizado e manual de interpretação de espectros de fragmentação peptídeo foi utilizado para validar as atribuições de proteína. Funções moleculares e componente celular de proteínas foram procurados em banco de dados KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). Distribuição de proteínas moduladas com identificações positivas foram realizadas de acordo com as funções biológicas atribuídas usando anotação GO (Gene Ontology). Quando nenhuma anotação GO estava disponível, as proteínas foram anotadas manualmente com base em pesquisas bibliográficas.

2.6 Análises estatísticas

O experimento foi composto por 48 géis, com 24 géis para a var. resistente e 24 géis para a var. suscetível, sendo quatro replicatas de cada tempo de tratamento (24 hai, 48 hai e 96 hai), perfazendo um total de doze géis para cada tratamento de inoculação (infectado e controle).

As principais fontes de variação no conjunto de dados do experimento 2-DE foram avaliadas por meio da análise dos componentes principais (PCA), utilizando distância euclidiana para análise quantitativa. A análise de PCA foi realizada através da análise das semelhanças de correlação entre as medidas observadas e o volume do spot foi analisado utilizando matriz de covariância (software XLSTAT versão 2013).

Os dados utilizados para realizar a análise de PCA foram volumes dos spots obtidos através da análise de imagens de géis 2 - DE e, a fim de evitar distorções na análise de PCA, todas as imagens dos géis analisados foram comparados contra uma única imagem de gel referência.

Para o experimento de gel 2 - DE, ANOVA foi utilizado para investigar diferenças nos níveis de proteínas individuais. Os cálculos foram baseados no volume dos spots normalizados em função da intensidade total de spots válidos em um único gel. Diferenças no nível de $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando Image Master 2D Platinum versão 7.0 (GE Healthcare) . Spots dentro de cada tratamento, com um elevado coeficiente de variação ($> 20\%$). foram excluídos da análise. Portanto, apenas spots consistentes para cada tratamento foram utilizados na análise.

3. Resultados

A variedade resistente Bordô (*V. labrusca*) e a variedade suscetível Cabernet Sauvignon (*V. vinifera*) foram desafiadas com *P. viticola*. A análise proteômica comparativa entre as variedades resistente e suscetível em resposta a infecção com o patógeno foi conduzida as 24, 48 e 96 horas após a infecção (hai). As proteínas totais foram extraídas de folhas coletadas de plantas infectadas com *P. viticola* e de folhas controle (tratadas com água destilada), totalizando doze tratamentos para cada variedade. O perfil protéico a partir da técnica de 2-DE foi determinado utilizando 550µg de proteínas para cada gel e as variações experimentais quantitativas foram evitadas pela exclusão de spots que não estavam presentes em pelo menos três géis dentro de cada grupo de amostras.

A média das proteínas totais dos tratamentos da var. Cabernet Sauvignon foi de $1,10 \pm 0,26$ mg.g⁻¹ de peso fresco. Para a var. Bordô esta média foi de $3,82 \pm 0,59$ mg.g⁻¹ de peso fresco. Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos dentro de cada variedade. No entanto, ao se comparar as duas variedades foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$), com a variedade resistente apresentando maior concentração de proteínas totais (Fig. 1 e Tab 1).

Uma média de 226 spots foram detectados na variedade suscetível ao patógeno e 260 na variedade resistente. Estes apresentaram um padrão semelhante entre as plantas inoculadas e controle nos diferentes tempos após a inoculação, em um intervalo de pH de 3-10 (13cm) (Fig. 3 e 4). Para o número de spots foram observadas diferenças estatísticas entre alguns tratamentos (Tab. 1). A principal diferença observada foi um aumento de spots de 48 para 96 hai nas plantas resistentes, o que não ocorreu com as plantas suscetíveis.

O padrão das proteínas para os diferentes tratamentos foi comparado por análises estatísticas multivariadas e univariadas. A análise dos componentes principais (PCA) foi utilizado para demonstrar semelhanças na quantidade de proteína entre os diferentes géis. Os três principais PCAs foram os mais significativos e representaram 31,3% da variação total do conjunto de dados (Fig.2). Como 31,3% da variação não representa um alto percentual da variação total, um cuidado deve ser tomado na interpretação dos resultados, porque outras fontes de variação podem estar presentes.

O primeiro componente principal (PC1) observado separou o tratamento 96 hai com *P. viticola*, variedade resistente, dos demais tratamentos, explicando 10,8% da variação total. O PC2, representando 10,5% da variação total determinou a separação entre os tempos 24 e 96 hai (controle) da var. resistente, enquanto que o PC3 separou 24 e 96 hai (controle) dos demais tratamentos também da variedade resistente, explicando 10% da variação total.(Fig 2 A e B). No entanto, essas variações (PC2 e PCA3) podem ser uma resposta da variabilidade biológica do material vegetal utilizado.

Nas plantas suscetíveis inoculadas ou não com o patógeno observou-se que o efeito tempo e infecção não foram determinantes, pois todos os tratamentos (24, 48 e 96) se agruparam, não apresentando uma resposta de defesa para as plantas infectadas com o patógeno em nenhum dos tempos analisados. Para as plantas resistentes o resultado mais expressivo foi à separação das plantas resistentes infectadas à 96h pelo patógeno dos demais tratamentos, incidindo sobre a resistência (tempo e infecção) essa clara separação (Fig.2).

Para as duas variedades selecionou-se um total de 44 spots exclusivos somente das plantas infectadas com o patógeno ($P < 0,05$) nos diferentes tempos de inoculação (24,48 e 96 hai). Doze géis, representando os 12 tratamentos evidenciando a presença de proteínas com alta resolução dos spots são apresentados na Fig. 5. Das 44 proteínas identificadas, 35 foram expressas nas plantas resistentes e nove foram expressas nas plantas suscetíveis, sendo que das 44 proteínas analisadas todas apresentaram homologia com proteínas de videira (Tab. 2)

As proteínas identificadas foram agrupadas de acordo com sua função biológica. A partir da classificação funcional das proteínas, realizado de acordo com o banco de dados Gene Ontology (GO), a maioria das proteínas identificadas, se enquadram em uma das seis principais categorias funcionais: (a) transporte, (b) metabolismo de proteínas (processos metabólicos), (c) estresse (percepção sensorial), (d) resistência (resposta a estímulos), (e) fotossíntese e (f) metabolismo energético (processos metabólicos). A categoria mais abundante foi a do metabolismo energético, representando uma proporção de 45,45% das proteínas identificadas, quando todos os tempos foram analisados em conjunto, seguida pela fotossíntese (15,90%), metabolismo de proteínas (13,63%), estresse e transporte (49,09% algo errado, mais frequente que metabolismo) e resistência (2,27%). De todos os tratamentos analisados, o maior número de proteínas específicas foi identificada em 96 hai na variedade resistente. (Fig.6).

A distribuição dessas categorias não seguiu um padrão constante no decorrer do tempo após a infecção com o patógeno. Para as plantas da var. Cabernet Sauvignon (suscetível), houve um decréscimo no número de proteínas no decorrer do tempo após a infecção para todos os grupos de proteínas identificadas. De forma oposta, as plantas da var. Bordô (resistentes) apresentaram um aumento expressivo no número de proteínas para quase todas as categorias, notadamente no tratamento 96 hai. Às 24 hai houve uma considerável homogeneidade entre todas as categorias de proteína. Entre as 48 e 96 hai houve um aumento progressivo do número de proteínas associadas predominantemente ao metabolismo energético.

Estes resultados estão de acordo com os dados do número de spots e análise de PCA. Já que foi observado um aumento do número de spots do tempo 48 para 96hai, bem como o PCA também separou o tempo 96hai dos demais tratamentos analisados, conferindo uma maior robustez aos resultados obtidos.

4. Discussão

Para obter uma melhor compreensão das respostas de defesa em tecidos foliares de variedades suscetível e resistente de videira ao patógeno *P. viticola*, foi realizada uma análise baseada em proteômica envolvendo 2 –DE. Essa análise é indicada por consistir em uma abordagem valiosa para desvendar mecanismos moleculares contra diferentes estresses, uma vez que proporciona a continuidade entre as informações das sequências genômicas com o perfil de proteínas, podendo indicar possíveis rotas celulares e bioquímicas envolvidas no mecanismo de defesa (MEHTA et al., 2008). A necessidade de tais investigações é particularmente evidente para a videira, já que essa apresenta inúmeros problemas fitossanitários causadores de prejuízos e danos econômicos, ambientais e à saúde humana.

No presente estudo identificaram-se proteínas que foram exclusivas na variedade resistente (Bordô) ou na variedade suscetível (Cabernet Sauvignon) quando infectadas com *P. viticola*. Essas proteínas, de uma forma geral, foram relacionadas com rotas metabólicas primárias e secundárias (por exemplo, cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, carbonic anhydrase, e malate dehydrogenase), proteínas antioxidantes relacionada ao estresse (glutathione S-transferase e L-ascorbate peroxidase T), metabolismo protéico (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) e proteínas relacionadas a patogênese (pathogenesis-related protein 10).

Identificou-se uma série de proteínas cloroplásticas envolvidas no metabolismo primário principalmente no proteoma da variedade resistente, entre elas a ferredoxin--NADP reductase (48 e 96 hai), carbonic anhydrase (96hai) e phosphoglycerate kinase (24hai). Dentre essas, a proteína Carbonic anhydrase desempenha um papel importante nas respostas de defesa das plantas. Resultados encontrados por SLAYMAKER et al. (2002) reforçam os resultados obtidos no presente trabalho, demonstrando que genótipo silenciado de *Nicotiana benthamiana* para essa enzima foi mais suscetível à infecção causada por *Phytophthora infestans*.

Da mesma forma a enzima Ribulose Carboxilase bifosfato (Rubisco) pertencente ao ciclo de Calvin também foi observada somente na variedade resistente, dentre elas a ribulose biphosphate carboxylase small chain e a ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit (96 hai) Resultados similares foram encontrados por MAHMOOD et al. (2006), em folhas de arroz infectadas com raças de *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (Xoo). O aumento na abundância de proteínas fotossintéticas predominantemente na variedade resistente [photosystem I reaction center subunit VI(48 hai), photosystem II stability/assembly factor HCF136 (96 hai) e PSI 9KDa] em nosso estudo sugere a indução do mecanismo de defesa, principalmente, por ser um processo de alto custo energético que requer uma taxa metabólica acelerada e um aumento da demanda por assimilados como já relatado em outros estudos (BERGER et al., 2007). Outra proteína envolvida no mecanismo fotossintético e que também está envolvida no mecanismo de defesa é a Putative Cytochrome C oxidase (96 hai, var. resistente). Esta é uma enzima terminal da cadeia respiratória, que oxida o citocromo c e transfere elétrons para o oxigênio com formação de molécula de água. Esta enzima é induzida por estresse salino, indicando o seu envolvimento em conferir tolerância ao estresse (YAN et al., 2005), bem como induz resistência a ferrugem em pinus como relatado por SMITH et al. (2006).

Espécies reativas a oxigênio (ROS), que incluem radical superóxido, peróxido de hidrogênio e oxigênio livre são moléculas produzidas como consequência do metabolismo celular normal das plantas (KOTCHONI 2004). Sob condições normais, ROS são rapidamente metabolizadas com a ajuda de enzimas antioxidantes constitutivas e outros metabolitos através de vias não enzimáticas, tais como vitaminas antioxidantes, proteínas e tióis não protéicos (KOVTON et al., 2000 ; LIM et al., 1993; SCANDALIOS et al., 1997) . No entanto, quando sujeitas a estresses tal como os patógenos, excessivas ROS são geradas. Esta acumulação excessiva de ROS necessita da ativação de outras defesas adicionais (DOKE, 1997;

SCANDALIOS et al., 1997), isto porque a menos que as ROS sejam eficientemente metabolizados, elas rapidamente irão oxidar e causar danos a lipídios, membranas celulares, proteínas e outros componentes celulares que levam conseqüentemente, a disfunção celular e, finalmente, a morte celular ou o aparecimento de lesões necróticas (DOKE 1997; FOYERE & NOCTOR, 2005).

Para isso, as plantas apresentam um conjunto de enzimas que agem no mecanismo de desintoxicação (ROIs), estando entre as principais as ascorbate glutathione cycle (ASADA & TAKAHASHI, 1987) superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), e catalase (ASADA, 1999; MITTLER, 2002; APEL & HIRT, 2004).

No presente estudo essas enzimas envolvidas na capturadas ROS foram moduladas somente na var. resistente (glutathione S-transferase 3 e L-ascorbate peroxidase T (96 hai). A glutathione S - transferase (GST) desempenha um papel de proteção celular e previne danos oxidativos. Além da defesa antioxidante, níveis elevados de GST também estimulam a transcrição de outros genes de defesa, incluindo aqueles que codificam: (a) síntese de chalcona (CHS) e que estão envolvidos com a produção de lignina (PAL) e fitoalexina (PAL , CHS); (b) parede celular rica em glicoproteínas, e (c) proteínas relacionadas à patogênese, tais como quitinase ou β - glucanase (GARA et al., 2003, EDWARDS et al.,1991; LOYAL et al., 2000). Já o ascorbato peroxidase é considerada uma enzima que detoxifica peróxidos usando ascorbato como substrato, com função principal de controlar a concentração de peróxido de hidrogênio nas células. Essa enzimas também foram observadas em estudos de proteômica com *Vitis vinifera L. cv. 'Nebbiolo'* infectado com fitoplasma *Flavescence doré* (MARGARIA & PALMANO, 2011).

Outras categorias de proteínas importantes no mecanismo de defesa são aquelas relacionadas ao metabolismo de proteínas. Estas incluem as peptyl-prolil cis-trans isomerases da família imunofilina (96 hpi). As Imunofilinas interagem com uma variedade de parceiros para facilitar o dobramento de proteínas e, assim, regular os processos de desenvolvimento, e alguns aspectos da resposta ao estresse e morte celular (KROMINA et al., 2008). Em *Arabidopsis*, um tipo FKBP foi necessário para a acumulação e a formação do supercomplexo do fotossistema II (LIMA et al., 2006). A sua modulação no período de 96 hai na variedade resistente se correlaciona com o aumento da fotossíntese, considerando-se que neste momento foram encontradas as proteínas relacionadas com esse mecanismo.

Um resultado pouco esperado nesse trabalho foi a modulação de somente uma proteína relacionada a patogênese (PR), presente na variedade suscetível 24 hai. No entanto, a PR-10 modulada nesse estudo também foi modulada em outra var. susceptível de videira (Pinot Noir) quando inoculada com *P. viticola*, com maior expressão às 96 hai (MILLI et al., 2012). A família de PR-10 representa a maior família de proteínas relacionada da patogênese. No entanto, o papel preciso dessas proteínas ainda é pouco claro e acredita-se que essa família de proteínas esteja envolvida em outros processos do desenvolvimento da planta e não somente na resposta de defesa (LIU & AKM, 2006). Isso explicaria no presente trabalho sua modulação no início da infecção (24 hai) na variedade suscetível. Em conformidade com nosso trabalho COLDITZ et al. (2003) também observou em *Medicago truncatula* infectada com o patógeno oomycete *Aphanomyces euteiches* , a abundância de proteínas PR - 10 claramente aumentada em uma variedade suscetível quando comparado com a resistente.

5. Conclusão

Neste estudo, comparou-se os perfis protéicos de folhas de videira da variedade resistente Bordô e da variedade suscetível Cabernet Sauvignon, submetidas à infecção do patógeno *P. viticola*. A comparação deste processo de infecção entre as variedades resultou na modulação de 44 proteínas, relacionadas principalmente com o metabolismo energético, fotossíntese e metabolismo de proteínas. Plantas suscetíveis inoculadas ou não com o patógeno não apresentaram nenhuma resposta de defesa durante os tempos analisados, com uma depressão no número de proteínas principalmente de 24 para 48 hai, sem subsequente aumento as 96 hai. Para a variedade Resistente, o número de proteínas moduladas foi expressivamente maior na comparação com a variedade suscetível, com aumento constante entre os tempos analisados, principalmente as 96 hai. Acredita-se que associado à tentativa de colonização do patógeno, o número de proteínas moduladas aumenta e verifica-se que muitas das proteínas relacionadas com a defesa são induzidas. Após 96 h, quando começaria a esporulação, o hospedeiro parece estar com o mecanismo de supressão em alta atividade para manter a supressão ao patógeno.

Nossa investigação proteômica revelou um aumento na expressão de proteínas, notadamente aquelas relacionadas ao metabolismo energético na var. resistente quando submetida ao patógeno, bem como aquelas relacionadas com as vias primárias e metabólicas, defesa antioxidante, metabolismo de proteínas, que coordenadas desempenham um papel significativo nas respostas de defesa contra o *P. viticola*. O aumento da atividade fotossintética auxiliaria na demanda do custo energético. O aumento dos níveis de enzimas poderia ser responsável pela captura de ROS nas plantas resistentes e presença de protetores celulares parece estimular a transcrição de várias fitoalexinas, que impedem a propagação do agente patogênico dentro do tecido do hospedeiro.

Por outro lado na var. suscetível Cabernet Sauvignon não foram observados processos biológicos relevantes associados à modulação destas proteínas. Assim de uma forma geral, estes dados fornecem uma visão mecanicista para a base molecular das interações compatível/incompatível entre videira e *P. viticola*.

