

Boletim de Pesquisa 210
e Desenvolvimento ISSN 1676 - 340
Dezembro, 2007

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE
PROTEÍNAS EM RAÍZES DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna*
unguiculata) INFECTADAS COM O NEMATÓIDE
Meloidogyne incognita



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 210

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE
PROTEÍNAS EM RAÍZES DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna
unguiculata*) INFECTADAS COM O NEMATÓIDE
*Meloidogyne incognita***

Patrícia Caetano

Celso G. Santana

Regina M. D. Carneiro

Maria Fátima Grossi de Sá

José Tadeu A. Oliveira

Angela Mehta

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2007

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) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Marante*
Maria de Fátima Batista
Maurício Machain Franco
Regina Maria Dechechi Carneiro
Sueli Correa Marques de Mello
Vera Tavares de Campos Carneiro
Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*
Normalização Bibliográfica: *Maria Lara Pereira Machado*
Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

- O 88 Otimização de protocolos para extração de proteínas em raízes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) infectadas com o nematóide *Meloidogyne incognita*. / Patrícia Caetano ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.
10 p. : il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 210)
1. Controle biológico. 2. Melhoramento vegetal. 3. *Vigna unguiculata*. 4. Feijão. 4. *Meloidogyne incognita*. 5. Nematóide. I. Caetano, Patrícia. II. Série.

632.96 – CDD 21.

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EM RAÍZES DE FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata*) INFECTADAS COM O NEMATÓIDE *Meloidogyne incognita*

Patrícia Caetano¹
Celso G. Santana²
Regina M. D. Carneiro²
Maria Fátima Grossi de Sá²
José Tadeu A. Oliveira³
Angela Mehta²

Resumo

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) tem uma grande importância agrônômica e principalmente nutricional para o Brasil. Porém, a ação de patógenos, principalmente nematóides, representa um fator limitante para sua exploração. A infecção por *Meloidogyne incognita* constitui uma grande barreira na produção de feijão-caupi e de outras culturas. Este trabalho teve como objetivo a comparação de dois métodos para a extração de proteínas de genótipos de feijão-caupi resistente (CE 31) e suscetível (CE 109) a *M. incognita*. As raízes das plantas foram inoculadas com aproximadamente 5.000 juvenis de *M. incognita* e coletadas 3, 6 e 10 dias após a infecção. A infectividade foi avaliada 60 dias após a inoculação por meio da coloração com floxina B para contagem de massas de ovos. As raízes do genótipo suscetível apresentaram mais de 100 massas de ovos, enquanto que as raízes do genótipo resistente apresentaram 24 massas de ovos. Proteínas totais das raízes infectadas foram extraídas por meio de dois métodos distintos e submetidas à eletroforese bidimensional. A análise dos géis revelou proteínas diferentes utilizando os dois métodos, indicando que mais de uma metodologia deve ser empregada para maximizar o número de proteínas analisadas. A identificação dessas proteínas por análises de espectrometria de massa poderá revelar proteínas importantes para o processo de resistência a *M. incognita*.

¹ Faculdades Integradas da Terra de Brasília

² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

³ Universidade Federal do Ceará.

Abstract

In Brazil, cowpea beans (*Vigna unguiculata*) has a great agronomic and mainly nutritional importance. However, the action of pathogens, mainly nematodes, represents a limiting factor for its exploration. The infection by *Meloidogyne incognita* constitutes an important barrier for the production of beans and other cultures. The objective of this work was to analyze two different methods for proteins extraction of cowpea resistant (CE 31) and susceptible (CE 109) genotypes in response to *M. incognita* infection. The roots were inoculated with approximately 5000 juveniles (J2) of *M. incognita* and collected 3, 6 and 10 days after the infection. The infectivity was evaluated 60 days after the inoculation by the staining with floxin B to count the egg masses. The roots of the susceptible genotype presented more than 100 egg masses, while the roots of the resistant genotype presented 24 egg masses. Total proteins of the infected roots were extracted and analyzed by bidimensional electrophoresis. The analysis of the 2D maps revealed different proteins when using the two methods, indicating that more than one extraction methods should be used in order to maximize the number of proteins analyzed. The identification of these proteins by mass spectrometry may reveal important proteins involved in the resistance to *M. incognita*.

Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), também conhecido como feijão-de-corda, é uma leguminosa muito utilizada na alimentação humana, cultivada principalmente nas regiões semi-áridas do Nordeste brasileiro. *V. unguiculata* é uma espécie bem adaptada às condições de clima e solo da região e possui uma grande variabilidade genética, que a torna bastante versátil (Teixeira *et al.*, 1988). O feijão-caupi representa a fonte básica da alimentação das populações mais pobres, exercendo importante função social no suprimento das necessidades nutricionais das classes sociais menos favorecidas (Cordeiro, 1998). Quando cultivado em condições ótimas, algumas cultivares de feijão-caupi podem produzir até 2600 Kg por hectare. Entretanto, muitos fatores afetam a produtividade desta leguminosa (Lima, 1988) e entre esses fatores pode-se destacar a meloidoginose, causada pelo nematóide *Meloidogyne incognita*.

O nematóide das galhas (*M. incognita*) ataca as raízes das plantas e em conseqüência desse ataque, o sistema radicular torna-se ineficiente na absorção de nutrientes e água, conseqüentemente reduzindo o porte e vigor das plantas. As folhas de plantas infectadas podem apresentar tamanho menor e coloração anormal, sintomas parecidos com deficiência nutricional. Isso resulta na diminuição da produção e, por conseguinte a inviabilidade da exploração econômica.

Embora as espécies parasitas de planta representem uma minoria no Filo Nematoda, seu efeito no rendimento da colheita e na produção do alimento é dramático. Os nematóides são muito melhor equipados para encontrar um hospedeiro e para estabelecer um relacionamento parasítico do que muitos outros invasores de plantas (Gheysen & Fenoll, 2002). Esses nematóides são difíceis de combater porque vivem principalmente no subsolo e são protegidos freqüentemente nas raízes ou nos cistos. Em decorrência dos efeitos adversos associados aos nematicidas químicos, o uso de plantas resistentes é considerado atualmente a forma mais desejável para controlar os nematóides das galhas (Bailey, 1941).

Poucos estudos têm sido realizados para a análise da expressão gênica global de raízes infectadas por nematóides. Embora genes envolvidos com a resistência a nematóides já tenham sido identificados (Ernst *et al.*, 2002; De Majnik *et al.*, 2003; Thurau *et al.* 2003; Seah *et al.*, 2004; Poch *et al.*, 2006), os mecanismos de resistência ainda não são bem compreendidos. Além disso, estudos de expressão de proteínas durante a interação planta-nematóide ainda não foram relatados.

Uma das estratégias para realizar a análise da expressão de proteínas de um organismo é através do estudo do proteoma. Esta abordagem tem sido muito utilizada e explora a alta

capacidade de resolução da eletroforese bidimensional (2-DE) (Jungblut & Wittmann – Liebold, 1995). As análises de genoma acopladas a estudo das proteínas revelam informações importantes sobre a expressão, regulação e modificações na transcrição e tradução (Jungblut & Wittmann – Liebold, 1995).

O objetivo deste trabalho foi comparar dois métodos de extração de proteínas, visando a obtenção de um método adequado para a análise da expressão de proteínas na interação feijão-caupi-nematoide.

Material e Métodos

1. Obtenção dos nematóides, extração de ovos, eclosão de juvenis

M. incognita foram mantidos em tomateiros em casa de vegetação. Para a obtenção dos nematóides, o sistema radicular dos tomateiros foi lavado com água corrente e as raízes foram trituradas no liquidificador com solução de 0,5% (v/v) de hipoclorito de sódio. O material resultante foi separado por um conjunto de 3 peneiras de 20 a 500 mesh. Os ovos retidos na terceira peneira (500 mesh) foram coletados e depois depositados em papel toalha sobre uma peneira plástica dentro de um recipiente com água destilada. Após a eclosão, os juvenis foram então coletados por centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos e contados para a infestação das plantas de feijão-caupi.

