

# Comunicado 162

---

## Técnico

ISSN 9192-0099  
Setembro, 2007  
Brasília, DF

### ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE ALGODOEIRO RESISTENTE E SUSCEPTÍVEL INFECTADAS COM *Meloidogyne incognita*

Rocha, T.L.<sup>1</sup>  
Costa, P.H.A.<sup>1,2</sup>  
Magalhães, J.C.C.<sup>1</sup>  
Carneiro, R.M.D.G.<sup>1</sup>  
Oliveira Neto, O. B.<sup>1</sup>  
Souza, D.S.L.<sup>1</sup>  
Firmino, A.A.P.<sup>2</sup>  
Fragoso, R.R.<sup>3</sup>  
Vasconcelos, E.A.R.<sup>2</sup>  
Cia, E., Grossi-de-Sá, M.F.<sup>1</sup>

#### RESUMO

Nas últimas décadas, o consumo mundial de algodão tem crescido consideravelmente. Contudo, a produção dessa cultura é afetada por grandes perdas causadas por pragas, dentre as quais se destacam os nematóides do gênero *Meloidogyne*. Atualmente, há um grande esforço na busca de novas alternativas para o controle desse fitopatógeno. Uma estratégia muito promissora é a tecnologia proteômica. Com o objetivo de identificar as proteínas relacionadas ao mecanismo de resistência do algodão, um estudo proteômico comparativo das raízes de genótipos de algodão resistente e susceptível ao nematóide *Meloidogyne incognita* foi realizado. Plantas com aproximadamente dois meses foram infectadas com 20.000 J2 e, após 5 e 15 dias, suas raízes foram coletadas. Três diferentes métodos de preparação de amostras protéicas para eletroforese bidimensional foram testados. Os resultados demonstraram a presença de várias proteínas com diferentes níveis de expressão entre os genótipos susceptível e resistente. A análise dos *spots* diferenciais via espectrometria de massa demonstrou a presença da quinona reductase 2, uma enzima ativada em situações de estresse oxidativo.

---

<sup>1</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup> UnB - Universidade de Brasília

<sup>3</sup> Embrapa Cerrados

## INTRODUÇÃO

A demanda brasileira e mundial das indústrias têxteis pela fibra do algodão vem crescendo acentuadamente. No entanto, o Brasil passou da situação de um dos maiores exportadores para a condição de um dos países que mais importam este produto agrícola (REETZ *et al.*, 2006). A recuperação da posição de destaque do Brasil na produção mundial de algodão tem sido dificultada por diversos fatores, entre os quais as constantes perdas de produção ocasionadas pelo o ataque de pragas. A infecção causada por fitonematóides pode ser considerada um dos mais importantes estresses bióticos que afetam diversas culturas, e o nematóide das galhas (*Meloidogyne incognita*) é a principal espécie que infecta o algodoeiro. Os juvenis de segundo estágio (J2) deste fitopatógeno infectam as raízes, formando pequenas galhas, necroses, desvios de nutrientes, que causam a atrofia geral das plantas. Na parte aérea, um sintoma freqüentemente induzido pelo parasita é a formação do 'carijó' (clorose internerval) nas folhas (SILVA *et al.*, 1997). Esses autores verificaram que a capacidade produtiva do algodoeiro é reduzida significativamente com o aumento do 'carijó', sobretudo quando o sintoma ocorre também nos ponteiros das plantas. Embora alguns genótipos de algodoeiro resistentes a *M. incognita* tenham sido desenvolvidos nos últimos 30 anos via melhoramento clássico, um alto nível de resistência raramente foi incorporado a cultivares comercialmente viáveis (STARR *et al.*, 2002). Atualmente, há um grande esforço para se controlar a ação desse fitopatógeno. Um enfoque muito promissor para atingir esse objetivo é a tecnologia proteômica, na qual a expressão das proteínas pode ser analisada

em larga escala. Até hoje, há poucos relatos sobre a análise proteômica radicular em algodoeiro. Tal fato se deve, principalmente, à presença de grande quantidade de polímeros, como o gossipol, que interfere na separação das proteínas por focalização isoeétrica, assim como a baixa concentração de proteínas presentes em raízes, quando comparadas a outros tecidos da planta – como, por exemplo, folha e semente. Com o objetivo de identificar proteínas relacionadas aos mecanismos de resistência das plantas aos nematóides, um estudo comparativo das raízes de genótipos de algodão susceptível e resistente foi realizado, por meio de eletroforese bidimensional (2-DE). Os genótipos foram analisados nos períodos de 5 e 15 dias após a inoculação de J2 *M. incognita*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Extração de nematóides e inoculação das plantas.*