Tabela 1. Número de proteínas totais e spots detectados nas diferentes amostras analisadas de folhas de videira das var. Cabernet Sauvignon (CS) e Bordô, com desvio padrão (DP) em quatro replicatas biológicas.

	HAI	Proteínas totais ¹ (mg.g ⁻¹ tecido fresco)		Número total de spots ²	
		CS	Bordô	C.S.	Bordô
Controle	24	0,97±0,35 ^a	4,07±0,09 ^l	271±23 ^{de}	
				356±11 ^a	
	48	1,12±0,28 ^a	3,75±1,35 ^b	336±8 ^{ab}	
Infectado				340±6 ^{ab}	
	96	1,40±0,18 ^a	3,88±0,65 ^b	183±13 ^f	
				298±45 ^{bc}	
	24	1,02±0,29 ^a	3,60±0,30 ^b	312±35 ^{ab}	
				285±31 ^{cd}	
	48	1,01±0,28 ^a	3,52±0,48 ^b	240±27 ^e	
			277±56 ^{cd}		
	96	1,12±0,20 ^a	4,14±0,71 ^b	204±17 ^f	
				324±26 ^{ab}	

¹ Médias da concentração de proteínas totais n=4 samples ± desvio padrão; ² Médias de spots de n = 4 geis ± desvio padrão.

Tabela 2. Proteínas exclusivas as 24, 48 e 96 horas após a infecção (HAI) das variedades de videira resistente (Bordô) e suscetível Cabernet Sauvignon (CS), infectadas com *P. viticola* e identificadas por análise de 2-DE/MSMS. As proteínas foram classificadas em categorias funcionais com base no banco de dados Gene Ontology. Categorias adicionais foram incluídas quando necessário. A tabela também informa o número match (ID), número de acesso e nome da proteína, juntamente com o número de peptídeos identificados, pontuação no Mascote e ponto isoelétrico e massa molecular experimental e teórico

Var	mach ID	Accession number	Mascot Score	Peptide match	Protein name	Sequence coverage	Theo MW	Theo r PI	Exp PI	Exp MW	Celullar components	biological process
24 HAI												
Bor.	136	gi 22797822	253	6	ATP synthase epsilon subunit [<i>Vitis vinifera</i>]	44%	13	6.51	5.62	16	cloroplastos tilacoides	Transporte
Bor.	174	gi 225464995	1170	30	phosphoglycerate kinase, chloroplastic isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	48%	50	8.26	5.66	38	cloroplastos	Metabolismo energético
Bor.	154	gi 373431037	426	11	plastid lipid-associated protein [<i>Vitis pseudoreticulata</i>]	29%	34	7.77	4.32	24	cloroplastos	Metabolismo de proteínas
CS	222	gi 163914213	196	4	pathogenesis-related protein 10 [Vitis hybrid cultivar]	22%	17	5.95	7.38	10	regiões extracelulares	Resistencia
CS	230	gi 225461287	334	8	cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplastic isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	31%	24	8.52	5.35	14	cloroplastos	Metabolismo energético
CS	244	gi 225424944	220	3	salt stress root protein RS1 isoform 3 [<i>Vitis vinifera</i>]	23%	20	4.83	4.88	20	membrana	Estresse
CS	277	gi 526117711	551	14	malate dehydrogenase [<i>Vitis vinifera</i>]	46%	36	8.79	7.10	30		Metabolismo energético
CS	286	gi 169791660	348	11	Chain A, Crystal Structure Of Grenache (<i>Vitis vinifera</i>) Polyphenol Oxidase	24%	38	5.55	6.57	19	cloroplastos	Estresse
CS	297	gi 225433424	428	7	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	16	48	6.95	7.16	38	peroxissoma	Metabolismo energético
48 HAI												
Bor.	116	gi 139389695	163	3	PSI 9KDa protein (<i>Arabidopsis</i>)	46%	89	6.67	6.11	10	cloroplasto plastideo	Fotossíntese

Bor.	163	gi 225431122	537	16	ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	29%	40	8.91	7.35	28	cloroplastos	Metabolismo energético
Bor.	166	gi 225431123	472	11	ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	28%	40	8.92	7.02	30	cloroplastos	Metabolismo energético
Bor.	182	gi 225427112	384	15	probable plastid-lipid-associated protein 3, chloroplastic-like [<i>Vitis vinifera</i>]	30%	40	4.40	3.60	36	cloroplastos	Metabolismo de proteínas
Bor.	131	gi 225461287	142	4	cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplastic isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	16%	24	8.52	4.54	17	cloroplastos	Metabolismo energético (fotossíntese)
Bor.	221	gi 147787229	527	11	hypothetical protein VITISV_012048 [<i>Vitis vinifera</i>]	38%	30	4.85	4.13	27		Desconhecido
Bor.	149	gi 297744661	853	25	triosephosphate isomerase, chloroplastic-like isoform 2 [<i>Vitis vinifera</i>]	62%	27	5.50	6.34	24	cloroplastos	Metabolismo energético
Bor.	150	gi 297744661	725	21	triosephosphate isomerase, chloroplastic-like isoform 2 [<i>Vitis vinifera</i>]	60%	27	5,5	5.72	24	cloroplastos	Metabolismo energético
CS	242	gi 225436005	148	4	zeaxanthin epoxidase, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	19%	22	8.33	7.23	13	cloroplastos	Metabolismo energético
CS	250	gi 109892850	76	3	Putative cytochrome c oxidase subunit II PS17	100%	17	9.62	4.41	17	desconhecido	Desconhecido
CS	263	gi 297745219	921	19	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	49%	32	4.95	4.53	25		Metabolismo de proteínas
96 HAI												
Bor.	109	gi 297735202	105	3	probable Xaa-Pro aminopeptidase P [<i>Vitis vinifera</i>]	6%	71	5.21	5.32	85		Transporte

Bor.	114	gi 225442607	224	11	photosystem I reaction center subunit VI, chloroplastic isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	33%	15	9.84	8.85	11	cloroplastos	Fotossíntese
Bor.	131	gi 225442607	224	11	photosystem I reaction center subunit VI, chloroplastic isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	33%	15	9.84	5.96	15	cloroplastos	Fotossíntese
Bor.	132	gi 225433217	166	5	cyanate hydratase [<i>Vitis vinifera</i>]	41%	18	9.85	6.16	15	citosol	Estresse
Bor.	133	gi 22797822	101	2	ATP synthase epsilon subunit [<i>Vitis vinifera</i>]	20%	13	6.51	5.74	15	cloroplastos tilacoide	Transporte
Bor.	136	gi 6014904	75	4	Full=DAG protein, chloroplastic; Flags: Precursor	10%	25	8.76	7.63	17	cloroplastos	
Bor.	139	gi 296087457	274	9	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	29%	30	8.35	4.94	17	mitocondria	Metabolismo energetic0
Bor.		gi 225448061	568	9	probable plastid-lipid-associated protein 4, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	44%	22	9.18	7.21	20	cloroplastos	Metabolismo de proteínas1
Bor.	143	gi 225460496	436	11	ATP synthase delta chain, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	41%	26	8.85	5.26	19	cloroplastos	Metabolismo energetico
Bor.	158	gi 225452452	627	24	carbonic anhydrase, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	40%	32	8,06	6.44	25	cloroplastos	Metabolismo energetico
Bor.	159	gi 147821410	204	6	hypothetical protein VITISV_011680 [<i>Vitis vinifera</i>] (ferredoxin reductase)	19%	38	9.17	7.63	26	cloroplastos	Metabolismo energetico
Bor.	164	gi 225456268	307	6	adenylate kinase B [<i>Vitis vinifera</i>]	27%	27	7.01	7.33	28	membrana da mitocondria	Metabolismo energetico
Bor.	165	gi 526118279	356	10	glutathione S-transferase 3 [<i>Vitis vinifera</i>]	36%	25	5.79	6.01	25		Estress
Bor.	180	gi 225459591	382	8	L-ascorbate peroxidase T, chloroplastic-like isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	19%	47	7.10	5.33	31	cloroplastos	Estresse
Bor.	189	gi 225444525	286	7	ATP synthase gamma chain, chloroplastic-like isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	16%	41	5.95	5.09	34	cloroplastos	Metabolismo energetico (fotossintese)

Bor.	191	gi 225423755	380	6	photosystem II stability/assembly factor HCF136, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	17%	44	6.92	4.56	34	cloroplastos	Fotosintese
Bor.	197	gi 296080867	344	6	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	26%	35	5.94	5.25	36		
Bor.	198	gi 296080867	436	10	unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>]	30%	35	5.94	5.41	36		
Bor.	252	gi 359475042	437	12	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [<i>Vitis vinifera</i>]	44%	18	7.68	4.72	15	citoplasma	Metabolismo de proteínas
Bor.	117	gi 225460496	286	8	ATP synthase delta chain, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	22%	26	8.85	4.14	12	cloroplastos	Metabolismo energetico
Bor.	249	gi 147804799	142	2	hypothetical protein VITISV_038998 [<i>Vitis vinifera</i>]	25%	20	5,29	3.97	12	cloroplastos	Metabolismo energético fotosintese
Bor.	118	gi 86156014	451	43	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit [<i>Vitis pseudoreticulata</i>]	46%	20	9,06	7.41	13	cloroplastos	Metabolismo energetico
Bor.	4	gi 225455934	541	48	ribulose bisphosphate carboxylase small chain, chloroplastic isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	55%	20	9.11	8.12	11	cloroplastos	Metabolismo energetico
Bor.	179	gi 359492254	506	15	ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplastic-like [<i>Vitis vinifera</i>]	32%	40	8.90	7.12	30	cloroplastos	Metabolismo energetico

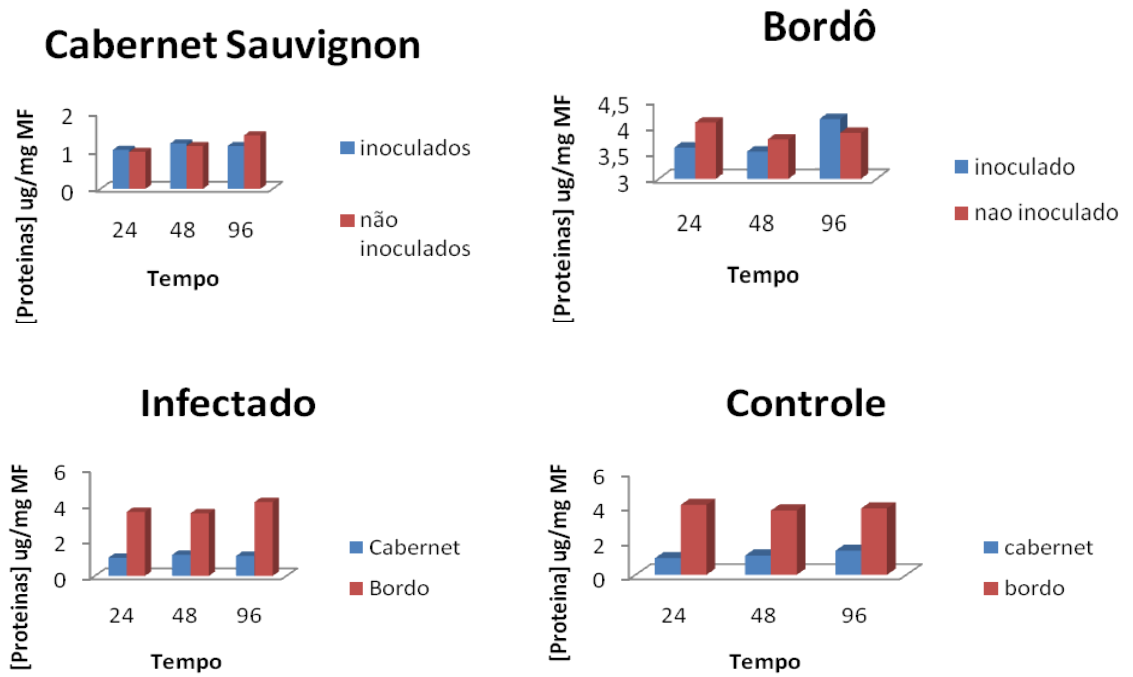


Figura 1. Teores de proteínas totais obtidos a partir de extração fenólica de amostras foliares das variedades de videira Cabernet Sauvignon e Bordô submetidas à inoculação com *Plasmopara viticola* e controle (sem inoculação). Avaliações foram realizadas 24, 48 e 96 horas após a inoculação do patógeno (HAI).

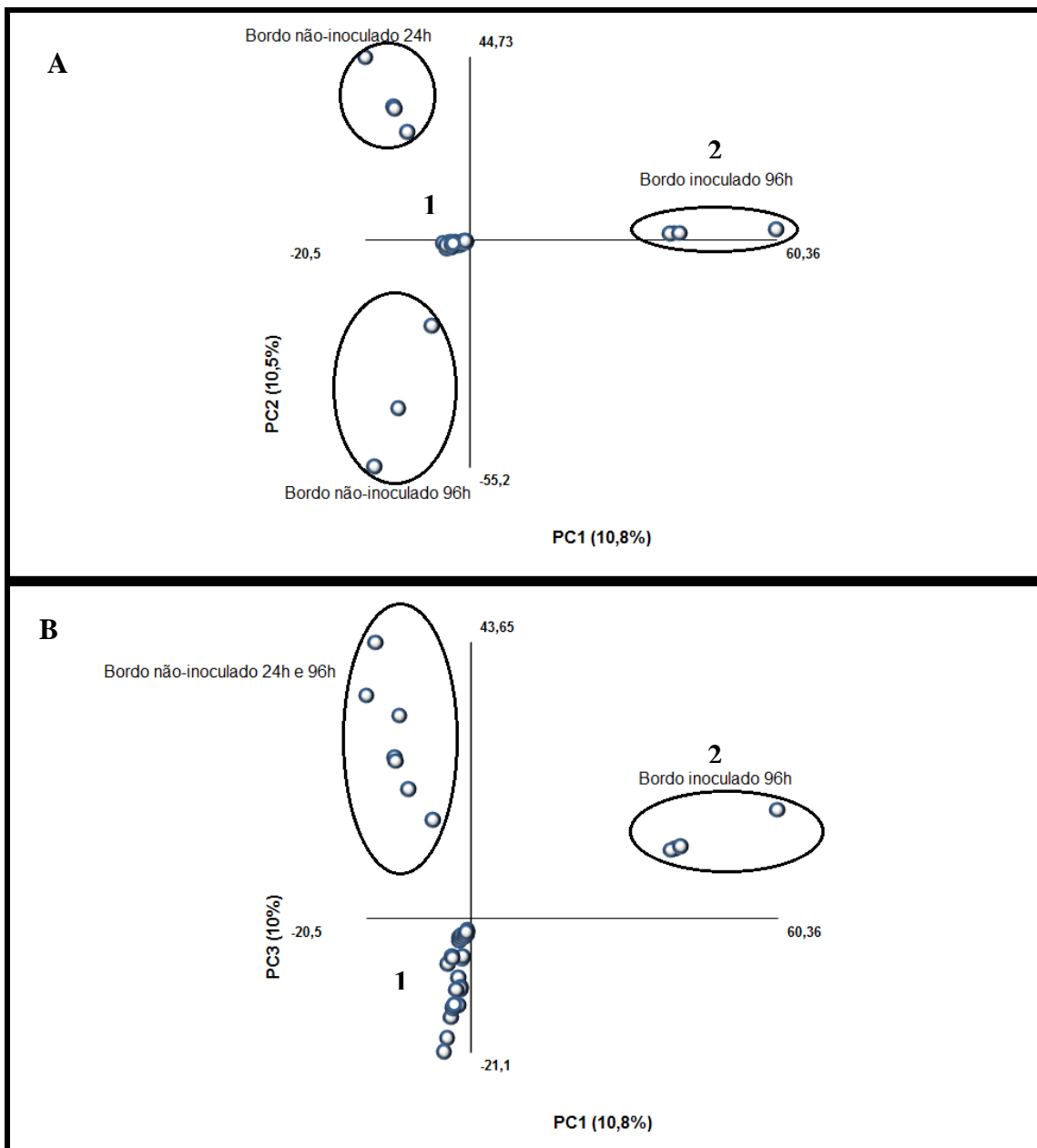


Figure 2. - Análise dos componentes principais (PCA) de videiras, var. resistente (Bordô) e suscetível (Cabernet Sauvignon), submetidas ao *P. viticola* as 24, 48 e 96 horas após a infecção.(hai). Os componentes principais PC1, PC2 e PC3 foram 10,8%, 10,5% e 10%, respectivamente. O gráfico de dispersão PCA agrupou os 48 mapas individuais distintamente. As plantas da var. suscetível Cabernet Sauvignon, tanto no controle, quanto inoculadas com *P. viticola*, ficaram agrupadas (1). A principal variação foi a separação da variedade resistente Bordô (96 hai) (2) dos demais tratamentos.