2. Inoculação das plantas, coleta das raízes e teste de infectividade

As plantas de feijão-caupi dos genótipos CE31 (resistente) e CE109 (suscetível) foram infectadas com aproximadamente 5000 juvenis de *M. incognita*. As coletas das raízes infectadas foram realizadas 3, 6 e 10 dias após a inoculação. Todas as raízes coletadas receberam o mesmo procedimento de limpeza e conservação: lavagem com água destilada, congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento a - 80°C.

Aproximadamente 60 dias após a inoculação, as raízes de plantas infectadas foram coletadas e foi realizada a coloração com floxina B (15mg/L) para a avaliação da infectividade através da contagem das massas de ovos.

3. Extração de proteínas

As raízes coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido e utilizadas para extração de proteínas totais conforme De Mot & Vanderleyden (1989) e também de acordo com o método descrito por Xie *et al.* (2007). Para a extração de proteínas utilizando a metodologia descrita por De Mot & Vanderleyden (1989), foram adicionados em

aproximadamente 0.5g de tecido macerado 750ul de tampão de extração (0,7 M sacarose; 0,5 M Tris; 0,07 M HCl; 0,05 M EDTA; 0,1 M de KCl). A amostra foi mantida por 15 min a temperatura ambiente e posteriormente foram adicionados 750 ul de fenol. Os tubos foram submetido à agitação em vórtex por 15 min e posteriormente à centrifugação por 3 min. Este procedimento foi repetido 3 vezes e em seguida as proteínas foram precipitadas em 5 volumes de acetano de amônio em metanol.

O método descrito por Xie *et al.* (2007) envolveu a utilização de aproximadamente 0.5 g de tecido para cada 1 ml de tampão de extração (0,1M KCl; 0,5 M Tris HCl pH 7,5; 0,5M EDTA pH 7,5; 2 % β -mercapto; 10ug/ml de PMSF). O material obtido foi homogeneizado em polítron e posteriormente mantido sob refrigeração e agitação por 2 horas. Em seguida, foi realizada a centrifugação por 15 min (10°C, 14000 rpm). O sobrenadante foi recuperado e adicionou-se um mesmo volume de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico na proporção de 24:1). Novamente os tubos foram mantidos sob refrigeração e agitação por 30 min. Foi realizada centrifugação por 2 min, a fase inferior foi recuperada e a superior foi descartada. À interfase, foram adicionados água mili-Q e um mesmo volume de clorofil e os tubos foram mantidos no gelo por 10 min e em seguida centrifugados por 2 min para precipitação das proteínas. As proteínas da fase inferior foram precipitadas com 5 volumes de acetona 100%. As proteínas obtidas foram hidratadas com tampão (Urea 8 M; CHAPS 2%) e armazenados a -20° C.

4. Eletroforese bidimensional

As proteínas obtidas com os dois métodos de extração foram solubilizadas e utilizadas para a hidratação das *strips* de 11cm pH 4-7 por 16h. Após este procedimento, foi realizada a eletroforese de 1ª dimensão utilizando o sistema Multiphor II (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida 10% e a eletroforese foi executada em um sistema vertical de acordo com Laemmli (1970). Os géis obtidos foram visualizados após a coloração com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987).

Resultados e Discussão

Neste estudo, foi realizada a comparação entre dois métodos distintos para extração de proteínas em raízes dos genótipos resistente (CE31) e suscetível (CE109) de feijão-caupi infectados com *M. incognita*.

Inicialmente foram realizados testes de infectividade por meio da contagem das massas de ovos. Aproximadamente 2 meses após a infecção, as raízes dos genótipos suscetível e resistente foram coletadas e coradas com floxina B, para verificar o nível de infecção

ocorrido pelos nematóides. Após a coloração com floxina B, foi observado que as raízes do genótipo suscetível apresentaram mais de 100 massas de ovos, enquanto que as raízes do genótipo resistente apresentaram 24 massas de ovos (Figura 1). Desta forma, ficou confirmada a infecção das plantas pelos nematóides. Em seguida, as plantas coletadas foram utilizadas para extração de proteínas.