Para a obtenção dos J2 de *M. incognita*, raízes de tomateiro infectadas, apresentando grande número de galhas, foram lavadas com H<sub>2</sub>O e trituradas em hipoclorito de sódio 0,5%. O material resultante foi peneirado e os ovos colocados para eclodir. Após a eclosão, os J2 foram centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 × g, coletadas e contadas em câmara de Newbauer (HUSSEY & BARKER, 1973). As plantas de algodão, linhagem resistente IAC02-2190 ([www.iac.sp.gov.br](http://www.iac.sp.gov.br) / [cia@iac.sp.gov.br](mailto:cia@iac.sp.gov.br)) e a variedade susceptível COODETEC 401 ([www.coodetec.com.br](http://www.coodetec.com.br)), com cerca de 30cm de altura e dois meses de idade, cultivadas em sacos plásticos contendo solo autoclavado, foram infectadas com aproximadamente 20.000 J2. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e as raízes

foram coletadas nos períodos de 5 e 15 dias após a inoculação. Como controles, foram usadas plantas da mesma idade não infectadas com nematóides. As raízes foram rapidamente lavadas com água corrente, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas com o uso de almofariz e pistilo.

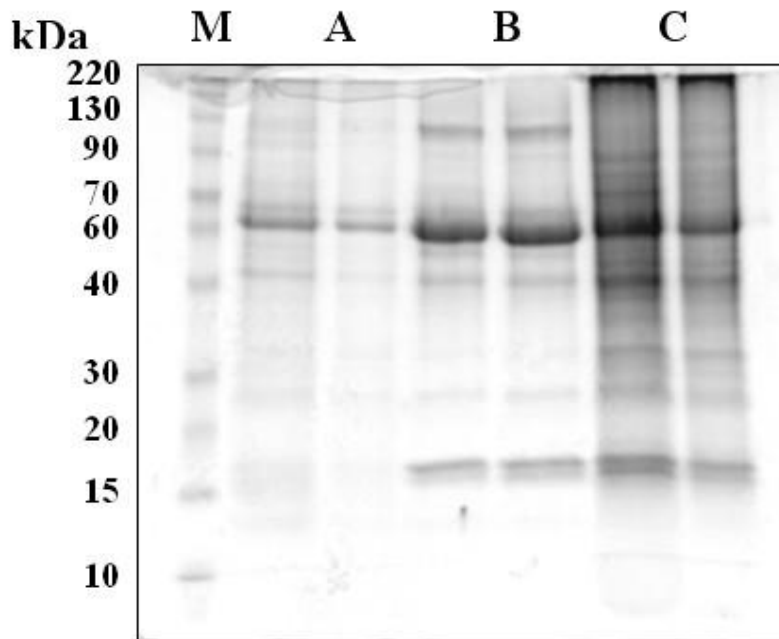
#### *Extração das proteínas e eletroforese bidimensional*

O material vegetal macerado foi homogeneizado em tampão de extração na proporção 1:3 (p/v) sob agitação leve, durante 2 horas, a 4° C. Três tampões de extração foram testados: (A) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM pH 7,0, NaCl 20mM, PMSF 2mM, DTT 10mM; (B) Piridina 50mM pH 5,0, SDS 1%, tiourea 20mM; (C) Tris-HCl 40mM pH 7,5, sacarose 250mM, Triton X-100 1%, EDTA 10mM, PMSF e DTT 1mM. Os extratos foram centrifugados a 10.000 × g durante 45 min a 4° C. Os sobrenadantes foram homogeneizados com TCA 10% em acetona gelada e as proteínas foram precipitadas durante a noite, de acordo com o método descrito por DAMERVAL *et al.*, (1986). Para a eletroforese 2-D, as proteínas foram solubilizadas em solução de urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, IPG Buffer 2% e DTT 0,3%. Cerca de 200 µg de proteínas foram aplicados em tiras IPG de 18cm, pH 3-10. A focalização isoeétrica foi realizada no sistema Multiphor II (GE Healthcare) e a segunda dimensão no sistema ETTAN DaltSix (GE Healthcare), seguindo as recomendações do