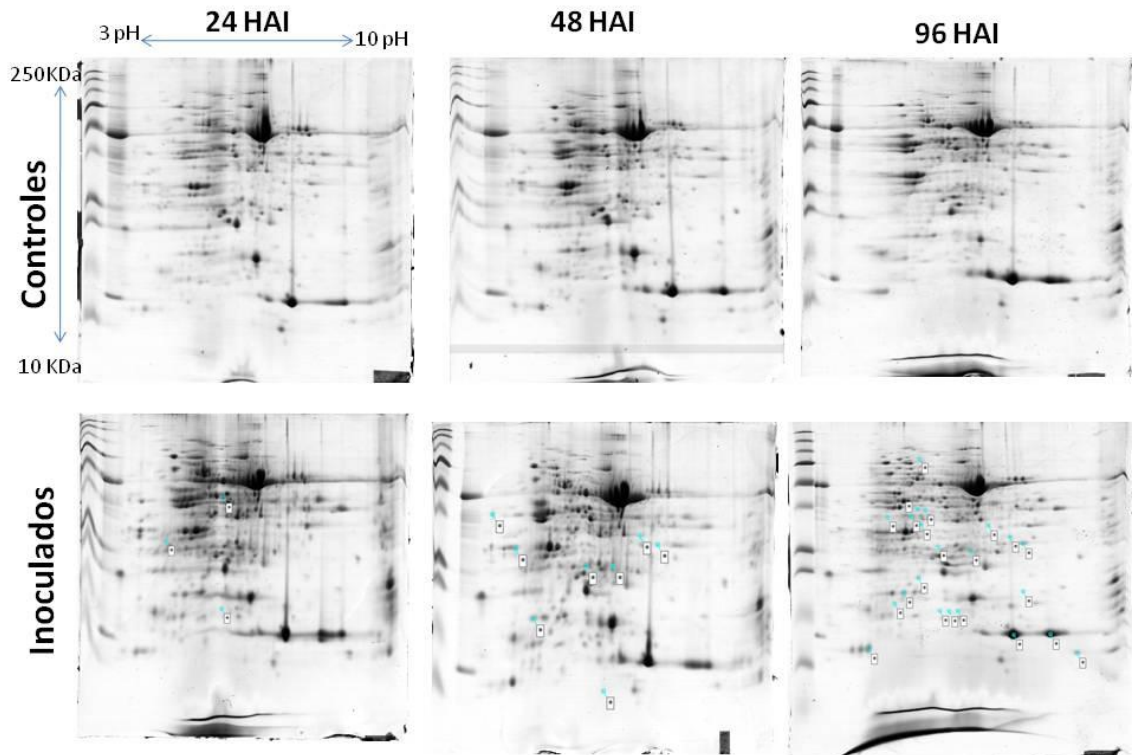


Figura 3- Géis 2-D de proteínas extraídas de folhas da videira var. Bordô, infectadas ou não com *Plasmopara viticola* e coletadas nos tempos 24, 48 e 96 horas após a infecção (HAI). Proteínas foram focalizadas em strips IPG com pH 3-10 (13 cm) e separadas por SDS-PAGE (12%). Géis foram corados com comassie Blue.

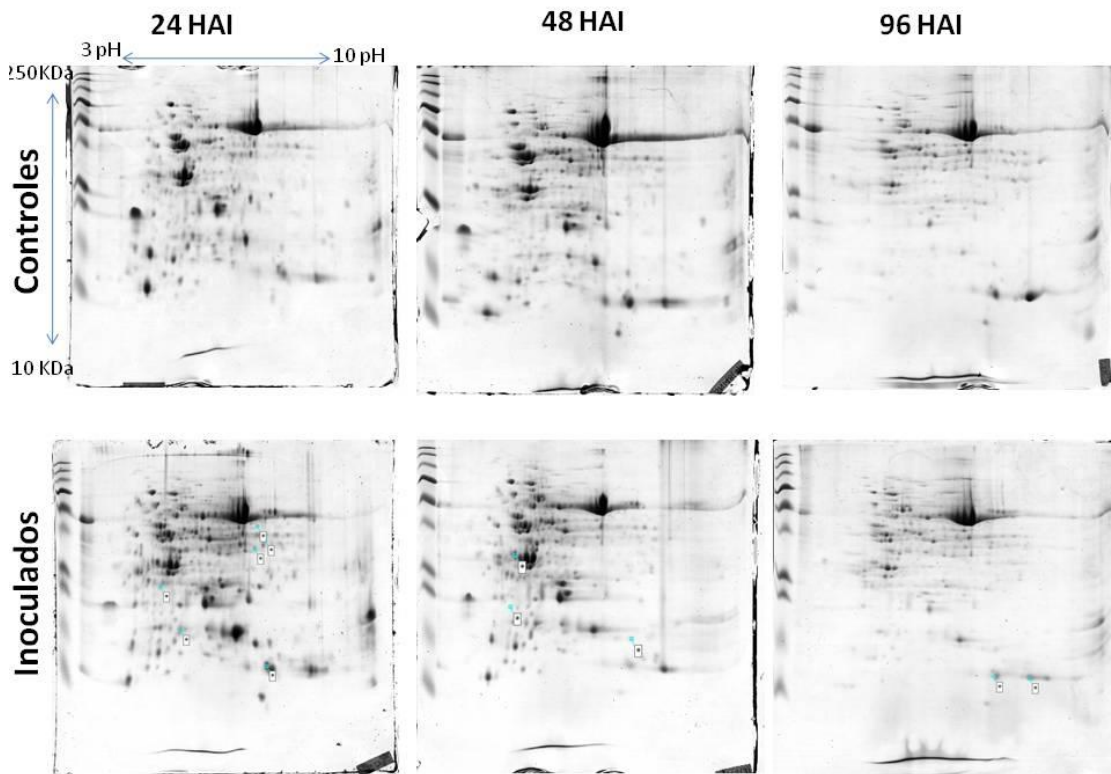


Figura 4- Geis 2-D de proteínas extraídas de folhas da videira var. Cabernet Sauvignon, infectadas ou não com *Plasmopara viticola* e coletadas nos tempos 24, 48 e 96 horas após a infecção (HAI). Proteínas foram focalizadas em strips IPG com pH 3-10 (13 cm) e separadas por SDS-PAGE (12%). Geis foram corados com comassie Blue.

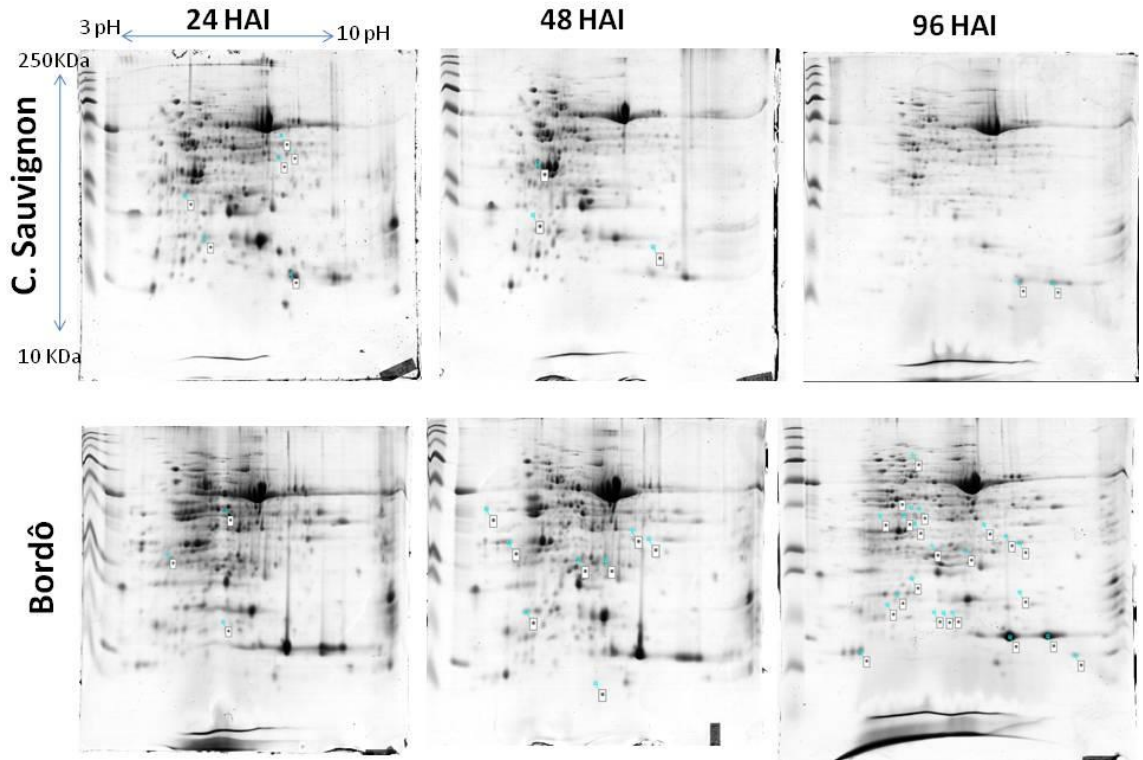


Figura 5. Teores de proteínas totais obtidos a partir de extração fenólica de amostras foliares de videira var. Cabernet Sauvignon e Bordô, submetidas à inoculação com *Plasmopara viticola*. Avaliações foram realizadas no momento da inoculação 24, 48 e 96 horas após a inoculação do patógeno (hai).

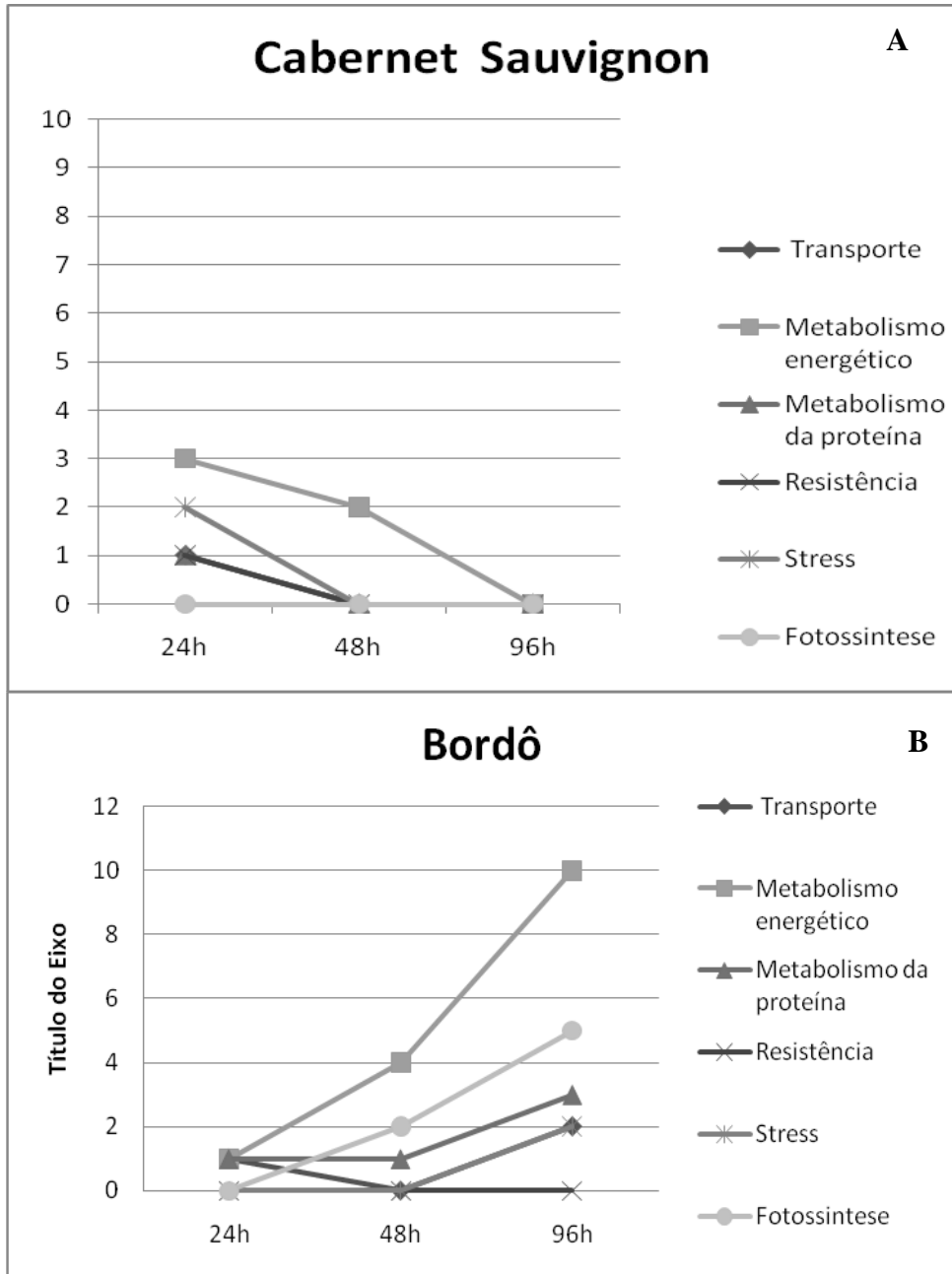


Figure 6. Distribuição de proteínas moduladas de videiras identificadas de acordo com as funções biológica usando GO (Gene Ontology). Quando nenhuma anotação GO (Gene Ontology) estava disponível, as proteínas foram anotadas manualmente com base na literatura. Resultados das proteínas para amostras infectadas das variedades suscetíveis e resistentes foram apresentados em gráficos separados, figura 6A e 6B, respectivamente

6. Referências Bibliográficas

- ALLEGRE, M.; et al. Are grapevine stomata involved in the elicitor-induced protection against downy mildew? **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 22, p. 977–86, 2009.
- ALLEGRE, M.; et al. Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. **New Phytology**, v.173, p. 832–40, 2007.
- ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G.;PEARSON, T. W . A human proteome detection and quantitation project. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 8(5), p. 883–886, 2009.
- BASHA, S.M.; MAZHAR, H.; VASANTHAIAH, H.K. Proteomics approach to identify unique xylem sap proteins in Pierce's disease-tolerant *Vitis* species. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 932–44, 2009.
- BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 4019– 4026, 2007.
- BHADAURIA, V.; et al. Reverse genetics for functional genomics of phytopathogenic fungi and oomycetes. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2009, Article ID 380719, 11 paginas, 2009.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 1-2, n. 248-254, 1976.
- BRUGGEMAN F.J.; WESTERHOFF, H. V. The nature of systems biology. **Trends in Microbiology**, v. 15(1), p. 45–50, 2007.
- COLDITZ, F.; KRAJINSKI, F.; NIEHAUS, K. Plant proteomics upon fungal attack. In: ŠAMAJ, J.; THELEN, J. (Ed.). **Plant proteomics**, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 283-309, 2007.
- COSTANTINI, L.; et al. Molecular maps, QTL mapping & association mapping in grapevine. In: ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A., (Ed.). **Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology**. 2 ed. Netherlands: Springer, p. 535–63, 2009.
- DE WIT, P. J.; MEHRABI, R.; VAN DEN BURG, H. A.; AND I. Stergiopoulos, Fungal effector proteins: past, present and future. **Molecular Plant Pathology**, v. 10(6), p. 735– 747, 2009.
- DOKE, N. The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress; in **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses** (ed.) J G Scandalios (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) p 785–813,1997
- EDWARDS, R.; BLOUNT, J. W.; DIXON, R. A. Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures. **Planta**, v. 184, p. 403–409, 1991.
- FIGEYS, D.; et al. Mass spectrometry for the study of protein–protein interactions. **Methods**, v.24, p. 230–239, 2001.

FLOR, H.H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. **Phytopathology**, v. 32, p. 653–669, 1942.

FOYER, C. H. & NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell** v.17, p.1866–1875, 2005

GARA, L. D.; DE PINTO, M. C.; TOMMASI, F. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 863–870, 2003.

GIRIBALDI, M.; GIUFFRIDA, M.G. Heard it through the grapevine: proteomic perspective on grape and wine. **Journal Proteomics**, v. 73, p.1647–55, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford, UK: Clarendon, 2 ed, 1989.

HOK, S.; ATTARD, A.; KELLER, H. Getting the most from the host: how pathogens force plants to cooperate in disease. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 23, p.1253–9, 2010.

JAILLON, O.; et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. **Nature**, v.7, p. 449:463, 2007.

KAV, N. N. V.; et al. Application of proteomics to investigate plant-microbe interactions. **Current Proteomics**, Sharjah, v. 4, n. 1, p. 28-43, 2007.

KIM, S. T.; KANG, K. Y. Proteomics in plant defense response. In: AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R. (Ed.). **Plant proteomics: technologies, strategies, and applications**. New Jersey: John Wiley & Sons, p. 587-604, 2008.

KOTCHONI, O S, KUHNS C, DITZER A, KIRCH H-H AND BARTELS D Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress; **Plant Cell Environment**. v.29,p.1033–1048,.2006

KOTCHONI, O. S. 2004 **Molecular and physiological characterization of transgenic Arabidopsis plants expressing different aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes**, Ph.D. thesis, University of Bonn, Germany

LIM Y S, CHA M -K, KIM H K, UHM T B, PARK J W, KIM K AND KIM I H Removal of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role *in vitro*; **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.192,p. 273–280,1993.

LIU, J. J.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 68, p. 3–13, 2006.

LOYALL, L.; et al. Glutathione and a UV light–induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. **Plant Cell**, v. 12, p. 1939–1950, 2000.

MAHMOOD, T. Proteomic analysis of bacterial-blight defense responsive proteins in rice leaf blades. **Proteomics**, v. 6, p. 6053-6065, 2006.