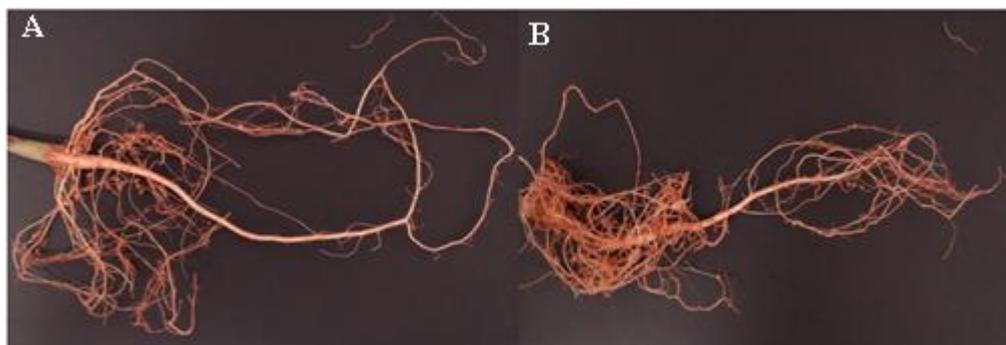


Figura 1 - Raízes de feijão-caupi coradas com floxina B para detecção de massas de ovos, A - Genótipo resistente; B - Genótipo suscetível.

Existe uma grande dificuldade em se trabalhar com proteínas de raiz, pois o material vegetal tem a interferência da presença de partículas de solo, que nem sempre são completamente removidas. Além disso, as raízes possuem compostos que interferem nos procedimentos de extração de proteínas como pigmentos e compostos fenólicos. Há também poucos métodos específicos para extração de proteínas em raízes disponíveis na literatura. A eficiência na extração das proteínas é de grande importância, pois a partir da análise das proteínas extraídas é possível investigar a função bioquímica (Berg, 2002) e a sua relação com determinada função biológica.

Para a análise de proteínas, foi utilizado o método descrito por De Mot & Vanderleyden (1989), e também um protocolo, recentemente reportado para extração de proteínas de raízes de plantas lenhosas, elaborado por Xie *et al.* (2007). Os géis obtidos utilizando o protocolo descrito por Xie et al (2007) revelaram um total de aproximadamente 200 proteínas por gel. Foram observadas proteínas variando em massa de 10 a 120 KDa e em pl de 4 a 7. A comparação dos mapas dos genótipos suscetível e resistente revelou 30 proteínas diferencialmente expressas (Figura 2), incluindo proteínas induzidas, reprimidas e novas. Os mapas 2D obtidos após extração com a metodologia descrita por de Mot & Vanderelyden (1989) revelaram um total de aproximadamente 250 proteínas em cada gel. Também foram observadas proteínas variando em massa de 10 a 120 KDa e em pl de 4 a 7. A comparação dos mapas dos genótipos suscetível e resistente revelou 47 proteínas diferencialmente expressas (Figura 3), incluindo proteínas induzidas, reprimidas e novas.

A comparação dos dois métodos de extração de proteínas revelou perfis bastante distintos. Um maior número de proteínas diferencialmente expressas foi observado utilizando o método descrito por De Mot & Vanderleyden (1989). Entretanto, o perfil de proteínas obtido pelo método de Xie et al., (2007) revelou proteínas diferencialmente expressas não observadas utilizando a outra metodologia. Estes resultados indicam que mais de uma metodologia de extração deve ser utilizada para maximizar as proteínas analisadas.