fabricante (BERKELMAN & STENSTED, 1998). Após a corrida, os géis 2-DE foram corados com Coomassie Coloidal e digitalizados com resolução de 300 dpi num scanner ScanJet 4100C (HP). As comparações dos géis foram feitas por inspeção visual. Os spots diferenciais foram excisados dos géis, digeridos com tripsina – de acordo com o método descrito por SHEVCHENKO *et al.*, (1996) – e analisados por MALDI-ToF MS/MS.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Estudos bioquímicos com algodoeiro são difíceis de serem realizados, principalmente devido à grande presença de gossipol. Com o objetivo de se estabelecer uma metodologia simples e prática para análise proteômica em algodoeiro, foram testados alguns tampões de extração de proteínas. O tampão C, descrito anteriormente, foi o que apresentou melhor resultado, com um maior número de bandas visualizadas em gel SDS-PAGE (Figura1).



**Figura1.** SDS-PAGE (12,5%) – (M) Bench Marker; Proteínas de raízes de algodoeiro linhagem IAC022190 e variedade COODETEC 401 extraídas com tampão (A)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50mM pH 7,0, NaCl 20mM, PMSF 2mM, DTT

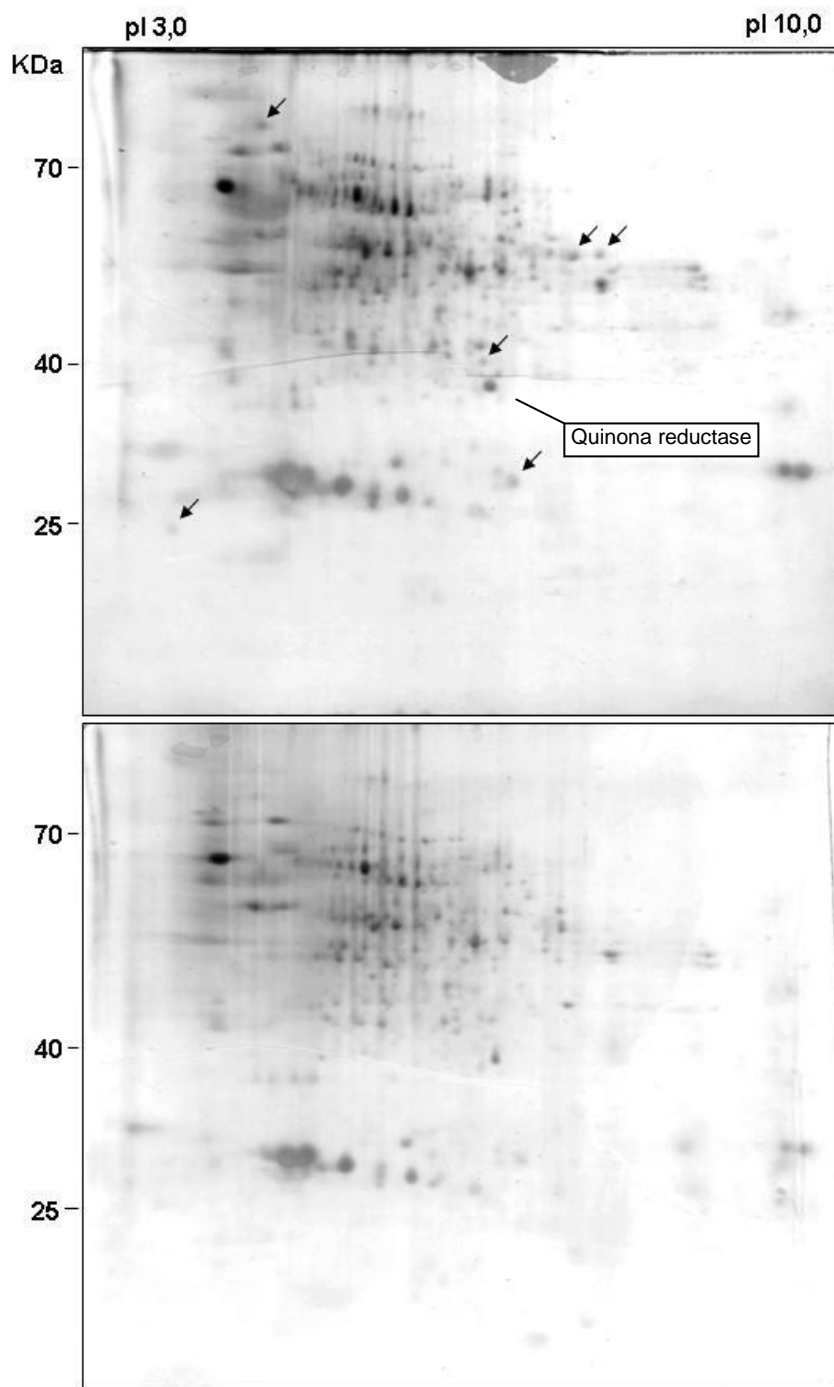
10mM; (B) Piridine 50mM pH 5,0, SDS 1%, thiourea 20 mM; (C) Tris-HCl 40mM pH 7,5, sucrose 250 mM, Triton X-100 1%, EDTA 10 mM, PMSF e DTT 1 mM