- MARGARIA, P.; PALMANO, S. Response of the *Vitis vinifera* L. cv. 'Nebbiolo' proteome to Flavescence doree phytoplasma infection. **Proteomics**, v. 11, p.212–24, 2011.
- MEHTA, A.; et al. Plant-pathogen interaction: what is proteomics telling us? **FEBS J**, v. 275, p. 3731– 3746, 2008.
- MILLI, A.; et al. Proteomic analysis of the compatible interaction between *Vitis vinifera* and *Plasmopara viticola*. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 1 2 8 4 – 1 3 0 2, 2012.
- O'CONNELL, R.J.; PANSTRUGA, R. Tete a tete inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. **New Phytology**, v.171, p. 699–718, 2006.
- PEREZ-GARCIA, A.; MINGORANCE, E.; RIVERA, M.E. Longterm preservation of *Podosphaera fusca* using silica gel. **Journal of Phytopathology**, v. 154(3), p. 190–192, 2006.
- PICOTTI, P.; BODENMILLER, B.; MUELLER, L. N.; DOMON, B.; AEBERSOLD, R. Full dynamic range proteome analysis of *S. cerevisiae* by targeted proteomics. **Cell**, v. 138, (4), p.795–806, 2009.
- RAMAGLI, L. S.; RODRIGUEZ, L. V. Quantification of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. **Electrophoresis, Weinheim**, v. 6, n. 11, p. 559–563, 1985.
- SCANDALIOS J G, GUAN L AND POLIDOROS A N Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression; in **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses** (ed.) J G Scandalios (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) p 343–406, 1997.
- SMITH, J. A.; et al. Proteomic comparison of needles from blister rust-resistant and susceptible *Pinus strobus* seedlings reveals up-regulation of putative disease resistance proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 150–60, 2006.
- SOANES, D. M., RICHARDS, T. A., & TALBOT, N. J. Insights from sequencing fungal and oomycete genomes: what can we learn about plant disease and the evolution of pathogenicity? **Plant Cell**, v.19, p.3318–3326, 2007.
- TAN, K.-C.; et al. Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 10(5), p. 703–715, 2009.
- VELASCO, R.; et al. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. **PLoS One**, v. 2, p.1326, 2007.
- YAN, S.; TANG, Z.; SU, W.; SUN, W. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. **Proteomics**, v. 5 .p. 235-244, 2005.
- ZHAO J.; et al. Patterns of differential gene expression in *Brassica napus* cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, p. 635–649, 2009.

Este manuscrito segue a formatação do periódico Journal of Proteomics.

Capitulo IV

Proteomic analysis of the response of grapevine breeding lines containing the resistance loci *Rpv1* and *Rpv3* pyramided to *Plasmopara viticola* infection

Proteomic analysis of the response of grapevine breeding lines containing the resistance loci *Rpv1* and *Rpv3* pyramided to *Plasmopara viticola* infection

Maria Carolina Andrade Nascimento-Gavioli¹, Sarah Zanon Agapito -Tenfen¹², Rubens Onofre Nodari¹, Leocir José Welter³, Miguel Pedro Guerra^{1*}

¹CropScience Department, Federal University of Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga 1346, Florianópolis 88034-000, Brazil. Phone: +55 48 37215336, Fax +55 48 37215335.

²Genøk, Center for Biosafety. The Science Park P.O. Box 6418 Tromsø 9294, Norway. Phone: +47 77 646620, Fax: +47 77 646100.

³ Federal University of Santa Catarina, Curitibanos Campus. Rod. Ulysses Gaboardi, Km 3, Curitibanos 89520-000, Brazil. Phone: + 55 48 37214171.

*Corresponding author: mpguerra@cca.ufsc.br

Co-authors email addresses: marcarolan@hotmail.com, sarahagro@gmail.com, rubens.nodari@ufsc.br, leocir.welter@ufsc.br.

Abstract

The grapevine (*Vitis vinifera*) is one of the most widely cultivated fruit crop in the world with great socio-economic importance. *V. vinifera* varieties are susceptible to a large number of diseases, among them downy mildew, caused by the obligatory biotrophic oomycete *Plasmopara viticola*, which is widespread in all cultivated regions causing significant damage. Little is known about the molecular basis of this disease, such as the proteins that are expressed after the pathogen infection. In order to analyze the changes in the proteome of grapevine leaf tissue, we have used to breeding lines containing the resistance loci to *P. viticola* *Rpv1* and *Rpv3* pyramided. Following inoculation, samples were collected at 24, 48 and 96 hours post infection (hpi). Quantitative and qualitative differences at different time-points after inoculation were observed using two-dimensional electrophoresis coupled to nanoHPLC-ESI-MS/MS analysis. We identified 41 unique grapevine proteins differentially expressed after infection. Up-regulated proteins were often included in the functional categories of energy metabolism, protein metabolism, stress response and resistance response. Resistance-related proteins were present only at later stage. The activation of a defense reaction by an increase of protein expression was observed more often at 48 hpi time-point, which is consistent with the establishment of the incompatible interaction to *P. viticola*. Differently from compatible interaction, this profile suggests the lack of a transient breakdown in defense responses accompanying the onset of disease due to a burst of energy metabolism proteins started at 48 hpi and maintained at 96 hpi. Our results revealed the complex modulation of grapevine metabolism during incompatible interactions, and provided insight into the underlying molecular resistance processes, which may yield novel strategies for pathogen control in the field.

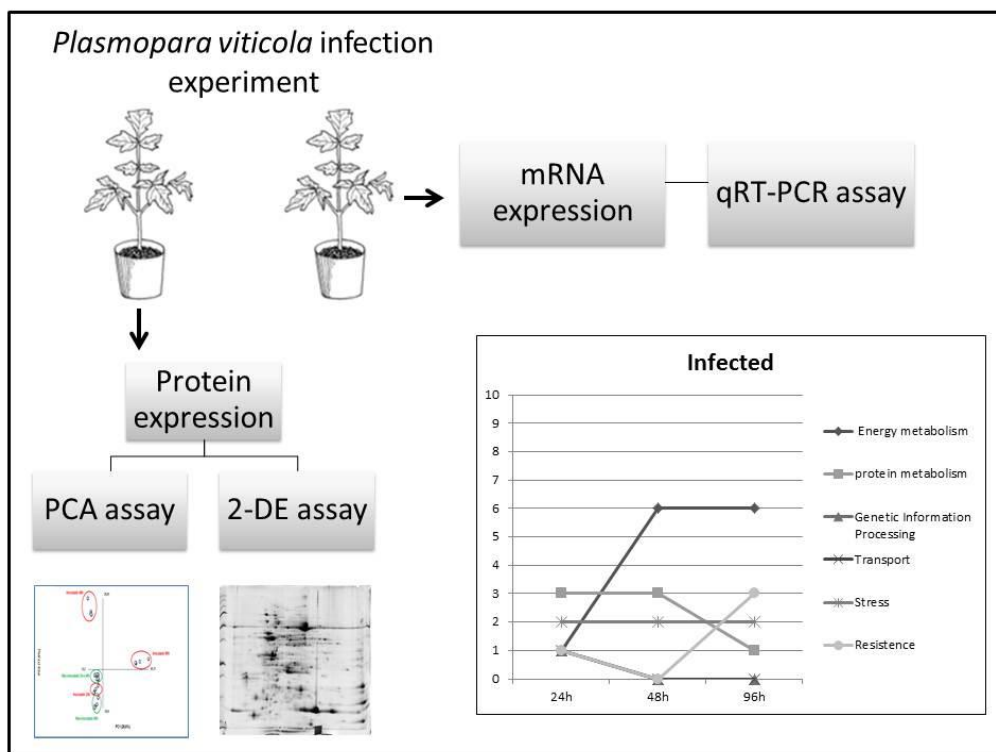
"Significance" paragraph after the Abstract

Our investigation focused on the molecular basis of the incompatible interaction between an two breeding lines of grapevine containing two resistant loci and *P. viticola*. The proteomic data obtained support the hypothesis that a difference on protein modulation at 48 hpi seems to play an important role in grapevine defense to *P. viticola*. Both hypothesis-driven approach and our multivariate analysis show that this incompatible interaction is first characterized by a burst of proteins related to the energy metabolism at 48 hpi; thus leading to the synthesis of classic defense-related proteins and enzymes involved in the of secondary metabolites later at 96 hpi. Our results are in agreement with other studies on susceptible genotypes which have reported biphasic defense responses to infection, wounding, or elicitors treatment, with a transient mid-phase decline in mRNA and/or protein abundance.

Keywords

Proteome, Downy mildew, Grapevine, Defense response, Incompatible interaction, Oomycete.

Graphical Abstract



Highlights bullets

- Breeding lines of grapevine were obtained by pyramiding two resistance loci to *P. viticola*;
- The proteome of two grapevine breeding lines containing pyramided resistance loci were investigated early after infection with *P. viticola*;
- Infected plants showed different proteome pattern at 48 and 96 hpi;
- No biphasic behavior was observed in infected plants during the period of the experiment;
- There was a burst of proteins related to energy metabolism at 48 hpi;
- Proteins related to defense metabolism were up-regulated at 96 hpi;
- Stress-related proteins were present in all time-points.

1. Introduction

The grapevine (*Vitis vinifera*), a major fruit crop in the world, normally requires intensive phytochemical protection due to susceptibility to numerous pests and diseases. High economic costs and negative environmental impact resulting from these applications has led to an increasing interest for the development of alternative strategies, including new antifungal molecules, elicitor-induced resistance and resistant genotypes (Chong *et al.*, 2008).

One of the pathogens of major importance in grapevine is *Plasmopara viticola* (Berk and Curt.) Berl. and de Toni, also known as downy mildew. Since long time ago, this disease has become a major problem worldwide causing extensive losses by means of leaf, inflorescences and bunches infection (Muller & Sleumer, 1934). At optimal conditions, such as high humidity and temperature, it rapidly spread over large areas within a very short period of time, causing serious epidemics and becoming a serious threat to viticulture production.

The biological cycle of downy mildew comprises an asexual multiplication stage, which occurs during the growing season and a sexual phase that ensures the survival of the pathogen during winter. The downy mildew agent performs its life cycle essentially inside the leaves; the beginning of the infection is not detectable and the disease is often recognized because of typical oil spots that appear late in the infection process (Unger *et al.*, 2007). Notwithstanding, *P. viticola* has complex interactions with environmental factors, such as temperature and relative humidity. Therefore, the relevance and usefulness of the latter strategies require detailed knowledge on the grapevine genotype-downy mildew pathosystem.

Mechanisms responsible for resistance to downy mildew have been investigated in wild grapevines over a half century ago, and classes in the level of resistance/susceptibility have been described for several species of the Vitaceae (Roubelakis-Angelakis, 2009). In addition, *Vitis* species response to *P. viticola* inoculation depends on the genotype, revealing the presence of three different patterns: (i) Successful colonization - the pathogen penetrates through the stomata and colonizes the mesophyll until sporulation; (ii) Inhibition of pathogen development - the development of the pathogen is arrested shortly after the spores had attached to the guard cells; and (iii) Surface hyphae - an extensive mycelium develops on the leaf surface without penetrating through the stomata (Jürges *et al.*, 2009).

As expected, *V. vinifera* shows Pattern (i); whereas Pattern (ii) is typical of the North American and Asian host species. It seems that evolutionarily differentiated signals passed between the host and the pathogen and these may regulate the three types of interactions which then open new possibilities for disease control (Gessler *et al.*, 2011).

In this context, we investigate the molecular basis of the incompatible interaction between breeding lines containing two resistant loci and *P. viticola*. Our approach tried to mimic real life scenario by infecting grapevine plants under optimal conditions to the development of the pathogen. We have then collected samples during early infection (24 hpi) and later during post-infection (48 hpi and 96 hpi), as well as comparable uninfected controls. We identified proteins exclusive when this resistant breeding lines were challenged with the pathogen. These results provided insight into the molecular mechanisms underlying infection and defense, as well as trends in protein expression that reflect the establishment of an incompatible interaction and a successful resistant response.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Two breeding lines, designated UFSC-12-1-15 and UFSC-12-1-16, containing the resistance loci to *P. viticola* *Rpv1* (Welter et al., 2007) and *Rpv3* (Wiedemann-Merdinoglu et al. 2006) was used for the proteomic analysis. The breeding lines possess the resistance loci in heterozygosity. *Rpv1* and *Rpv3* individually confer partial resistance to *P. viticola*, but when combined, the resistance is complete (Eibach et al., 2007). The two breeding lines were grafted on the Paulsen 1106 rootstock and planted at individual plastic pots (3L) containing a mixture of Plantmax ®: sand (2:1 v/v) and grown in a greenhouse under light photoperiod 16h: 8h (light: dark).

2.2. Inoculum and pathogen infection

Spores of *P. viticola* were collected in experimental plots of vines of the Santa Catarina State Agricultural Research Agency (EPAGRI), Experimental Station of São Joaquim (Latitude: 28 17' 39"/ Longitude: 49 55' 56"). The Oomycete was maintained on *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon in the greenhouse and periodically abaxial surface of young leaves were inoculated with a suspension containing 2×10^4 sporangia.ml⁻¹. After 5-6 days in the greenhouse, the plants were kept overnight in dark under high relative humidity (RH > 96 %) to induce sporulation. New sporangia were soaked in sterile water for suspensions preparation and subsequent inoculation of new Cabernet Sauvignon plants as described before Spores collected from this second inoculation procedure was used for challenge the breeding lines for proteomic analysis.

These spores of *P. viticola* were resuspended in sterile distilled water at a concentration of 5×10^4 sporangia.ml⁻¹ and sprayed onto the abaxial leaves so much as adaxial surface up to the start dripping. Plants were placed in the inoculation chamber with controlled temperature and humidity (RH > 96%) at 24°C overnight. Afterwards, these were placed in a greenhouse and subsequent collections of plant material were performed at the given time-points: 24 h post-inoculation (hpi), 48 hpi and 96 hpi. Leaf material were weighted and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For control plants, sterile distilled water was sprayed on the leaves and these were kept under the same conditions of the infected plants.

2.3. Protein extraction and solubilization

Leaf samples were harvested from four different plants which were then considered four biological replicates. Samples were separately ground with liquid nitrogen in a mortar. Protein extraction was carried out according to Carpentier *et al.* (2005), i.e. by phenol extraction and ammonium acetate in methanol precipitation. Pellets were resuspended in urea/thiourea buffer (2% v/v Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA), 2% v/v Pharmalyte (GE Healthcare), 5 mM PMSF, 7 M urea and 2 M thiourea).

Protein quantification was performed by means of 'Bradford method' according to the modified procedure of Bradford (1976) and Ramagli and Rodriguez (1985). The values obtained were compared to the bovine serum albumin standard curve.

2.4. Two-dimensional IEF/SDS-PAGE and protein staining

A preliminary test was first developed in order to determine biological variability baseline knowledge on samples collected for this study according to Coll *et al.* (2011) with some modification. The pre-test consisted of 650 µg of each biological replicate samples from each

treatment which were separated by 2-D gels using Immobiline™ DryStrip gels of 13 cm and a linear pH range of 3-10 (GE Healthcare). 2-D gel electrophoresis conditions were performed as described by Weiss and Görg (2008).

Once assessed that variability within samples fall in an optimal range for proteomic analysis, the extracted proteins were used for comparative proteomic analysis. In the isoelectric focusing (IEF) step, strip gels of 13 cm and a linear pH range of 3-10 (GE Healthcare) were used. Strips were initially rehydrated with protein extracts and rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 2% w/v CHAPS, 0.5% v/v IPG buffer (GE Healthcare), 0.002% w/v bromophenol blue). Strips were then processed using an Ettan IPGPhor IEF system (GE Healthcare) in a total of 35000 Volts.h-1 (following a gradient step of 1000 Vh⁻¹, a gradient of 3000 Vh⁻¹, a gradient of 10000 Vh⁻¹, a gradient of 35000Vh⁻¹) and subsequently reduced and alkylated for 30 min under slow agitation in a Tris-HCl solution (75 mM), pH 8.8, containing 2% w/v SDS, 29.3% v/v glycerol, 6 M urea, 1% w/v DTT and 2.5% w/v iodoacetamide. Strips were placed on top of SDS-PAGE gels (12%, homogeneous) and used in the second dimension run with a Ruby 600 system (GE Healthcare). Gels were immediately stained with Coomassie brilliant blue G-250 colloidal (MS/MS compatible) as described by Candiano *et al.* (2004). Scanning of stained gels was performed using ImageScanner III modular image scanner (GE Healthcare).

2.5. Differential quantitative analysis of infected grapevines

For the purpose of addressing plant-to-plant variability within our treatment and control plants, we have performed a pretest experiment consisting of twenty four gels, of which four from each time-point treatment (24 hpi, 48 hpi and 96 hpi), totalizing twelve gels for each inoculation treatment (infected and control). These were analyzed all together by software Image Master 2D Platinum, version 7.0 (GE Healthcare). Spots volume of each gel was used to determine the biological variation which was evaluated by Principal Component Analysis (PCA). This design allowed the performance of both biological and technical variation statistical analysis together (Horgan, 2007).

