

Análise proteômica de raízes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas com *Rhizobium tropici*

SCHIAVON, A.L.¹ RODRIGUES, E. P.² BATISTA, J.S.S.² GOMES, D.F.² HUNGRIA, M³. ¹Centro Universitário Filadélfia, Londrina-PR; ²Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR; ³Embrapa Soja, Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina-PR, e-mail: aline@cnpso.embrapa.br

Introdução

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão, com a safra de 2008/2009 estimada em 3,5 milhões de toneladas, o que equivale a cerca de 16% da produção mundial desta leguminosa. No entanto, a produtividade média desta leguminosa no Brasil ainda é considerada baixa, 842 kg.ha⁻¹ (CONAB, 2009).

A simbiose entre espécies de leguminosas e bactérias da ordem *Rhizobiales*, capazes de realizar a fixação biológica do nitrogênio (FBN), tem grande relevância ambiental e econômica. No Brasil, a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) é beneficiada pela prática de inoculação das sementes com bactérias recomendadas por sua comprovada eficiência no processo de FBN. Duas estirpes da espécie *Rhizobium tropici*, com alta capacidade de FBN e competitividade, SEMIA 4080 (=PRF 81) e SEMIA 4088 (=H 12), foram selecionadas e vem sendo utilizadas em inoculantes comerciais para a cultura no Brasil. Os fatores genéticos, tanto do hospedeiro quanto do microssimbionte, envolvidos nessa interação, são amplos e diversos, sendo necessária a utilização de técnicas robustas que permita a análise molecular em larga escala.

Dentre tais tecnologias está a proteômica, que visa identificar e quantificar os níveis celulares de cada proteína codificada por um genoma, em uma determinada situação, órgão ou tempo, permitindo obter uma descrição quantitativa das proteínas expressas, além de identificar alterações em seu nível de expressão, influenciado por perturbações biológicas.

As metodologias mais adotadas são baseadas em eletroforese bidimensional, seguida por identificação por espectrometria de massa. Na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), por focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão e, de acordo com suas massas moleculares por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS – PAGE) na segunda dimensão (LOPEZ, 2007). Por permitir a análise simultânea de um grande número de proteínas, essa metodologia se tornou uma ferramenta importante de estudo para a agronomia, microbiologia, bioquímica, terapias, descoberta de diagnósticos, dentre outros (Lopez, 2007).

Um dos passos cruciais na proteômica é a obtenção da amostra protéica, sendo fundamental o processo de padronização e otimização do protocolo experimental. Esse protocolo deve ser focado na garantia da reprodutibilidade do conteúdo, evitando perdas de parcelas da amostra e modificações por proteólise, agregação, precipitação ou alterações químicas (GÖRG et al., 2004). Visto que um proteoma deve refletir as condições fisiológicas, é essencial que todos os parâmetros experimentais sejam rigorosamente controlados. Assim, o objetivo deste estudo foi o estabelecimento da extração de proteínas totais de raízes de feijão, inoculados com a

estirpe PRF81 de *R. tropici*, bem como a padronização dos géis 2D, e análise proteômica para a identificação das proteínas diferencialmente expressas com a presença do microsimbionte.

Material e Métodos

Sementes de feijão BRS Radiante (com origem Andina) foram germinadas, em solução nutritiva e mantidas em câmara germinadora por 48 horas, com temperatura de 23°C. As raízes foram inoculadas com cultivo líquido da estirpe PRF 81, em fase logarítmica de crescimento (plantas controle não foram inoculadas), mantidas em saquinhos germinativos contendo solução nutritiva livre de nitrogênio. Após 10 dias, as raízes foram retiradas e armazenadas -80°C até a sua utilização. Para a extração, foram utilizadas cerca de três raízes de feijoeiro resultando em nove tubos de Eppendorf, sendo utilizados os conteúdos de três tubos aleatórios para a extração de proteínas totais. As raízes foram intensamente maceradas em nitrogênio líquido e a extração foi feita baseada no protocolo de fenol/SDS modificado por Rodrigues et al. (no prelo), inicialmente descrito por Wang et al (2006). O *pellet* contendo as proteínas extraídas foi resuspenso em 350 μ L de solução D (7 M uréia; 2 M thiourea; 4% CHAPS; 20 mM DTT; 0.5% tampão IPG pH 4-7). A amostra foi quantificada pelo método de Bradford e, a partir desses resultados, foi construída uma curva de calibração e calculada a concentração de proteínas totais do extrato. Foram aplicadas 350 μ g de proteínas, diluídas em solução DeStreak (GE Biosciences) em fitas de IPG de gradiente de pI 3-10 e 4-7. As fitas foram hidratadas *overnight*, cobertas com óleo mineral ultrapuro. Após esse processo, as fitas foram submetidas à IEF no aparelho IPGphor II™ (Amersham Biosciences), com um limite de corrente de 50 μ A/fita a 20°C, segundo ciclo de: 1 h a 200 V, 1 h a 500 V, gradiente de 1 h a 1.000 V, gradiente de 2,5 h a 8.000 V e etapa final de 1.5 h a 8.000 V, totalizando em 24,8 kWh. Posteriormente, as fitas foram equilibradas em duas etapas de 30 min, sendo a primeira contendo solução de equilíbrio (50 mM Tris HCL pH 8,8; 6M uréia; 30% glicerol; 2% SDS; 0,2% azul de bromofenol 1%) acrescida de DTT (50mg por fita) e a segunda acrescida de iodoacetamida (175mg por fita).