Após a escolha do tampão de extração de proteínas, foram realizadas as eletroforeses bidimensionais (2-DE). Para tanto, foi necessária a eliminação de interferentes da focalização isoeétrica, tais como sais, lipídios e carboidratos, de maneira a tornar a extração das proteínas compatível com a técnica 2-DE. Resultados satisfatórios foram obtidos com o protocolo de precipitação das proteínas com TCA e acetona decrito por DAMERVAL *et al.*, (1986). Os padrões eletroforéticos bidimensionais das plantas infectadas com nematóides foram, então, comparados aos controles (não-infectados) com relação à presença ou ausência de spots, bem como o aumento ou a redução de suas concentrações relativas nos géis, o que representam em última instância os níveis de expressão gênica. Como pode ser observado a maior

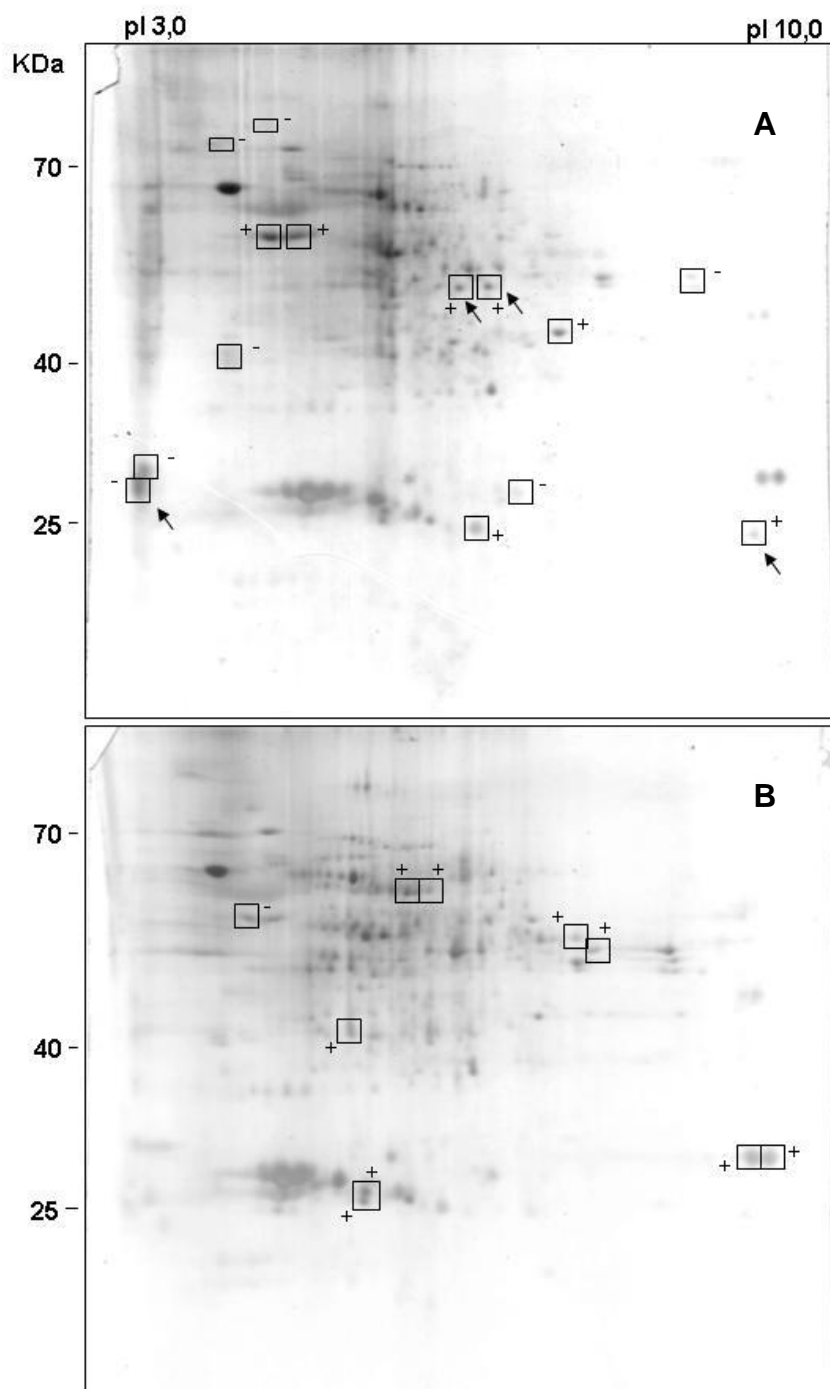
parte dos spots detectados se concentram na faixa de pH 4 a 7 e pesos moleculares entre 25 e 70 kDa (Figuras 2, 3 e 4). Em geral, foi possível detectar cerca de 150 spots nos géis 2D. Fazendo-se uma comparação dos perfis protéicos 2D entre os dois genótipos, pode-se observar 14 spots diferenciais, ou seja, spots presentes apenas no genótipo resistente ou em maior concentração neste, independente da infecção com nematóides, os quais estão indicados com setas nas figuras 2, 3 e 4. Possivelmente, alguns destes spots podem ser proteínas envolvidas no mecanismo constitutivo de resistência deste genótipo. Em relação às plantas controle não infectadas com nematóides, nove proteínas apresentaram um aumento de expressão após cinco dias da infecção e cinco proteínas apresentaram redução da expressão nas

raízes da linhagem resistente de algodoeiro (Figura 3). Depois de 15 dias da infecção, foram observadas 15 proteínas com expressão aumentada (Figura 4). Para a variedade suscetível, foram observadas no quinto dia da infecção nove proteínas com aumento e uma com redução de expressão em relação ao controle (Figura 3). No décimo quinto dia