The second 2-D experiment consisted of eighteen gels, each containing a loading pool of four biological replicates per time-point treatment. Cross-comparisons among the different samples were performed at each time-point only. Thus, all compared samples had to be run together avoiding extra system variation from different runs. Three different runs were then performed in order to measure the technical variability. Hierarchical matching of gels was organized in such a way that technical replicate gels were compared first and exclusive spots were removed from subsequent analysis. Spots within each treatment with a high coefficient of variation (>20%) were excluded from the analysis. Therefore, only consistent spots for each treatment were used in the comparative analysis (Valledor and Jorrín, 2011).

2.6. Peptide sequencing by nanoHPLC-ESI-MS/MS

Gel spots were excised and sent to Tromsø University Proteomics Platform (Tromsø, Norway) for processing and analysis. These were subjected to in-gel reduction, alkylation, and tryptic digestion using 2–10 ng/μl trypsin (V511A; Promega) (Shevchenko *et al.*, 1996). Peptide mixtures containing 0.1% formic acid were loaded onto a nanoACQUITY UltraPerformance LC (Waters), containing a 5-μm Symmetry C18 Trap column (180 μm × 20 mm; Waters) in front of a 1.7-μm BEH130 C18 analytical column (100 μm × 100 mm; Waters). Peptides were separated with a gradient of 5–95% acetonitrile, 0.1% formic acid, with a flow of 0.4 μl/min eluted to a Q-TOF Ultima mass spectrometer (Micromass/Waters). The samples were run in data dependent tandem ms mode. Peak lists were generated from MS/MS by the ProteinLynx Global server software (version 2.2; Waters). Protein identification was

performed by searching the National Center for Biotechnology Information non-redundant database (NCBIInr), using the Mascot program (<http://matrixscience.com>). The data were first searched for contaminants against NCBIInr database version 20130830 'all entries' (32052081 sequences; 11116435548 residues). We have also searched against NCBIInr database with taxonomy restriction to include only the Viridiplantae (Green Plants) (1496044 sequences). The following parameters were adopted for database searches: complete carbamidomethylation of cysteines and partial oxidation of methionines, peptide mass tolerance ± 100 ppm, fragment mass tolerance ± 0.1 Da, missed cleavages 1 and significance threshold level ($P < 0.05$) for Mascot scores ($-10 \log(P)$). Even though high Mascot scores are obtained, a combination of automated database search and manual interpretation of peptide fragmentation spectra was used to validate protein assignments. Molecular functions and cellular component of proteins were browsed against KEGG Database (<http://www.genome.jp/kegg/>). Distribution of modulated proteins with positive identifications were performed according to biological functions assigned using GO (Gene Ontology) annotation. When no GO annotation was available, proteins were annotated manually based on literature searches.

2.7. Real-time qRT-PCR

The analysis of gene expression was performed to confirm the observed modulations of certain proteins and to investigate the gene expression profiles throughout the time course of infection. In order to perform a more robust analysis, a second inoculation experiment has been done according to the previous one described above.

Total RNA was isolated from frozen leaves from three different plants for each time-point treatment using RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer instructions. Total RNA was quantified using an NanoDrop™ 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Following quantification, cDNA was synthesized and gene-specific primers based on coding regions of each target gene was performed using the SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit w/ROX (Invitrogen™, Carlsbad, USA) according to manufacturer instructions. Real-Time qRT-PCR experiment was carried out in duplicates using hydrolysis probes (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA) and StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Singapore, Singapore). Each 20 μ l reaction volume comprised 10 μ M of each primer and probe and 15 ng of total RNA from pooled samples of each treatment. The amplification efficiency was calculated from relative standard curves provided for each primer using StepOne™ Real-Time PCR System software (Applied Biosystems®, Singapore, Singapore). The relative expression ratio value was calculated for inoculated samples relative to the corresponding control sample at the same time-point according to the Pfaffl equation (Pfaffl, 2001). Three primer pairs were re-designed for probe conformation for gi|225435240, gi|359491598 and gi|359481484; corresponding to the elongation factor 1-alpha-like, the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and to the ubiquitin-conjugating enzyme-like; respectively. These genes were selected based on the study of Selim et al., 2012 which have identified suitable reference genes for real-time RT-PCR normalization for grapevine-downy mildew pathosystems. The stability expression of each of these reference genes was tested in all samples of this specific experiment using NormFinder algorithm (Andersen et al., 2004). Multiple algorithms have been devised to process qRT-PCR cycle threshold (Ct). However, NormFinder algorithm has the capability to estimate both intragroup and intergroup variance, and the identification of the two reference gene as most stable normalizers (Latham, 2010). We have chosen the two most suitable reference genes for data normalization.

2.8. Statistical analysis

The main sources of variation in the 2-DE experiment dataset were evaluated by unsupervised multivariate PCA, using Euclidean distance for quantitative analysis. PCA was first applied to determine the proportion of the total proteomic variation that originates from differences between biological and technical repetitions (Valledor and Jorrín, 2011). PCA analyses were performed by examining the correlation similarities between the observed measures. The spot volume was analyzed using covariance matrix (XLSTAT software version 2013).

The data used to perform the PCA analyses were spot volumes obtained from imaging analysis of 2-DE gels. In order to avoid bias in PCA analysis, we have matched all gel images against a unique arbitrary reference image.

For the 2-DE experiment, a second proteomic experiment was performed in order to proceed gel-to-gel comparison. One-way ANOVA was used to investigate differences at individual protein levels. The calculations are based on normalized spot volume based on the total intensity of valid spots in a single gel. Differences at the level $P < 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Image Master 2D Platinum version 7.0 (GE Healthcare).

3. Results and Discussion

3.1. Proteomic profiling changes in infected versus control grapevine leaves

PCA was used to demonstrate similarities in the protein quantity between different gels. We have performed the PCA assessment in order to: (i) characterize biological and technical variation and (ii) detect pathogen infection overall response over time. The two main principal components accounted for 44.2 % of the total variation in the dataset (Figure 1). The first principal component (PC1) explained 26.6% of the variation which made a clear separation of the infected 96 hpi samples of grapevine. The second principal component (PC2) accounted for approximately 18% of the variation which then separated samples from both infected 48 hpi and 96 hpi from the rest of the dataset.

Multivariate data analysis methods are useful for proteomic analysis because it is able to transform the observed variables into a new set of independent variables called principal components (PCs) whose correspondence to putative biological processes can be assumed without prior biological hypothesis (Valledor and Jorrín, 2011). Figure 1 shows three main clusters, corresponding to the major effect of the infection at time-point 48 and 96 hpi, suggesting an effect of both infection and timing on the proteome. Focusing on infection, a clear separation between control and infected samples is evident at all three time-points which cluster to the infected 24 hpi. To the best of our knowledge, this is the first time that quantitative protein variation analysis suggests that resistance response in grapevine to downy mildew starts at 48 hpi but significantly varies at 96 hpi.

The main disadvantage of multivariate methods, such as occurs in PCA, is that the biological annotations of proteins are not usually available before data analysis, making it harder to correlate expression behavior to function (Valledor and Jorrín, 2011). Therefore, a second proteomic assay was performed in order to detect significant differences in spot quantities between treatments and, thereof identify these specific proteins.

Since the interest of this study lays in the characteristics of the population from which the individuals were taken and considering that biological and technical variability within samples fall in an optimal range for proteomic analysis which were assessed by PCA samples from the same treatment were pooled and three gel repetitions from each sample were used for the comparative proteomic assay. The pooling process is based on the assumption of biological averaging, so if pooling is required it is better to use several small pools (Kendzioriski *et al.*, 2011).

Quantitative protein differences between infected and control leaf samples were investigated by comparison of spots present in six 2-DE gels at each time-point. Experimental variations have been avoided by the exclusion of spots that were not present in all three gels within each treatment. The average of total protein content was 2.48 ± 0.04 mg.g⁻¹ of fresh weight (Table 1). No statistically significant difference was found between treatments. The average number of spots detected (330) on the 2-DE gel from infected and control samples collected at different time-points showed similar patterns and they were considered well resolved for 13 cm gel stained with colloidal Coomassie G-250. However, statistically significance difference was found between treatments for the total number of spots detected (Table 1). Since total protein content did not show statistically significance among samples, the differences in the number of spot detected are related to differences in the number of specific proteins during plant defense response which starts at 48 hpi and is maintained 96 hpi.

The comparison of infected and control leaf samples performed at each time-point revealed a total of 41 spots that were either present, absent, up- or down-regulated in one of the treatments, at a statistically significant level ($P < 0.05$) (Figure 2). Spots that were not detected in this study, and were either not present or below the detection limit of approximately 1 ng were then considered absent in the sample. Ten spots were found to have differential

abundances at 24 hpi, 12 at 48 hpi and 18 at 96 hpi time-point. Spots from control samples were most abundant at 24 hpi, whereas spots from infected samples were most abundant at 48 and 96 hpi. These spots were isolated and successfully analyzed by LC-MS/MS. All 41 spots matched to *Vitis* sp. species with highly significant Mascot scores. Table 2 presents the MS/MS criteria used and protein identification. Five of these proteins could not be fully characterized due to the lack of protein annotations in available databases.

Functional classification of the identified proteins, carried out in accordance with the Gene Ontology Database, showed that they belonged to one out of six main functional categories: (a) transport, (b) protein metabolism (metabolic processes), (c) stress (sensory perception), (d) resistance (response to stimulus), (e) genetic information processing (regulation), and (f) energy metabolism (metabolic processes). Among these functional categories, energy metabolism group constituted a significant proportion (35%) when all time-point were analyzed together, followed by protein metabolism and stress, both with 20%. Resistance, genetic information processing and transport were present at the rates of 12.5%, 10% and 5%, respectively (Figure 3). However, the distribution of these categories did not follow the same pattern among time-point analysis. At 24 hpi, there was a considerable homogeneity among all protein categories. At 48 and 96 hpi, energy metabolism was predominant, followed by protein metabolism at 48 hpi and stress at 96 hpi. It is interesting to note that stress-related proteins were present at all time-points but resistance-related proteins were mainly present at 96 hpi. These results are in accordance to the outcomes observed from the PCA analysis, which provides a robustness of our methodology since different proteomic experiments were performed for each of these analyses.

3.2. Confirmatory data on biologically important differences in protein expression

Although guidelines to improve overall experimental quality in proteomic studies have been extensively debated in the literature and within the scientific community (Taylor et al., 2007; Martens and Hermjakob, 2007; Mann, 2009), specific guidelines for confirmatory methodologies for proteomic data is yet uncovered by this debate. The efforts on validating what we understood as being biologically relevant to this study followed what has been emerging as an acceptable methodology for confirmatory data on proteomics. Western Blotting, Northern Blotting and/or qRT-PCR has been recently applied by some research groups as an attempt to validate data obtained from 2-DE (Bhadauria *et al.*, 2010; Spagnolo *et al.*, 2011; Milli *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013) and it has also been pointed as desirable criteria by some scientific journal guidelines.

Thus, we have performed a second inoculation experiment following the same procedures used for the proteomic investigation aiming at validating the protein results by qRT-PCR. It is important to mention that we have not performed comparison of spot abundance over time, but only infected versus control at each time-point. Therefore, the same comparison has been made for gene expression analysis.

As shown in Table 3, the q RT-PCR profiles of 4 out of 10 candidates matched the observed protein expression precisely at the corresponding time-point. The lack of correlation between the real-time RT-PCR and proteomics data cannot confirm our results but, at the same time, seems to bring up the need for further discussions on the development of sound confirmatory methodologies for proteomic data. It is not an easy task considering the complex transcriptional and posttranscriptional regulation which might reveal that the abundance of the protein is not directly and linearly related to the abundance of the corresponding mRNA (Lei Nie *et al.*, 2007). Milli et al. (2012) when analyzing the compatible interaction between susceptible grapevines to downy mildew also found changes in transcript abundance at time-points in which the protein level was not statistically altered.

One important conclusion from early integrated transcriptomic and proteomic studies in both prokaryotic and eukaryotic systems is that correlations may be different in different groups of genes and, therefore, that correlations may not follow a uniform pattern at the whole genome scale (Lei Nie *et al.*, 2007).

3.3. Proteins related to the energy metabolism

Among all differentially modulated proteins during the infection process, those involved in energy metabolism were most expressed, in a total of 14. Interestingly, most of these proteins were modulated at 48 and 96 hpi in infected plants (12 proteins). Similar results were found in susceptible grapevine 'Pinot Noir' in which most of energy metabolism related proteins were identified at 24 and 96 hpi, showing a breakdown of these proteins expression at 48 hpi (Milli *et al.*, 2012).

According to Berger *et al.* (2007) infected plants must also cope with the higher energy demand conferred by the pathogen, and generally by increasing respiration and oxidative phosphorylation. The increased energy demand can also be addressed by increasing the levels glycolytic enzymes and those in the pentose phosphate pathway. These enzymes also help to produce precursors for the biosynthesis of antimicrobial phenolic compounds involved in defense. Our results demonstrate a relevant difference between grapevine resistance and susceptibility to downy mildew, when a decrease of proteins presented in susceptible grapevine genotypes prevent the transfer from source to sink in infected leaves (Berger *et al.*, 2007). This behavior might be associated to the lack of sucrose degradation by invertases and the lack of soluble sugars accumulation, as well as the activation of defense in plant primary metabolism that were modulated in the proteome of *Vitis* sp. containing four resistant alleles in response to pathogen challenge (Ramon *et al.*, 2008). Thus, the depression of proteins related to the energy metabolism at 48 hpi preclude the energy demand required for maintenance of plant defense machinery which enable the plant cells to resist to pathogen infection.

Among the observed energy related enzymes, ribulose biphosphate carboxylase (Rubisco) enzyme was found in resistant *Vitis*. Likelywise, Sharma *et al.* (2008) observed an increase of proteins involved in primary metabolism in a tolerant *Brassica napus* line to the pathogen *Alternaria brassicase*. Additionally, carbonic anhydrase (CA), which was evident in our infected *Vitis* treatment, is reported to play an important role in defense responses, such as for a CA-silenced genotype of *Nicotiana benthamiana* which was more susceptible to infection caused by *Phytophthora infestans*. Slaymaker *et al.* (2002) also found that silencing CA gene in leaf tissue of *N. benthamiana* suppressed Pto:avrPto-mediated hypersensitive responses (HR).

Enzymes associated to photosynthetic systems (i.e. chlorophyll a-b binding protein 8, mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier-like protein-like isoform 1 and the hypothetical protein VITISV_039682) were observed at 96 hpi in infected plants. This suggests that the induction of defense responses against *P. viticola* could be a cost-intensive process requiring an accelerated metabolic rate and an increased demand for assimilates as also reported in other studies (Berger *et al.*, 2007).

Our results corroborate with the previous work on microarray analysis of the *Brassica napus*- *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem by Zhao *et al.* (2009). These authors suggested that the changes in the expression of genes encoding enzymes involved in carbohydrate and energy metabolism are directed towards shuttling carbon reserve to citrate cycle (TCA cycle) and generating ROS. Oxidative stress leads to the production of ROS, a known key event relating to HR in restricting hyphal growth and reinforcing the cell; and it also acts as a diffusible signal for induction of cellular protectant genes (Lamb and Dixon, 1997; Neill *et al.*, 2002).

3.4. Resistance and stress-related proteins

Resistance and stress-related proteins were up-regulated at 96 hpi on infected plants with the exception of a PR-5 protein present in control plants (thaumatin-like). Pathogenesis-related (PR) proteins comprise one of the important components of the inducible repertoire of the plant self defense mechanisms that are produced in response to the invading pathogen and/or abiotic stresses regardless of its tolerant to the pathogen [71]. PR -5 is known to have specific antifungal properties (Dercke *et al.*, 1998; Monteiro *et al.*, 2003; Salzman *et al.*, 1998) due to its capacity of enhance the permeability of pathogen cell membrane by forming holes, which enables water influx and causes rupture of hyphal membrane (Abad *et al.*, 1996; Anz'lovar and Dermastia, 2003). In addition, some thaumatin-like proteins bind to β -1,3-glucans and display β -1,3-glucanase activity (Grenier *et al.*, 1999).

Momilactone A synthase-like observed in rice (*Oryza* sp.) and *Hypnum. plumaeforme* (Kato-Noguchi, 2004; Kobayashi *et al.*, 2007; Nozaki *et al.*, 2007) are known to be synthesized as a part of defensive responses and exhibit phytoalexin activity (e.g., Tamogami and Kodama, 2000; Jung *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2007). In wild rice, it has been observed that it inhibited 50% of germ tube growth of *Magnaporthe oryzae*, indicating that *M. oryzae* may induce momilactone A production as enhancing blast resistance in leaves (Kato *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 2010). Momilactone A and B have also been shown antifungal activity against other fungi, *Botrytis cinerae*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum gloeosporides* and *Fusarium oxysporum*, as well as antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas ovalis*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus cereus* (Cartwright *et al.*, 1977).

Another identified protein involved in the defense mechanism of resistant grapevine to downy mildew was the uncharacterized protein LOC100266227, which was modulated at 48 hpi. This protein presents a WHY domain linking the Hin1 proteins to the plant family LEA-14 (late embryogenesis abundant proteins), which is known to be expressed under water stress conditions and during late embryogenesis. This domain has also been observed in proteins related to hypersensitivity responses (HR) and thus acting in plant defense mechanisms (Ciccarelli and Bork, 2004). The protein Hin1 seems to take part in a non-specific pathway activated as a general response of plants to pathogenic infection but yet still poorly characterized (Gopalan *et al.*, 1996).