As fitas foram colocadas sobre géis de poliacrilamida 12% e as proteínas separadas em duas etapas de corrida de 50W: 30 min com 15mA/gel e 4h com 30mA/gel, utilizando o marcador de peso molecular Protein Mixture (GE Healthcare). Os géis foram mantidos em solução de fixação *overnight*, sob agitação, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram corados com solução de Comassie Blue por cerca de 3 horas e descorados a cada hora com solução de descoloração. Após descorados, foram armazenados em solução de estocagem, à temperatura de 4°C. Os géis foram digitalizados e as imagens analisadas no programa ImageMaster 2-D Platinum v.5.0 (GE Healthcare).

Resultados e Discussão

A proteômica estabeleceu-se como uma técnica bem sucedida, com o desenvolvimento de tecnologias eficientes capazes de realizar a análise de misturas complexas, como extratos de proteínas totais de um organismo. Dessa forma, reduzir ao mínimo o número de etapas no processo de extração, permite garantir uma maior integridade das proteínas a serem separadas na eletroforese bidimensional. O protocolo descrito por Wang et al. (2006) e modificado por Rodrigues et al. (no prelo) foi desenvolvido para a extração de proteínas de raízes de soja e, neste trabalho, foi aplicado com sucesso para a extração de proteínas de raízes de feijão. No entanto, foi necessário partir de uma quantidade maior de material para a extração, demonstrando que a concentração total de proteínas nas raízes de feijão é inferior àquela encontrada nas raízes de soja.

A quantidade de proteínas totais aplicadas por gel foi estabelecida em 350 μg , garantindo melhor resolução e evitando a margem de erros para as análises futuras. Testes foram feitos com a aplicação de concentrações menores e maiores, no entanto, apresentaram menor número de *spots* e maior quantidade de substâncias interferentes, respectivamente. Além disso, raízes, em geral, possuem baixa concentração de proteínas em comparação com outros tecidos da planta.

Duas fitas, com diferentes faixas de pI foram testadas visando a garantia de melhor resolução. A fita de pI 4-7 foi a que resultou em melhor resolução, permitindo maior distribuição dos *spots* no gel (Figura 1). A fita com faixa de pI 3-10, não obteve boa resolução devido à aglomeração dos *spots* no gel na região de pH 5-7. A utilização de fitas com faixas de pI menores permite uma melhor avaliação das regiões com maior número de representantes, evitando a risco de sobreposição de *spots*. Por isso, para cada amostra ou tipo de célula a ser analisada em experimentos de proteômica, um protocolo específico deve ser estabelecido.

Em uma análise preliminar comparativa entre raízes inoculadas e não-inoculadas, utilizando o programa ImageMaster, foram detectados vários *spots* que apresentaram volumes relativos diferenciais. Para uma maior segurança nos dados, todos os géis foram feitos e analisados em triplicata e os dados relativos aos volumes dos *spots* serão analisados estatisticamente. Dessa forma, as proteínas diferencialmente expressas presentes em tais *spots* serão identificadas por espectrometria de massa.

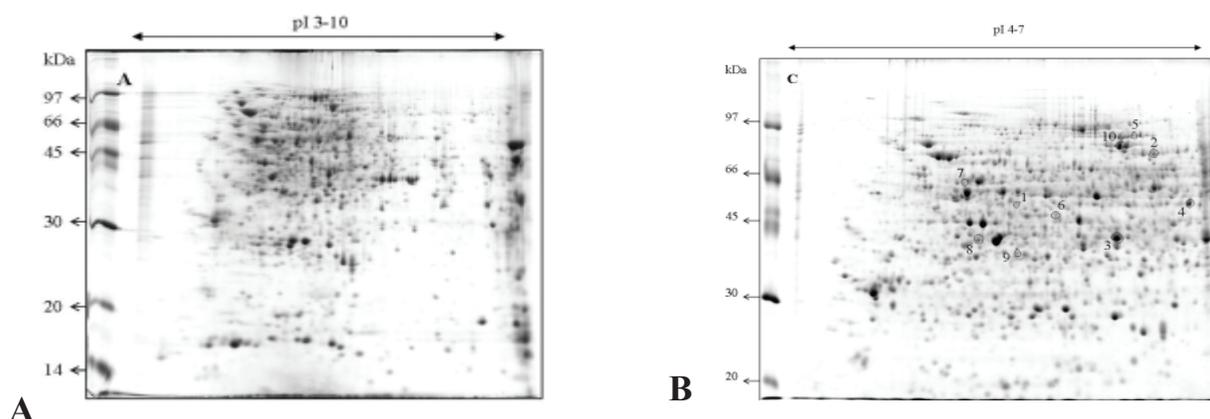


Figura 1. Gel bidimensional das proteínas expressas por raízes de feijão inoculadas com a estirpe PRF81 de *R. tropici*, nas faixas de pI 3-10 (A) e pI 4-7 (B).

Conclusões

Por meio de uma metodologia simplificada e reprodutível, os efeitos globais da expressão gênica diferencial de proteínas radiculares na presença do microssimbionte podem ser acessados, permitindo a identificação de possíveis determinantes genéticos relacionados à interação simbiótica leguminosa-rizóbio.

Referências

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). Acompanhamento da Safra Brasileira. Feijão total (1^o, 2^a e 3^a safra) – Brasil – Série histórica. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/9graos_08.09.pdf >. Acesso em mar. de 2010.

GÖRG A., WEISS W., DUNN M.J., Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics, *Proteomics*. V.4, p 3665-3685, 2004.

LÓPEZ, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. **Journal of Chromatography**, V.489, n. 1-2, p190-202, 2007.

RODRIGUES, E.P., TORRES, A.R., BATISTA, J.S.S., HUERGO, L., HUNGRIA, M. A simple, economic and reproducible protein extraction protocol for proteomics studies of soybean roots. No prelo.

WANG W., VIGNANI R., SCALI M., CRESTI M., A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis, **Electrophoresis**. V.27, p 2782-2786, 2006.