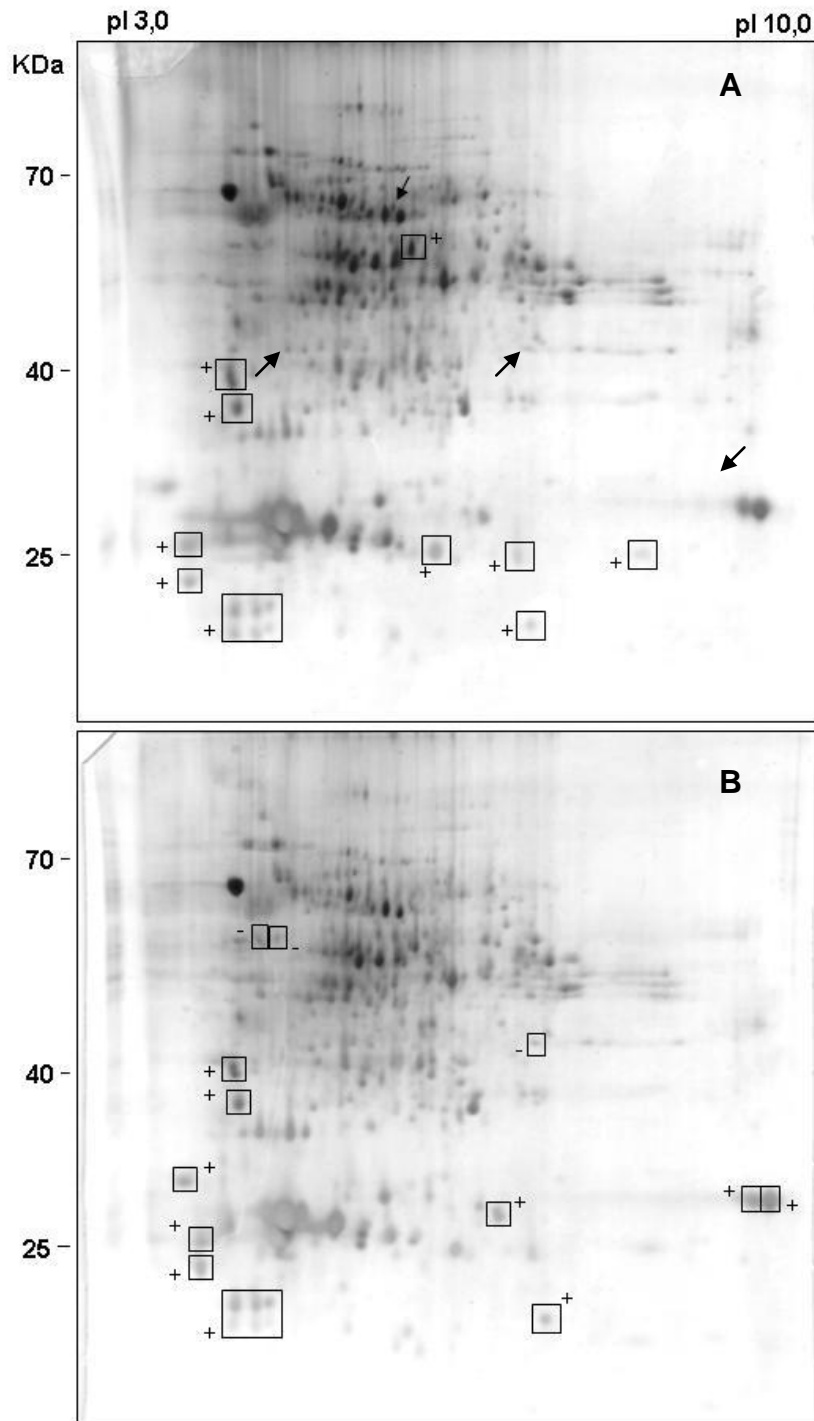
após a infecção, foram observadas 15 proteínas com aumento e três com redução de expressão (Figura 4). Aumentos da expressão protéica em resposta a infecção por *M. incognita* podem estar envolvidos no mecanismo de resistência induzida, em que diversas proteínas relacionadas à patogênese



**Figura 2.** Eletroforese bidimensional de raízes de algodoeiro resistente (A) e susceptível (B) não inoculadas com J2 (Controle). As setas indicam spots diferenciais entre os genótipos resistente e susceptível.



**Figura 3.** Eletroforese bidimensional de raízes de algodoeiro resistente (A) e susceptível (B) após 5 dias da inoculação de J2. Os quadrados indicam spots com aumento (+) ou diminuição (-) da concentração relativa em comparação ao controle. As setas indicam spots diferenciais entre os genótipos resistente e susceptível.



**Figura 4:** Eletroforese bidimensional de raízes de algodoeiro resistente (A) e susceptível (B) após 15 dias da inoculação de J2.

Os quadrados indicam spots com aumento (+) ou diminuição (-) da concentração relativa em comparação ao controle. As setas indicam spots

diferenciais entre os genótipos resistente e susceptível.(proteínas PR), tais como inibidores de proteinases, quitinases,



peroxidases, etc, podem estar atuando (FERRY *et al.*, 2004).