Plant pathogens have developed various independent and well-elaborated mechanisms of penetrating and accessing plant cell contents. Stopping the penetration of pathogens during plant infection is generally dependent on the accurate time-course of the pathogen perception by the plant host cells and the activation of networking systems resulting in induction of secondary metabolites, reactive oxygen species (ROS) and pathogenesis related proteins, working often in combination to mount an adequate defense mechanism against the pathogen infection (Bolwell *et al.*, 2001). The stress-related proteins observed at all time-points in both control and infected plants were mainly involved in oxidative stress and anti-oxidative response. Among those, we found catalases, thioredoxins and peroxidases. To prevent oxidative damage, many cellular compartments contain multiple ROS scavenging systems – such as ascorbate glutathione cycle (Asada and Takahashi, 1987) superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and catalase (Asada, 1999; Mittler, 2002; Apel and Hirt, 2004) – which regulate the steady-state level of ROS production in that cell compartment. Davletova *et al.* (2005) suggests that the accumulation of ROS must be well regulated to avoid oxidation of macromolecules. Thus, the presence of the ROS-scavenging proteins, such as catalases, thioredoxins and peroxidases present at different cellular compartments are essential during the process of cell infection to ensure integrity and prevent pathogen growth.

3.5. Protein metabolism

A proteasome protein was modulated at 96 hpi on infected plants. This is a protein-destroying apparatus involved in many essential cellular functions, such as regulation of cell cycle, cell differentiation, signal transduction pathways, antigen processing for appropriate immune responses, stress signaling, inflammatory responses, and apoptosis (Darwin *et al.*, 2009). The most common form is the 26S proteasome, also identified in this study, containing one 20S core particle and two 19S regulatory particles that enable the proteasome to degrade ubiquitinated proteins by an ATP-dependent mechanism (Darwin *et al.*, 2009). Increasing evidences indicate the ubiquitin/26S proteasome pathway involved in the regulation of many of cellular processes, including the R-protein-mediated plant immune response (Liu *et al.*, 2002; Janjusevic *et al.*, 2006; Abramovitch *et al.*, 2006). The up-regulation of general components of ubiquitin/26S proteasome system (UPS) has commonly been observed in various plant–pathogen interactions with UPS playing a central role in plant defense (Dreher and Callis, 2007).

Enzyme peptyl-prolyl cis-trans isomerases from the immunophilin family are known to interact with a variety of partners to facilitate protein folding and thus regulate developmental processes, certain aspects of stress responses and cell death (Kromina *et al.*, 2008). In arabidopsis, an FKBP-type immunophilin is required for the accumulation and assembly of the photosystem II supercomplex (Lima *et al.*, 2006). Thus, the modulation of this protein at 48 hpi in infected plants could be correlated to the increase in photosynthesis related proteins, such as chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic, hypothetical protein VITISV_039682 and mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier-like protein-like isoform 1 which were modulated at 96 hpi.

Cysteine synthase enzyme modulated on infected 96 hpi plants seems to play a key role in cysteine biosynthesis and is incorporated into different kinds of proteins and/or acts as a precursor for a range of sulfur-containing metabolites (Noji *et al.*, 2001; Wirtz *et al.*, 2001). Importantly, cysteine is involved in the biosynthesis of tripeptide glutathione (GSH), which is an important universal antioxidant, or ROS detoxifier (Noctor & Foyer, 1998). Wheat plants (*Triticum aestivum* L. cv Fidel) elicited with *Erysiphe graminis* spores showed enhanced GSH activity with increased levels of glutathione S-transferases (GSTs) and consequently increasing the resistance (Mauch and Dudler, 1993).

3.6. Transport-related proteins

Apparently, the transport proteins observed in the present study are unlikely to be involved in the process of plant–pathogen nutrient exchange exclusively. *P. viticola* is a biotrophic pathogen developing its haustoria within plant cell which is essential for the acquisition of nutrients (Hahn and Mendgen, 2001). Nonetheless, this large traffic of nutrients between host and pathogen is the only nutritional strategy used by downy mildew. The transport protein identified in this study (hypothetical protein VITISV_027855) is a porin protein which seems to be present exclusively in the membranes to allow permeability of hydrophilic molecules (up to a molecular mass of 4-5 kDa) and the voltage-dependent anion channel (VDAC) that regulates the flux of mostly anionic metabolites through the outer mitochondrial membrane (Fischer *et al.*, 1994). Thus, it is largely involved in basic plant physiology and thus not presenting involvement with the mechanism of resistance.

3.7. Overall defense response in *Rpv1* and *Rpv3*-dependent resistance to grapevine downy mildew

The evolutionarily differentiated signals occurring among host genotypes and the pathogen that may regulate the different types of interactions open new possibilities for disease control (Gessler *et al.* 2011). Although, there is a recent number of scattered studies focused on the molecular basis of the physiological processes behind identified quantitative trait loci (QTLs) with major effects on downy mildew resistance, these were not able to challenge the successful defense mechanisms of hybrid resistant grapevine genotypes containing *Rpv2* and *Rpv3* pyramided response.

In recent years, an increased number of articles on proteomic analysis of plant- oomycete interaction were published (Amey *et al.*, 2008; Trapphoff *et al.*, 2009; Bhadauria *et al.*, 2010; Hadrami *et al.*, 2012) among others. As for specific interactions to grapevine species, this number is significantly smaller (Giribaldi *et al.*, 2010; Basha *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009) and these are even more scarce for downy mildew (Milli *et al.* , 2012) .

It is well known that *P. viticola* is exclusive biotrophic pathogenic oomycete that can only survive on natural host tissues. The molecular basis for this compatible/incompatible interaction is still unknown. However, acquired knowledge derived from other biological models demonstrates that the interaction between the pathogen and the plant happens though the secretion of elicitor molecules which can then act as virulence factors (O'Connell *et al.*, 2006; Kamoun *et al.*, 2006; Dodds *et al.*, 2009).

Earlier studies suggested the presence of post-infection resistance processes (Polesani *et al.*, 2010) and a gene-to-gene mechanism has been proposed since the *Rpv3* resistance locus has been mapped to a cluster of NBS-LRR receptor genes (Bellin *et al.*, 2009). Mechanisms of post-infection resistance in resistant grapevines include callose deposition in stomata, cell wall-associated defense processes, accumulation of reactive oxygen species and increased peroxidase activity and HR activation. Thus, resistant grapevines react to *P. viticola* inoculation by rapidly up-regulating genes coding for pathogenesis-related (PR) proteins and genes involved in defense-related signal transduction and metabolic processes, including the phenylpropanoid pathway (Gessler *et al.*, 2011).

An interesting analysis of our results can be made by comparing them with those resulting from a similar study performed by Milli *et al.* (2012) on downy mildew susceptible grapevine cultivar 'Pinot Noir'. Their results suggested that during leaf colonization the pathogen might need to actively suppress plant defenses, which could then be reactivated after pathogen sporulation, which would be too late to produce an effective resistance. In susceptible cultivar 'Pinot Noir', the infection results in the early modulation of more than 50 proteins in the host, but as colonization proceeds the number of modulated proteins falls to 18, and it appears that many of the defense-related proteins induced after 24 hpi return to baseline levels after 48 hpi, suggesting the active suppression of host defense responses by the pathogen (Milli *et al.* 2012).

Indeed, a difference on protein modulation at 48 hpi seems to play an important role in grapevine defense to *P. viticola*. Our results showed that this interaction is first characterized by the increase of proteins related to the sugar metabolism, starting at 48 hpi (Figure 3a). Our PCA results also showed a start response at 48 hpi by a complete separation of infected from control group, which seems to become even stronger at 96 hpi (Figure 1).

Resistance specific proteins, such as momilactone A synthase and elongation factor Tu appear only at the latter stages at 96 hpi and are supposed to be produced in response to attack by a pathogen through the perception of elicitor signal molecules. On the other hand, stress-related proteins, such as peroxidases, seems to be play an important role during the entire response mechanism and being, perhaps, the first ones to be up-regulated upon infection. The presence of resistance-related proteins at 96 hpi and the homogeneous pattern of stress-related proteins have been also observed in susceptible cultivar 'Pinot Noir' (Milli *et al.* 2012).

Therefore, the up-regulation of classic defense-related proteins and enzymes involved in the synthesis of secondary metabolites that were induced late at 96 hpi in both susceptible and resistant genotypes should not be the main factor contributing the resistance response. The successful effect on the progress of infection seems to be happening at 48 hpi by proteins related to the energy and protein metabolism that might qualitative and quantitative trigger an efficient resistance response.

In addition, it suggests that the classical step of pathogen (or elicitor) perception is taken place. While there is an increase in the energetic metabolism in infected plants over time due to possible demands on resistance machinery; there is a decrease on the protein metabolism, which seems to be more important in the first hours of infection. Stress proteins are present at all time-points and they are related to the metabolism of reactive oxygen species and to the sensory perception cascade that the infection might cause. At 96 hpi, infected plants presented three proteins related to resistance response, two of them being the elongation factor Tu (chloroplastic-like) which is known to trigger resistance to pathogens and abiotic stress in plants (Fu *et al.*, 2012). As for the control plants, as expected, no biological significant process took place. We found differential abundance in spots that were identified as genetic information processing (all time-points) and the presence of proteins related to energy metabolism, stress, transport and resistance at 96 hpi. The latter one was identified as a PR-5 protein which is known for its anti-fungal properties, but also for a possible role in activating other defense pathways and not in the scope of this study (El-kereamy *et al.*, 2011).

4. Conclusions

In this study, we evaluated the protein expression profile of leaves of grapevine breeding lines with *Rpv1* and *Rpv3* pyramided resistance loci to downy mildew during pathogen infection. The incompatible interaction between the resistant grapevine cultivar and the downy mildew pathogen *P. viticola* resulted in the modulation of 41 proteins, many related to energy metabolism, stress and defense, and protein metabolism. Proteins modulated at 24 hpi present in control plants were mainly associated with the result of PCA suggesting that these first 24 hpi do not play a central role in plant defense process. However, as colonization proceeds, the number of modulated proteins increases to 11, and it appears that many of the defense-related proteins induced after 48 hpi are associated to the activation of defense. After 96 h, when sporulation commences, the host appears to maintain from this suppression and again more than 13 host proteins are modulated, many related to stress and defense. Our results related to protein expression profile modulation in leaf tissue are in accordance to the previous studies of susceptible *Vitis vinifera*. The proteomic investigation demonstrates a coordinated increased in expression of proteins mainly related to the energy metabolism in resistant plant, when they were infected with the pathogen such as those related to primary and metabolic pathways, antioxidant defense, protein synthesis, and pathogenesis related proteins, which play a significant role in the defense responses against *P. viticola*. The increased levels of the enzymes, such as malate dehydrogenase, could be responsible for ROS generation in the resistant plants. The presence of cellular protectants, such as cysteine synthase, seems likely to stimulate the transcription of various phytoalexins and pathogenesis-related proteins that prevent the spread of the pathogen within the host tissue. As expected in control plants no biological relevant processes were observed. Overall, these data provide a mechanistic insight into the molecular basis of incompatible interactions between grapevine and *P. viticola* and identify several targets that could potentially be exploited to develop new protection strategies against this pathogen.

PCA Plot of infected and control samples at 24, 48 and 96 hpi

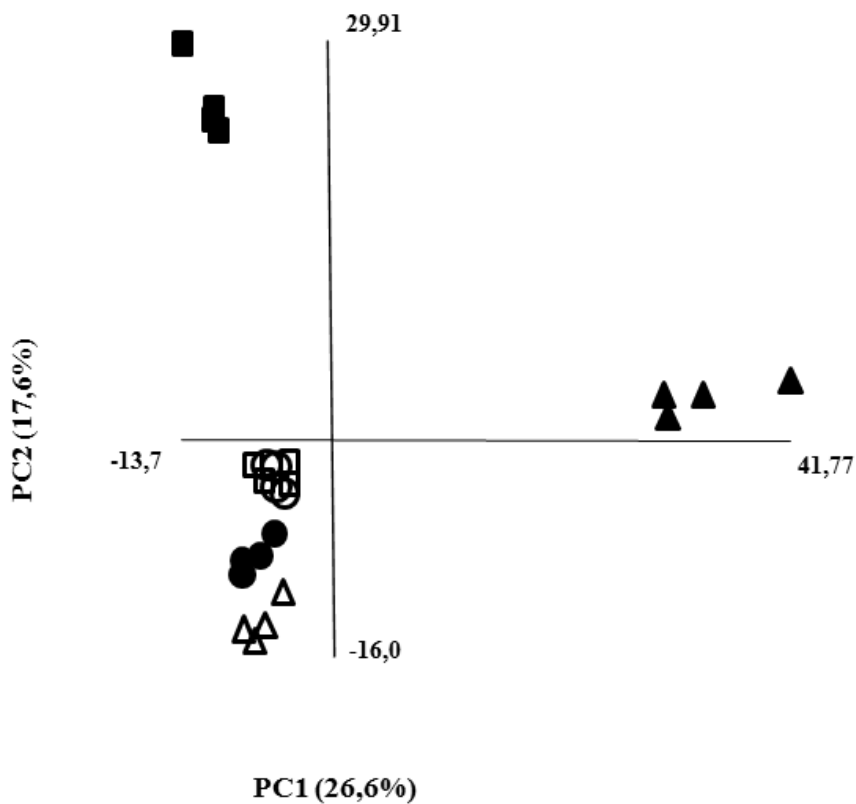


Figure 1. Principal component analysis (PCA). The principal components PC1 and PC2 were 26.6% and 17.6% respectively. The PCA scatterplot distinctly clustered the 24 individual maps. All observations were clustered into three experimental conditions corresponding to the three time-point sample collection (24, 48 and 96 hpi) but control plants clustered all together with time-point 24 hpi of infected plants. 'Hpi' means hours post-inoculation; circles, squares and triangles indicate samples at 24, 48 and 96 hpi respectively, filled and white symbols indicate infected and control samples.

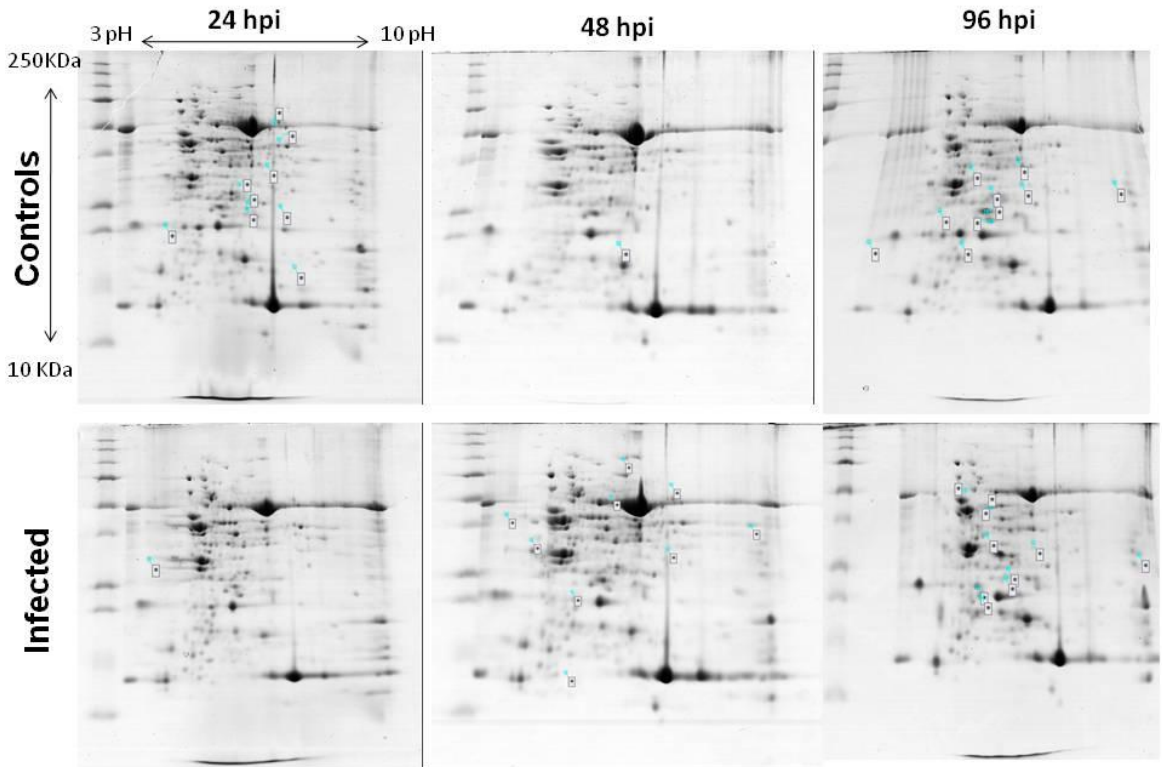


Figure 2. Representative two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) maps of the proteome of control and infected grapevine breeding lines with *Plasmopara viticola* collected at time 24 hpi (Figure 2a control and 2b infected), 48 hpi (Figure 2c control and 2d infected) and 96 hpi (Figure 2e control and 2f infected). Linear isoelectric focusing pH 3–10 for the first dimension and 12% SDS–PAGE gels in the second dimension were used. Molecular masses ranging from 10 to 250 kDa are given on the left side. Gels were stained with Coomassie Blue. The arrows point to differentially expressed protein spots selected for mass spectrometry identification. ID of identified proteins from Table 2 are indicated in boxes.