Estudos em proteômica têm sido amplamente reportados em diversas culturas como algodão, café e soja (Galau *et al.*, 1991; Yamamoto & Knap, 2001; Morgano *et al.*, 2005). Entretanto, a expressão de proteínas em raízes tem sido pouco estudada. No caso específico de interação raiz-nematoide, os relatos de análise proteômica são ainda mais escassos. Em *V. unguiculata*, há um relato de análise proteômica realizada para o estudo de proteínas em sementes (Nogueira *et al.*, 2007), demonstrando a escassez de informações relacionadas às proteínas expressas durante a interação raiz de feijão-caupi-nematóides. Desta forma, este trabalho é pioneiro nesta análise e a otimização de um protocolo para extração de proteínas de raízes de feijão-caupi poderá auxiliar futuras análises visando a identificação de proteínas diferencialmente expressas por meio de espectrometria de massa. Além disso, o genoma de feijão-caupi está sendo seqüenciado e em breve haverá uma grande quantidade de informações disponível no banco de dados (<http://cowpeagenomics.med.virginia.edu/>; Chen *et al.*, 2007), o que facilitará as identificações das proteínas por espectrometria de massa. A identificação das proteínas diferencialmente expressas por espectrometria de massa poderá revelar proteínas importantes para os processos de resistência da planta ao nematóide *M. incognita*.

Referências bibliográficas

- Bailey D.M. 1941. The seedling test method for root-knot nematode resistance. **Proceedings of the American Society for Horticultural Sciences**, 38:573–575.
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; Clarke, N. D. 2002. The Purification of Proteins Is an Essential First Step in Understanding Their Function. **Biochemistry**.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. 1987. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8: 93-99.
- Chen, X.; Laudeman, T. W.; Rushton, P. J.; Spraggins, T. A.; Timko, M. P. 2007. CGKB: an annotation knowledge base for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) methylation filtered genomic genespace sequences. **BMC Bioinformatics**, 8:129.

Cordeiro, L. C.; Bezerra, F. M. L.; Santos, J. J. A.; Miranda, E. P. 1998. Fator de sensibilidade ao déficit hídrico da cultura do feijão caupi (*vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 2: 153-157.

De Majnik, J.; Ogonnaya F.C.; Moullet O.; Lagudah E.S. 2003. The Cre1 and Cre3 nematode resistance genes are located at homoelogenous loci in the wheat genome. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, 16:1129–1134.

De Mot, R.; Vanderleyden, J. 1989. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. **Can. J. Microbiol.**, 35: 960.

Ernst, K.; Kumar A.; Kriseleit, D.; Kloos, D.U.; Phillips M.S. *et al.*, 2002. The broad-spectrum potato cyst nematode resistance gene (Hero) from tomato is the only member of a large gene family of NBS-LRR genes with an unusual amino acid repeat in the LRR region. **Plant J.** 31: 127–136.

Galau, G. A.; Wang, H. Y. C.; Wayne H. D. 1991. Sequence of the *Gossypium hirsutum* D-Genome Alloallele of *Legumin A* and Its mRNA. **Plant Physiology**, (3): 1268–1270.

Gheysen, G.; Fenoll, C. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. **Annu Rev Phytopathol.**, 40:191-219.

Jungblut, P.; Wittmann – Liebold, B. 1995. Protein analysis on a genomic scale. **Journal of biotechnology**, 41:111-20.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685.

Lima, J. A. A. 1988. Vírus que infectam o caupi no Brasil. *In: O caupi no Brasil*. Araújo, J. P. P., Watt, E. E. (orgs.). Ed. IITA/ EMBRAPA, Brasília, p. 507-545.

Morgano, M. A.;Faria, C. G.; Ferrao, M. F. 2005. Determination of protein in raw coffee for NIR spectroscopy and regression PLS. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, 25:25-31.

Nogueira, F. C. S.; Gonçalves E. F.; Jereissati, E. S.; Santos, M.; Costa, J. H.; Oliveira-Neto, O. B.; Soares, A. A.; Domont, G. B. ;Campos, F. A. P. 2007. Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Physiology and Biochemistry**.

Poch H. L. C.A; López, R. H. M.; Kanyuka K. 2006. **Plant Cell Environ.**, 29, 1372–1378.