É possível que a indução dos genes *PR* ocorra mais precocemente no genótipo resistente, impedindo o desenvolvimento do nematóide após a sua penetração no sistema radicular. Para averiguar a hipótese de que os spots diferenciais estão envolvidos nos mecanismos constitutivos e/ou indutivos de resistência, esses spots foram excisados dos géis e digeridos com tripsina na tentativa de se identificar as proteínas por MALDI-ToF MS/MS. Entretanto, obter espectros de massas com qualidade e intensidade suficientes para o seqüenciamento dos fragmentos tripticos. Apenas um spot, indicado na Figura 1, apresentou este requerimento e foi identificado como uma Quinona Redutase 2 (QR2, EC 1.6.99.2). Foi possível seqüenciar todo o fragmento, que continha 24 resíduos de aminoácidos. A seqüência obtida foi TDAPIITLVELTEADGVLFGFPTR e apresentou 82,6% de identidade com a quinona reductase 2 de *Triticum monococcum*. Pelo menos dois tipos de quinona reductase estão presentes nas plantas: (1) a “zeta-crystallin-like quinone reductases” (QR1, EC 1.6.5.5), que catalisa a redução univalente das quinonas para radicais semiquinona, e (2) a “DT-diaphorase-like quinone reductases” (QR2), que catalisa a redução divalente das quinonas para hidroquinonas (MANO *et al.*, 2000). Acredita-se que a QR2 seja induzida em situações de estresse oxidativo, oferecendo uma proteção contra a formação de radicais livres.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Apesar da baixa concentração de proteínas presentes nas raízes, este trabalho permitiu o

estabelecimento de um protocolo eficiente na preparação de amostras de raízes de algodoeiro para a realização da eletroforese bidimensional. Além disso, a abordagem proteômica se mostrou muito promissora na identificação de novas moléculas de interesse biotecnológico, como as aqui estudadas, que podem servir como ferramentas no desenvolvimento de plantas resistentes a pragas. Melhorias no preparo das amostras para MS estão atualmente sendo realizadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERKELMAN, T., STENSTED, T. **2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: principles and methods**. Edition AC (80-6429-60). Uppsala, Sweden: Amersham Biosciences Inc., 1998. Manual do fabricante. 100 p.
- DAMERVAL, C., DE VIENNE, D., ZIVY, M., THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, p. 52-54, 1986.
- FERRY, N., EDWARDS, M.G., GATEHOUSE, J.A., GATEHOUSE, A.M.R. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 155-161, 2004.
- HUSSEY, R.S., BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Report**, v. 57, p. 1025-1028, 1973.
- MANO, J., BABIYCHUK, E., HIRATAKE, J., KIMURA, A., INZÉ, D., KUSHNIR, S., ASADA,

K. A novel NADPH:diamide oxidoreductase activity in Arabidopsis thaliana P1  $\zeta$ -crystallin. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 3661-3671, 2000.

REETZ, E.; VENCATO, Â.; CORRÊA, S.; RIGON, L.; ROSA, G.R.; RUDOLFO, R.B. Anuário brasileiro do algodão 2006. **Editora Gazeta**, 144p, 2006.

SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.

**Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850-858, 1996.

SILVA, N.M., FUZATTO, M.G., KONDO, J.L., SABINO, J.C., PETTINELLI JUNIOR, A., GALLO, P.B. A adubação nitrogenada e o sintoma de nematóides no algodoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 21, p. 693-697, 1997.

STARR, J.L.; COOK, R.J.; BRIDGE, J. Plant Resistance to Parasitic Nematodes. **CABI Publishing**, 2002. 256p.

**Comunicado  
Técnico, 162**

**Ministério da  
Agricultura,  
Pecuária  
e  
Abastecimento**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W/5  
Norte (Final) – Brasília, DF CEP  
70770-900 – Caixa Postal 02372  
PABX: (61) 3448-4673 Fax: (61)  
3340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

1ª edição  
1ª impressão (2007):

**Comitê de  
Publicações**

**Presidente:** Sergio Mauro Folle  
**Secretário-Executivo:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** Arthur da Silva Mariante  
Maria da Graça S. P. Negrão  
Maria de Fátima Batista  
Maurício Machain Franco  
Regina Maria Dechechi Carneiro  
Sueli Correa Marques de Mello  
Vera Tavares de Campos Carneiro

**Expediente**

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça S. P. Negrão*  
Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*  
**Editoração eletrônica:** *Daniele Alves Loiola*