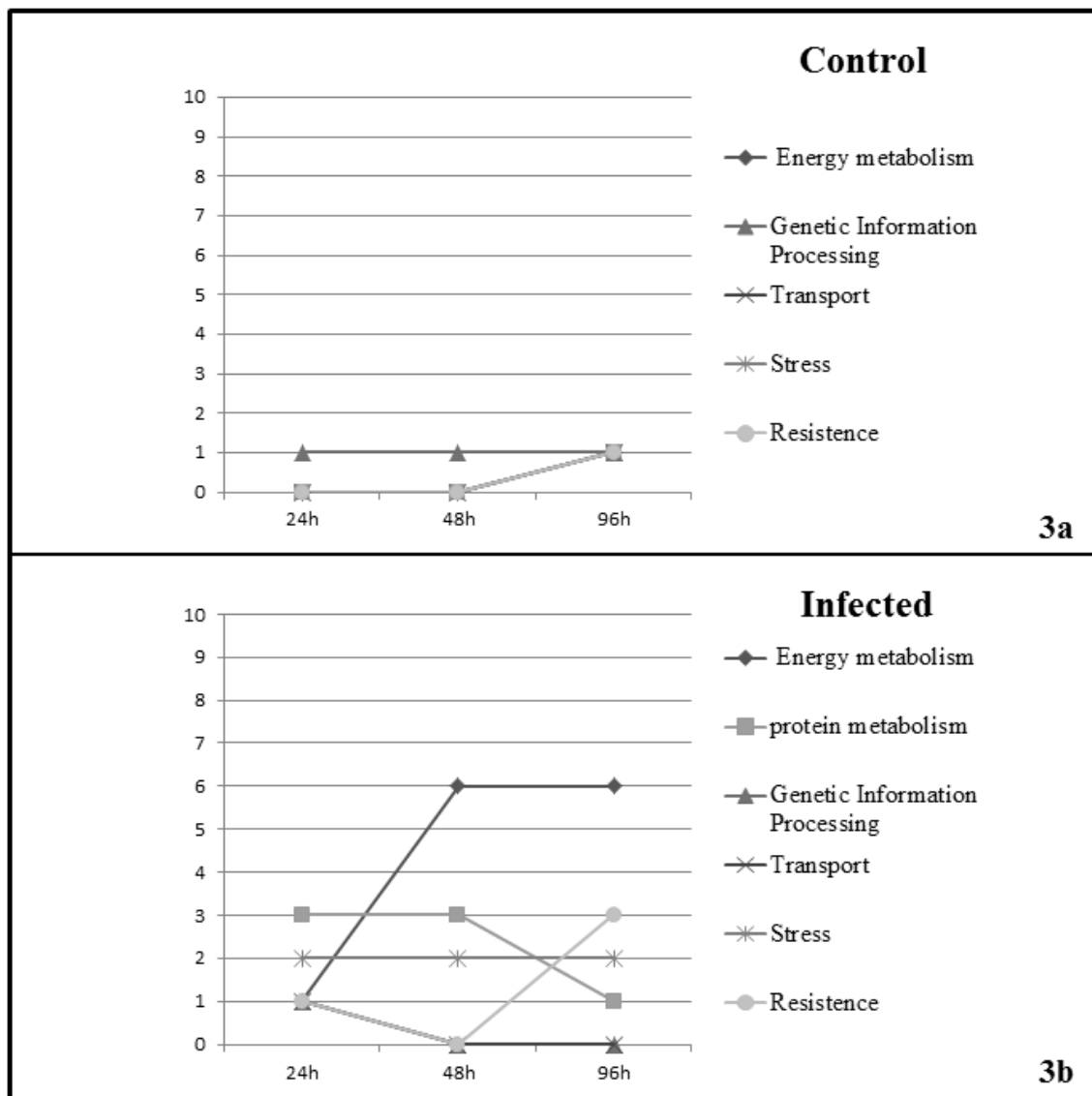


Figure 3. Distribution of modulated proteins of grapevines with positive identifications according to biological functions assigned using the GO (Gene Ontology) annotation. When no GO (Gene Ontology) annotation was available, proteins were annotated manually based on literature. Protein results for infected and control samples are presented in separated graphics, Figure 3a and 3b respectively.

Table 1. Total protein content and number of detected spots on control and infected grapevine breeding lines resistant to *Plasmopara viticola*.

	hpi	Total protein content (mg.g-1 of fresh weight) ¹	Average number of detected spots ²
Control	24	3,13±0,4	328±17,5 ^{ab}
	48	2,59±0,43	220,5±26 ^a
	96	2,08±0,71	334±7 ^{ab}
Infected	24	2,83±0,55	309±34 ^{ab}
	48	3,44±0,66	372±7 ^b
	96	2,50±0,4	382±34 ^b

¹ Values are means of n=4 samples ± standard deviation; ² Values are means of n=4 gels ± standard deviation.

Table 2: RT-PCR expression analysis of nine selected grapevine genes and comparison with levels of differential protein expression. Modulations are reported as the fold change in infected vs. control samples.

Spot number	NCBI accession number	Protein name	Proteomic Analysis Presence			Gene expression analysis (Real Time RT-PCR) Fold change (Infected versus control)		
			24hpi	48hpi	96hpi	24hpi	48hpi	96hpi
360	gi 225440536	universal stress protein A-like	Control	0	0	0.60	-	-
311	gi 33329390	thaumatin-like protein (PR-5)	Control	0	Control	0.89	-	0.80
666	gi 225434253	uncharacterized protein	0	Infected	0	-	0.93	-
174	gi 225464866	LOC100266227 momilactone A synthase-like	0	0	Infected	-	-	0.70
168	gi 225459591	L-ascorbate peroxidase T	0	0	Infected	-	-	0.78
117	gi 225456880	elongation factor-Tu	0	0	Infected	-	-	0.79
109	gi 225456880							
204	gi 147797613	hypothetical protein VITISV_027855	Control	0	0	0.75	-	-
862	gi 147818154	thioredoxin H-type-like	0	Infected	0	-	0.77	-
	gi 225455830	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like	0	Infected	0	-	0.62	-

Table 3. Exclusive proteins, at 24, 48, and 96 hpi in grapevine breeding lines resistant infected with *P. viticola*, and identified by 2-DE/MS analysis. Proteins were included in the list when they showed a fold in infected vs. mock-inoculated control samples, with a p value < 0.05 (Student's t-test). Proteins were classified in functional categories based on the KEGG PATHWAY Database. Additional categories are included when necessary. The Table also reports spot number (Spot no.), accession number and protein name, together with number of identified peptides, Mascot score, experimental and theoretical Mr and pI.

Fold Variation	Spot ID	Accession Number	Mascot Score	Peptide Match	Protein Name	Theor. MW	Theor. pI	Exp. MW	Exp. pI	Cellular Component	Biological Process
24 hpi											
Control	296	gi 225455948	535	13	20 kDa chaperonin, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	26	9.37	24	6.23	Chloroplast	Protein Metabolism
Control	204	gi 147797613	266	6	porin	34	6.67	34	6.78	Mitochondria	Transport
Control	125	gi 147866537	519	7	3-ketoacyl-CoA thiolase 5, peroxisomal [<i>Vitis vinifera</i>]	48	5.96	44	7.08	Peroxisome	Protein Metabolism
Control	250	gi 147805616	179	3	hypothetical protein VITISV_028800 [<i>Vitis vinifera</i>]	27	5.64	29	6.02	Cytoplasm	Protein Metabolism
Control	360	gi 225440536	328	5	universal stress protein A-like protein [<i>Vitis vinifera</i>]	18	6.82	17	7.52	Chloroplast	Stress
Control	311	gi 33329390	474	11	thaumatin-like protein [<i>Vitis vinifera</i>] (PR - 5)	23	4.67	21	4.01	Mitochondria	Resistance
Control	291	gi 225435249	155	6	proteasome subunit beta type-4 isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	27	6.45	25	7.14	Cytosol / Nucleus	Genetic Information Processing
Control	280	gi 225452452	427	13	carbonic anhydrase, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	36	8.06	25	6.25	Chloroplast	Energy Metabolism
Control	78	gi 359476986	671	11	catalase isozyme 1-like [<i>Vitis vinifera</i>]	56	6.71	54	7.39	Cytosol	Stress
Infected	218	gi 225456840	268	7	31 kDa ribonucleoprotein, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	36	4.60	31	3.77	Chloroplast	Genetic Information Processing
48 hpi											
Control	313	gi 225450219	332	8	30S ribosomal protein 2, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	16	6.32	19	6.05	Chloroplast	Genetic Information Processing
Infected	862	gi 147818154	150	3	thioredoxin H-type-like [<i>Vitis vinifera</i>]	12	5.22	13	4.95	Cytoplasm	Stress

Infected	82	gi 225455830	467	6	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like [<i>Vitis vinifera</i>]	34	8.7	57	8.8	Cytoplasm	Protein Metabolism
Infected	781	gi 225445670	283	4	proteasome subunit beta type-6 [<i>Vitis vinifera</i>]	24	5.46	21	5.06	Cytosol / Nucleus	Protein Metabolism
Infected		gi 225456268	344	5	adenylate kinase B [<i>Vitis vinifera</i>]	26	7.01	26	7	Mitochondria / Membrane	Energy Metabolism
Infected		gi 147862790	445	9	hypothetical protein VITISV_004441 [<i>Vitis vinifera</i>]	24	7.03	25	2.35	Cytosol / Nucleus	Protein Metabolism
Infected	708	gi 225431122	465	10	ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme chloroplastic isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	40	8.91	33	8.79	Chloroplast	Energy Metabolism
Infected	666	gi 225434253	331	9	uncharacterized protein LOC100266227 [<i>Vitis vinifera</i>]	34	4.66	32	3.82	Other	Resistance
Infected	546	gi 225434849	410	13	uncharacterized protein LOC100246732 [<i>Vitis vinifera</i>]	55	8.90	49	5.82	Other	Energy Metabolism
Infected	528	gi 225435632	430	11	formate--tetrahydrofolate ligase-like [<i>Vitis vinifera</i>]	67	7.21	59	7.19	Other	Energy Metabolism
Infected	494	gi 225460961	343	9	aconitate hydratase 2, mitochondrial [<i>Vitis vinifera</i>]	109	6.66	92	5.99	Mitochondria	Energy Metabolism
Infected		gi 225451235	332	8	cysteine synthase isoform 2 [<i>Vitis vinifera</i>]	26	9.25	92	5.99	Cytoplasm	Energy Metabolism
96 hpi											
Control	201	gi 359475502	567	8	malate dehydrogenase, glyoxysomal [<i>Vitis vinifera</i>]	37	8.78	33	9.24	Glyoxissoma	Energy Metabolism
Control	164	gi 225436924	637	17	uncharacterized protein At3g63140, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	43	7.1	40	6.69	Chloroplast	Transport
Control	269	gi 225426801	272	6	thaumatin-like protein [<i>Vitis vinifera</i>] (PR - 5)	24	7.85	20	2.72	Extracellular Region	Resistance
Control	246	gi 38679335	592	15	harpin binding protein 1 [<i>Vitis</i> sp. NL-2003]	31	7.82	26	4.61	Chloroplast	Stress
Control	205	gi 302143982	406	10	30S ribosomal protein 1, chloroplastic-like [<i>Vitis vinifera</i>]	26	6.12	32	6.78	Chloroplast	Genetic Information

Control	176	gi 225451235	847	28	cysteine synthase isoform 2 [<i>Vitis vinifera</i>]	34	5.39	37	5.43	Cytoplasm	Processing Energy Metabolism
Infected	229	gi 302143507	362	6	oxygen-evolving enhancer protein 2 [<i>Vitis vinifera</i>]	24	6.90	21	5,2	Chloroplast	Energy Metabolism
Infected	215	gi 297744661	421	11	triosephosphate isomerase, chloroplastic-like isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	27	5.5	24	5.99	Chloroplast	Energy Metabolism
Infected	193	gi 225427213	276	6	mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier-like protein-like isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	30	9.58	27	9.50	Mitochondrion	Energy Metabolism
Infected	174	gi 225464866	238	8	momilactone A synthase-like [<i>Vitis vinifera</i>]	28	5.78	30	6.65	Cytoplasm	Resistance
Infected	168	gi 225459591	707	18	L-ascorbate peroxidase T, chloroplastic-like isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]	46	7.1	32	5.40	Chloroplast	Stress
Infected	70	gi 147844475	631	15	26S protease regulatory subunit 6A homolog [<i>Vitis vinifera</i>]	47	4.97	49	4.84	Chloroplast	Protein Metabolism
Infected	117	gi 225456880	203	9	elongation factor Tu, chloroplastic-like [<i>Vitis vinifera</i>]	52	6.25	48	7.14	Chloroplast	Resistance
Infected	109	gi 225456880	793	19	elongation factor Tu, chloroplastic-like [<i>Vitis vinifera</i>]	52	6.25	48	7.27	Chloroplast	Resistance
Infected		gi 225455934	377	15	ribulose bisphosphate carboxylase small chain, chloroplastic isoform 1 [<i>Vitis vinifera</i>]					Chloroplast	Stress
Infected	190	gi 73647738	313	6	ascorbate peroxidase [<i>Vitis pseudoreticulata</i>]	27	5.58	31	5.95	Chloroplast / Cytosol	Energy Metabolism.
Control	248	gi 225436257	258	5	chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	29	7.85	25	5.84	Chloroplast	Energy Metabolism.
Control	254	gi 147864201	204	4	hypothetical protein VITISV_039682 [<i>Vitis vinifera</i>]	26	8.62	24	5.97	Chloroplast	Energy Metabolism.
Infected	241	gi 225460496	270	6	ATP synthase delta chain, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>]	26	8.85	20	5.19	Chloroplast	Energy Metabolism

Note: DE means 'differentially expressed'. This spots presented a greater volume in the mentioned treatment.

Supplemental Material

Table S1: grapevine breeding lines resistant plants showing two resistance genes (RPV-3 and Rpv1). The markers are on chromosome 18 and 12 for downy mildew resistance. Chromosome 18 has two resistance alleles in heterozygosity and the markers are GF18 and GF18-06-08. The chromosome 12 alleles are heterozygotes and markers are Sc34_8 and Sc35_2.

Plant	Chromossome 18 (Rpv-3)		Chormossome12 (Rpv-1)	
	GF18-06	GF18-08	SC34-8	SC35-2
15	383.81 395.23	380.59 392.38	211.23 223.18	231.93 245.25
16	378.13 383.90	386.62 392.42	211.13 223.19	231.95 245.32

Table S2- primers used for RT-PCR

Nome	Sequencia	Tm
uncharacterized protein LOC100266227	Protein LEA	
	F: 5'GGTACTGGGTACACCATGAAAG3'	62
	P: ACACGCCTCAAGAAGGACAAAGGT R: CCTCATCGTCATCGTCATCTTC	68 62
momilactone A synthase-like	Protein Momilactone	
	F: 5'CGCGGATGCGTAATCAATTC3'	62
	P: AATCCCGCCAACCACTGAACAAAC R: CTACTGCAGTGTTCTGTTAG	68 62
L-ascorbate peroxidase T	Protein 21 Vitis	
	F: 5'GTCAGAGGCTATGAAGCAGAAG3'	62
	P:TATGAAGCAGTTGGTGGGAAGCCCA R:TAGTTGGACTGGAGAGGCTTAT	68 62
elongation factor-Tu	Protein 34 and 35 Vitis	
	F:5'CTAACCTCTCCTCCTCTTTCT3'	62
	P: CAGTAAACCCTCCACCACCTTCCTTT R: GCAGCTCGAACAGTGAAAGA	68 62
thioredoxin H-type-like	Protein 41 Vitis	
	F:5' GGAATCGTGGAAGGAGCAATTC 3'	63
	P: AGTCCAAGAACTGGTGGTGGTGG R: CTCTGCCAGAAATGGGCTAATG	68 63
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B-like	Protein 42 Vitis	
	F:5' CCGGCAGGAAGAATAGTTATAGG3	62
	P:ATGGAGATGATGCACCAGCTGGAG R: CCACTAACTAGGCCACTGAATC	68 62
universal stress protein A-like	Protein 2 Vitis	
	F:5'GAAGCTGGACTCTCTGGTTATG3'	62
	P:TGACCAACTATGTGATGACGAACGCA R: TGACGATGGTAACAGGACAAG	68 62
thaumatin-like protein (PR-5)	Protein 3 and 24 Vitis	
	F:5' TTCGATGCGTCAGGGAATG3'	62
	P:CTCCAATGCACGGCCTATGGTACA R: AATTCGGCTAAGGTGTTAGGG	68 62
hypothetical protein	Protein 38 Vitis	
F:5'TCGACTACCTCGATCTTCCTT3'	62	

VITISV_027855	P:AAGAAATCCACCGCGAAGCTCTCA	68
	R:CTTGGTAAAGTCAAACCGCATC	62
EFI	Protein EF1 α Vitis	
(controle	F: 5'CACCTCCCACATTGCTGTTA3'	62
interno)	P: AACTTGGGCTCCTTCTCAAGCTCC	68
	R: ACCCTGCATCACCATTCTTC	62
GAPDH	Protein GAPDH Vitis	
(controle	F: 5'ATGGCTTTCCGTGTTCTAC3'	62
interno)	PTGTTGATGTGTCGGTGGTTGACCT	68
	R CCTCCTTGATGGCAGCTTTA	62
UBQ	Protein UBQ Vitis	
(controle	F:5' CCTGCACTTACCATCTCTAAGG 3'	62
interno)	P: TGCTCTCCATCTGCTCATGCTGA	68
	R: CATGTGGGCAATCTCTGGTA	62

T_m- melting temperature

5. References

- Abad LR, D'Urzo MP, Liu D, Narasimhan ML, Reuveni M, Zhu JK, Niu X, Singh NK, Hasegawa PM, Bressen PA. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci.* 1996;118:11–23.
- Abramovitch RB, Janjusevic R, Stebbins CE, Martin GB. Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103:2851–2856.
- Amey RC, Schleicher T, Slinn J, Lewis M, Macdonald H, Neill SJ, et al. Proteomic analysis of a compatible interaction between *Pisum sativum* (pea) and the downy mildew pathogen *Peronospora viciae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 2008;1:41-55.
- Amey RC, Schleicher T, Slinn J, Lewis M, Macdonald H, Neill SJ, Spencer-Phillips PTN. Proteomic analysis of a compatible interaction between *Pisum sativum* (pea) and the downy mildew pathogen *Peronospora viciae*. *Eur. J Plant Pathol.* 2008;122:129.
- Andersen C.L. et al., “Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets”, *Cancer Res* 2004;64 5245-5250.
- Anzlovar S, Dermastia M. The comparative analysis of osmotins and osmotin-like PR-5 proteins. *Plant Biol.* 2003;5:116–124.
- Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004;55:373–399.
- Asada K, Takahashi M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis; in *Photoinhibition* (eds) D J Kyle, C B Osmond and C J Arntzen. Amsterdam: Elsevier; 1987.
- Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999;50:601–639.
- Basha SM, Mazhar H, Vasanthaiah HK. Proteomics approach to identify unique xylem sap proteins in Pierce's disease-tolerant *Vitis* species. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009;160:932–44.
- Basha SM, Mazhar H, Vasanthaiah HK. Proteomics approach to identify unique xylem sap proteins in Pierce's disease-tolerant *Vitis* species. *Appl Biochem Biotechnol* 2009;160:932–44.
- Berger S, Sinha AK, Roitsch T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* 2007;58: 4019– 4026.
- Bolwell PP, Page A, Pislewska M and Wojtaszek P. Pathogenic infection and the oxidative defenses in plants apoplast. *Protoplasma* 2001;217:20–32.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-54.

Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, San Diego 1976;72:248-254.

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

Ciccarelli FD, Bork P. The WHY domain mediates the response to desiccation in plants and bacteria. *Bioinform.* 2005:1304–1307.

Coll A, Nadal A, Rossignol M, Puigdomènech P, Pla M. Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields. *Transgenic Res* 2011, 4:939-949.

Chen SW, Zhang JW, Ma HQ, Chen S, Ji M, Perl A, et al. Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon-A proteomic approach. *Plant Sci* 2009;177:103–13.

Chen SW, Zhang JW, Ma HQ, Chen S, Ji M, Perl A, et al. Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon-A proteomic approach. *Plant Sci* 2009;177:103–13.

Chong J, Henanff L, Bertsch C, Walter B. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. *Plant Physiol. Biochem* 2008;46:469-481.

Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shenggiang Z, Oliver D J, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K and Mittler R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *Plant Cell* 2005;17:268–281.

Derckel JP, Audran J, Haye B, Lambert B, Legendre L. Characterization, induction by wounding and salicylic acid and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and b-1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiol. Plant.* 1998;104: 56– 64.

Dodds PN, Rafiqi M, Gan PH, Hardham AR, Jones DA, Ellis JG. Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytol* 2009;183: 993–1000.

El-kereamy A, El-sharkawy I, Ramamoorthy R, Taheri A, Errampalli D, Kumar P, Jayasankar S. *Prunus domestica* pathogenesis-related protein-5 activates the defense response pathway and enhances the resistance to fungal infection. *PLoS One.* 2011;6(3):e17973.

Fischer K, Webber A, Brink S, Arbinger B, Schünemann D, Borchert S, Heldt HW, Popp B, Benz R, Link TA. Porins from plants. Molecular cloning and functional characterization of two new members of the porin family. *The J. of Biolog. Chemes.* 1994;269:25754-25760.

Giribaldi M, Giuffrida MG. Heard it through the grapevine: proteomic perspective on grape and wine. *J Proteomics* 2010;73:1647–55.

- Grenier J, Potvin C, Trudel J, Asselin A. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric β -1,3-glucans. *Plant J.* 1999;19: 473–480.
- Hahn M, Mendgen K. Signal and nutrient exchange at biotrophic plant–fungus interfaces. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001;4: 322–327.
- Hasegawa M, Mitsuhashi I, Seo S, Imai T, Koga J, Okada K, et al. Phytoalexin accumulation in the interaction between rice and the blast fungus. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 2010;23:1000–1011.
- Horgan GW: Sample size and replication in 2D gel electrophoresis studies. *J Proteome Res* 2007, 6:2884-7.
- Huili Wang, Yanmei Yang, Wei Chen, Li Ding,^{1,2} Peizhen Li,¹ Xiaokai Zhao,¹ Xuedong Wang,² Aiyong Li,³ and Qiyu Bao. Identification of differentially expressed proteins of *Arthrospira* (*Spirulina*) *plantensis*-YZ under salt-stress conditions by proteomics and qRT-PCR analysis. *Proteome Sci.* 2013; 11: 16.
- Janjusevic R, Abramovitch RB, Martin GB, Stebbins CE. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science* 2006;311:222–226.
- Jianming Fu, Ivana Momčilović and P. V. Vara Prasad. Roles of Protein Synthesis Elongation Factor EF-Tu in Heat Tolerance in Plants. *Journal of Botany* Volume 2012 (2012), Article ID 835836, 8 pages.
- Jung Y-H, Lee J-H, Agrawal GK, Rakwal R, Kim J-A, Shim J-K, et al. The rice (*Oryza sativa*) blast lesion mimic mutant, *blm*, may confer resistance to blast pathogens by triggering multiple defense-associated signaling pathways. *Plant Physiol Biochem* 2005;43:397–406.
- Jurges G, Kassemeyer HH, Durrenberger M, Duggelin M, Nick P. The mode of interaction between *Vitis* and *Plasmopara viticola* Berk. & Curt. Ex de Bary depends on the host species. *Plant Biol.* 2009;11:886–898.
- Kamoun S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006;44: 41–60.
- Kato H, Kodama O, Akatsuka T, Oryzalexin E. A diterpene phytoalexin from UV irradiated rice leaves. *Phytochemistry* 1993;33:79–81.
- Kato-Noguchi H. Allelopathic substance in rice root exudates: rediscovery of momilactone B as an allelochemical. *J Plant Physiol* 2004;161:271–6.
- Kendzioriski C, Irizarry RA, Chen KS, Haag JD, Gould MN. On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;22;102(12):4252-4257.
- Kobayashi K, Shigemori H, Kato-Noguchi H. Allelopathic potential of *Hypnum plumaforme* L. and its allelopathic substances. In: *Fourth Asia-Pacific Conference in Chemical Ecology, from Biomolecules to Ecosystems an Interactive Chemical Message for our Future*; 2007. p. 77.

Kromina KA, Ignatov AN, Abdeeva IA. Role of Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerases in Pathologic Processes. *Membr Cell Biol* 2008;2:195–202.

Lamb C, Dixon RA. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 1997;48:251–275.

Latham GJ. Normalization of microRNA quantitative RT-PCR data in reduced scale experimental designs. *Methods Mol Biol.* 2010;667:19-31.

Lima A, Lima S, Wong JH, Phillips RS, Buchanan BB, Luan S. A redox-active FKBP-type immunophilin functions in accumulation of the photosystem II supercomplex in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2006;103: 12631–6.

Liu Y, Schiff M, Serino G, Deng XW, Dinesh-Kumar SP. Role of SCF ubiquitinligase and the COP9 signalosome in the *N* gene-mediated resistance response to *Tobacco mosaic virus*. *Plant Cell* 2002;14:1483–96.

Mauch F, Dudler R. Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 1993;102:1193–1201.

Milli A, Cecconi D, Bortesi L, Persi A, Rinalducci S, Zamboni A, Zoccatelli G, Lovato A, Zolla L, Polverari A. Proteomic analysis of the compatible interaction between *Vitis vinifera* and *Plasmopara viticola*. *J. Proteomics.* 2012;75(4):1284–1302.

Milli, D. Cecconi, L. Bortesi, A. Persi, S. Rinalducci, A. Zamboni, G. Zoccatelli, A. Lovato, L. Zolla, A. Polverari. Proteomic analysis of the compatible interaction between *Vitis vinifera* and *Plasmopara viticola*, *J. of Proteomics* 2012;75:1284–1302.

Mittler R. Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 2002;7:405–410.

Monteiro S, Barakat M, Picarra-Pereira MA, Teixeira AR, Ferreira RB. Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology* 2003;93:1505–1512.

Müller K, Sleumer H. Biologische Untersuchungen über die Peronosporakrankheit des Weinstocks mit besonderer Berücksichtigung ihrer Bekämpfung nach Inkubationsmethode. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Landwirtschaft* 1934;79:509–576.

Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 2002;53:1237–1242.

Nie L, Wu G, Culley DE, Scholten JC, Zhang W. Integrative analysis of transcriptomic and proteomic data: challenges, solutions and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2007;27(2):63–75.

Noctor G, Foyer CH. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1998;49:249–279.

Noji M, Saito M, Nakamura M, Aono M, Saji H, et al. Cysteine synthase overexpression in tobacco confers tolerance to sulfur-containing environmental pollutants. *Plant. Physiol.* 2001;126:973–980.

Nozaki H, Hayashi KI, Nishimura N, Kawaide H, Matsuo A, Takaoka D. Momilactone A and B as allelochemicals from moss *Hypnum plumaeforme*: first occurrence in bryophytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007;71:3127–30.

O'Connell RJ, Panstruga R. Tete a tete inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol.* 2006;171:699–718.

Olofsdotter M, Navarez D, Rebulanan M, Streibig JC, Weed Cartwright D, Langcake P, Pryce RJ, Leworthy DP, Ride JP. Chemical activation of host defense mechanisms as a basis for crop protection. *Nature* 1977;267: 511–3.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.

Polesani M, Bortesi L, Ferrarini A, Zamboni A, Fasoli M, Zadra C, Lovato A, Pezzotti M, Delledonne M, Polverari A. General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC Genomics.* 2010;11:117.

Ramagli, LS, Rodriguez, LV. Quantitation of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophor.* 1985; 6:559-563.

Salzman RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM, Bressan RA (1998) Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol.* 1998;117:465–472.

Selim M, Legay S, Berkelmann-Löhnertz B, Langen G, Kogel KH, Evers D. Identification of suitable reference genes for real-time RT-PCR normalization in the grapevine-downy mildew pathosystem. *Plant Cell Rep.* 2012 Jan;31(1):205-16.

Sharma N, Hotte N, Rahman MH, Mohammadi M, Deyholos MK, Nat NVK. Towards identifying Brassica proteins involved in mediating resistance to *Leptosphaeria maculans*: A proteomics-based approach. *Proteomics* 2008;8: 3516–3535.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996;68: 850-858.

Shimizu A T, Okada K, Kuzuyama T, Koga J, Shibuya N, et al. Elicitor induced activation of the methylerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. *Plant. Mol. Biol.* 2007;65:177–87.

Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002;99: 11640–11645.

Spagnolo A, Magnin-Robert M, Alayi TD, Cilindre C, Mercier L, Schaeffer-Reiss C, Van Dorselaer A, Clément C, Fontaine F. Physiological changes in green stems of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay in response to esca proper and apoplexy revealed by proteomic and transcriptomic analyses. *J. Proteome Res.* 2012;11(1):461-75.

Tamogami S, Kodama O. Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (*Oryza sativa* L.) in the same manner as jasmonic acid. *Phytochemistry* 2000;54:689–94.

Trapphoff T, Beutner C, Niehaus K, Colditz F. Induction of distinct defense-associated protein patterns in *Aphanomyces euteiches* (Oomycota)-elicited and –inoculated *Medicago truncatula* cell-suspension cultures: a proteome and phosphoproteome approach. *Mol Plant Microbe Interact* 2009;22:421–36.

Unger S, Büche C, Boso S, Kassemeyer HH. The course of the colonization of two different *Vitis* genotypes by *Plasmopara viticola* indicates compatible and incompatible host–pathogen interactions. *Phytopath.* 2007;97:781–786.

Valledor, L., Jorin, JV. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. *J. Proteomics* 2010;74, 1-18.

Weiss W, Gorg A. Sample solubilization buffers for two-dimensional electrophoresis. In: *Methods in Molecular Biology-2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation*. Edited by Posh A. New Jersey: A Humana Press; 2008::35-42.

Wirtz M, Berkowitz O, Droux M, Hell R. The cysteine synthase complex from plants. *Eur. J Biochem.* 2001;268, 686–693.

Yamada A, Shibuya N, Kodama O, Akatsuka T. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultures rice cells by N-acetylchitoooligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993;57:405–9.

Considerações finais e perspectivas futuras

O presente trabalho analisou parâmetros bioquímicos, histopatológicos e moleculares envolvidos no mecanismo de defesa da interação de diferentes variedades de videiras, ao patógeno *Plasmopara viticola*. Foi possível observar diferenças no grau de resistência entre as mesmas por meio das técnicas utilizadas nesse trabalho. As análises histológicas mostraram o comportamento do patógeno e do hospedeiro em variedades de videiras contrastantes em relação a resistência ao mildio. Para as var. Bordô (resistente) e Cabernet Sauvignon (suceptível), foram detectadas as características mais relevantes para o estabelecimento ou não da compatibilidade dessa interação. A planta inicia um mecanismo de defesa após o primeiro contato planta-patógeno, que ocorre com a tentativa de penetração dos haustórios nas células da lamina foliar do hospedeiro. Na var. Cabernet Sauvignon por meio da MEV foi possível observar todas as etapas do desenvolvimento do *P. viticola* tanto na superfície quanto no interior das células. Constatou-se que essa variedade é completamente suscetível sem desenvolver qualquer mecanismo estrutural ou bioquímico de reação contra o patógeno. Resultados das análises de proteômica suportam as observações anteriores uma vez quando contrapostas plantas inoculadas com plantas não inoculadas com o patógeno a análise de PCA demonstra que elas são semelhantes em relação aos *spots* formados e dessa forma acredita-se que as plantas inoculadas não são capazes de modular proteínas suficientes relacionados ao mecanismo de defesa. Contudo informações mais precisas quanto a isto somente serão obtidas após o sequenciamento do perfil das proteínas, o que se sugere seja feito.

Diferentemente da variedade suscetível, a var. Bordô revelou um amplo arsenal de respostas de resistência observadas tanto nas análises histopatológicas quanto nas análises proteômicas. Essa variedade apresentou resistência estrutural basal associada à pilosidade, bem como alterações metabólicas. Foi possível observar nos estudos histopatológicos uma desorganização da estrutura do patógeno, com degradação de membrana e desorganização celular das hifas. Da mesma forma o comportamento do patógeno para essa var. foi diferente quando comparado a variedade suscetível, observando-se orientação perturbada do patógeno para penetração pelos estômatos. No entanto, apesar de desenvolver mecanismos importantes relacionados à resistência, a lamina foliar da var. Bordô apresentou pontos de necrose, sugerindo um mecanismo incompleto de resistência ou mesmo uma resposta de hipersensibilidade, não objeto do presente estudo, mas cuja abordagem é recomendada.

Associado a essas informações as análises proteômicas também remetem a uma resposta tardia, com separação do tempo mais tardio de infecção dos demais tratamentos por análise de PCA, bem como maior expressão das proteínas no último tempo analisado com modulação principalmente das proteínas relacionadas ao metabolismo energético. Essa categoria de proteínas também foi mais expressiva para a linhagem de videira contendo o locus de resistência Rpv1 e Rpv3 piramidados. No entanto para essas plantas a modulação dessas proteínas foi mais precoce quando comparada a var. Bordô. Estudo anterior relacionado a essa interação videira-*P. viticola* infere que a modulação dessa categoria de proteínas é decisivo para estabelecimento de uma resistência eficiente. No entanto o tempo exato para essa modulação parece ser crucial para estabelecimento de uma resistência completa.

Essa linhagem de videiras resistentes, não apresentou nenhum sintoma (mancha de óleo, necrose) e associado aos resultados de proteômica acredita-se que essas plantas são totalmente resistentes ao patógeno. No entanto análises histológicas seriam relevantes para melhor compreender a interação incompatível desse patossistema.

Essa linha de pesquisa é recente no Laboratório de Fisiologia e Genética do Desenvolvimento Vegetal do Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais do CCA/UFSC e seus primeiros e promissores resultados são aqui apresentados. Esse trabalho abre novas perspectivas de futuros trabalhos, com objetivo de além de estudar os mecanismos de resistência que envolve essa interação, visa desenvolver novas linhagens de videiras

resistentes ao referido patógeno e que ao mesmo tempo apresentem características relevantes para a produção de vinhos de qualidade.