Seah, S.; Yaghoobi, J.; Rossi, M.; Gleason, C.A. and Williamson, V.M. 2004. The nematode resistance gene, *Mi-1*, is associated with an inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato. **Theor. Appl. Genet.**, 108: 1635-1642.

Teixeira, S.M.; May, P.H. & Santana, A.C. 1988. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. *In: O caupi no Brasil*, Brasília , p 99-136.

Thurau, T.; Kifle, S.; Jung, C. and Cai, D. 2003. The promoter of the nematode resistance gene *Hs1^{pro-1}* activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, 52, 643-660.

Xie ,H.; Pan, S.; Liu ,S.; Ye K.,; Huo,K. 2007. A novel method of protein extraction from perennial *Bupleurum* root for 2-DE. **Electrophoresis**, 28: 871 – 875.

Yamamoto, E. and Knap, H. T. 2001. Soybean Receptor-like Protein Kinase Genes: Paralogous Divergence of a Gene Family. **Molecular Biology and Evolution**, 18:1522-1531.

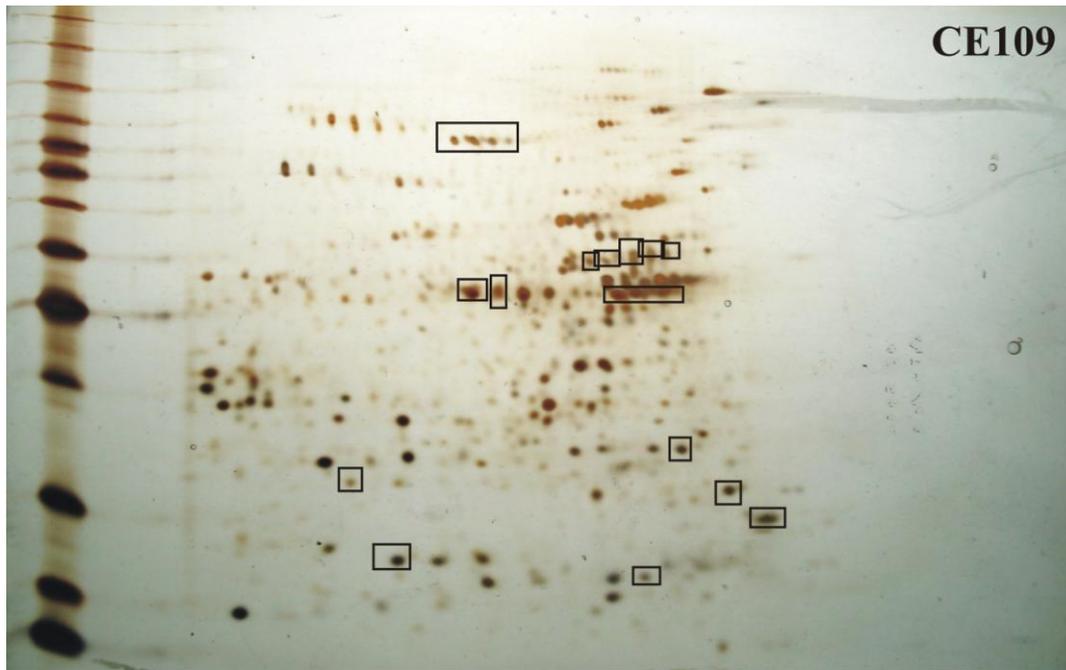


Figura 2. 2-DE de proteínas de raízes de feijão-caupi infectadas com *M. incognita*, extraídas com o método descrito por Xie et al. (2007). Os quadrados indicam proteínas diferencialmente expressas.

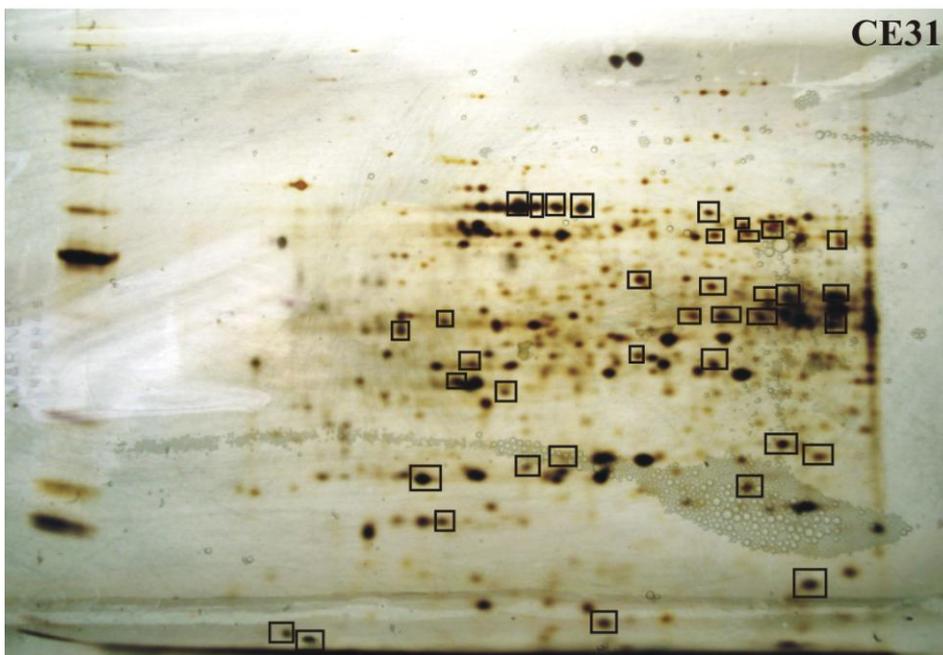
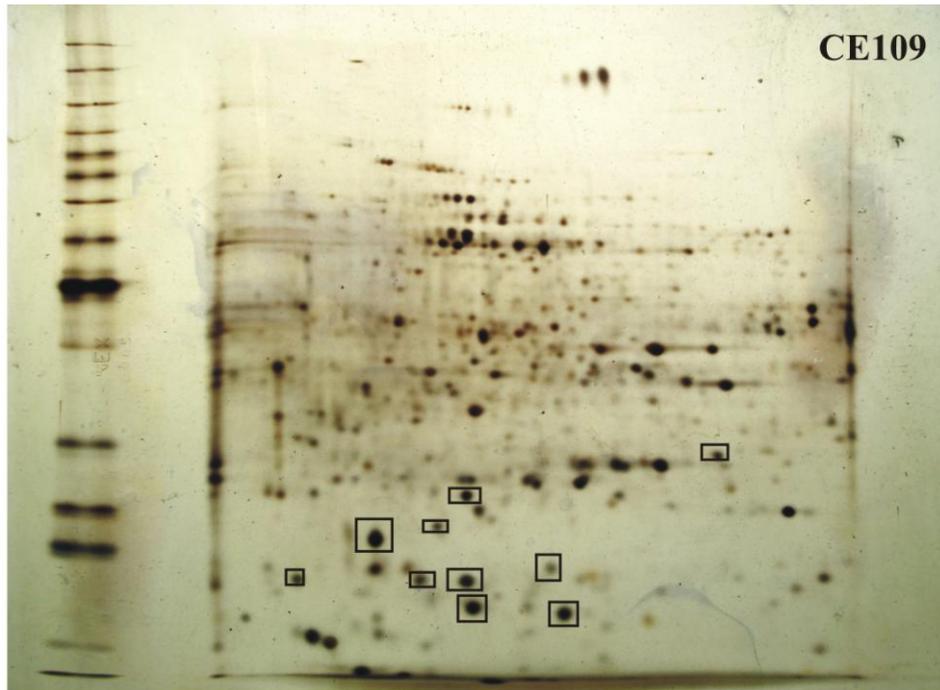


Figura 3. 2-DE de proteínas de raízes de feijão-caupi infectadas com *M. incognita*, extraídas com o método descrito por de Mot & Vanderleyden (1989). Os quadrados indicam proteínas diferencialmente expressas.