



20º Seminário de
Iniciação Científica e
4º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*



20º Seminário de
Iniciação Científica e
4º Seminário de Pós-graduação
da Embrapa Amazônia Oriental

ANNAIS 2016

21 a 23 de setembro

Embrapa Amazônia Oriental
Belém, PA
2016



REGULAÇÃO DE PROTEÍNAS DA VIA GLICOLÍTICA EM RAÍZES DE *Elaeis guineensis* JACQ. ACOMETIDAS PELO AMARELECIMENTO FATAL

Sidney Vasconcelos do Nascimento¹, Paulo Henrique de Oliveira Costa², Rafael da Silva Borges Valadares³, Marcelo Murad Magalhães⁴

¹Mestrando Universidade Federal Rural da Amazônia, em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, svn_live@hotmail.com

²Bolsista Embrapa Amazônia Oriental, paulo.henriquee30@gmail.com

³Pesquisador Instituto Tecnológico Vale, rafael.borges.valadares@itv.org

⁴Pesquisador Embrapa Amazônia Oriental, Laboratório de Análise de Sistemas Sustentáveis, marcelo.magalhaes@embrapa.br

Resumo: O aparecimento do Amarelecimento Fatal (AF) tem sido um empecilho para o crescimento da cultura do dendezeiro. Neste sentido, várias pesquisas foram realizadas visando identificar as causas do AF. No entanto outras estratégias precisam ser aplicadas. Técnicas em proteômica vêm se modernizando para obter o perfil protéico qualitativo e quantitativo com maior velocidade e precisão. Sabendo que a regulação de componentes do metabolismo primário está envolvida direta ou indiretamente na defesa, o objetivo deste trabalho foi utilizar a cromatografia líquida bidimensional e espectrometria de massas (2D-UPLC/MS^E) com o auxílio de ferramentas de bioinformática na identificação de alterações de proteínas envolvidas no metabolismo energético em raízes de plantas com AF. Os resultados revelaram a expressão diferencial de proteínas envolvidas na glicólise, onde a maior frequência de regulação positiva dessas em plantas assintomáticas pode estar relacionada ao retardo no desenvolvimento desta doença.

Palavras-chave: amarelecimento fatal, análises proteômicas, óleo de palma

Introdução

O dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) foi introduzido no Brasil no século 17 devido à uma disponibilidade de terras e de clima com pluviosidade adequada. Desta palmeira podem ser obtidos o óleo de palma e de palmiste, hoje considerados fonte de energia renovável com aptidão para a produção de biodiesel.

O aparecimento do Amarelecimento Fatal (AF) tem sido um empecilho para o crescimento desta cultura. Assim a causa desta doença tem sido muito estudada (BOARI, 2008), mas ainda



existem dúvidas sobre a sua origem. Portanto são necessárias análises mais precisas para elucidar informações sobre o agente causal do AF. Neste sentido, é importante considerar técnicas em proteômica, que têm sido empregadas em análises de respostas de plantas a diferentes estresses (ALAM et al., 2010; CAMPOS et al., 2016).

Sabendo que a regulação de componentes do metabolismo primário está envolvida na defesa em plantas (ROJAS et al., 2014), o presente trabalho teve como objetivo identificar a expressão diferencial de proteínas envolvidas no metabolismo energético em raízes de plantas com AF por meio de cromatografia líquida bidimensional, acoplada a espectrometria de massas (2D-UPLC/MS^E) com auxílio de ferramentas de bioinformática.

Material e Métodos

As amostras de raízes de dendezeiro foram coletadas na área de cultivo pertencente a empresa MARBORGES, situada no município de Mojú, no estado do Pará. Foram amostradas raízes de plantas assintomáticas e de plantas acometidas pelo Amarelecimento fatal no estágio intermediário da doença. Foram amostradas raízes de três plantas para cada condição, sendo estas homogeneizadas para formar um *pool* com o objetivo de eliminar o efeito do genótipo e do local de plantio. Após a coleta as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido. As proteínas foram isoladas de acordo com protocolo proposto por Wang et al. (2006) e quantificadas no Qubit 2.0 (invitrogen). A digestão de proteínas foi realizada com tripsina (20 ng/ μ L), sendo em seguida dessalinizadas em colunas *Sep-Pak* tC18 de 50 mg. Após a dessalinização e digestão, foram submetidas às análises por 2D-UPLC/MS^E. O tratamento dos dados foram realizados nos programas Scaffold 4 (proteome software) e Blast2Go (Biobam).

Resultados e Discussão

Foram identificadas 31 sequências associadas a 12 enzimas envolvidas direta ou indiretamente a glicólise (Figura 01). A maioria das enzimas foram reguladas negativamente em plantas com AF ou foram exclusivas de assintomáticas. A enzima frutose-bisfosfato diminuiu 2.25 vezes em plantas com sintomas do AF comparando com plantas assintomáticas. Triosefosfato isomerase foi regulada positivamente em plantas com AF, no entanto com valor pouco significativo. A enzima gliceraldeído-



3-fosfato desidrogenase também foi regulada positivamente em plantas sintomáticas, apresentando um aumento de 2.84 vezes. Por outro lado, uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi identificada exclusivamente em plantas assintomáticas. A fosfoglicerato cinase também foi identificada exclusivamente em plantas assintomáticas. A enolase diminuiu 1.47 vezes em plantas com sintomas. A piruvato quinase aumentou 4.99 vezes em assintomáticas. A fosfoglicomutase aumentou em 1.32 em sintomáticas. As enzimas aldeído desidrogenase, e álcool desidrogenase também foram reguladas negativamente em plantas com AF, enquanto a enzima dihidroxi-ácido desidratase foi exclusiva em assintomáticas.

A regulação de componentes do metabolismo primário está envolvida direta ou indiretamente na defesa em plantas (ROJAS et al., 2014) e a produção de energia é fundamental à biossíntese de proteínas envolvidas em mecanismos de defesa (SCHEIDELER et al., 2002). O aumento na atividade do metabolismo respiratório constitui um dos principais meios de produção de energia. Neste contexto, a regulação positiva de transcritos relacionados a via glicolítica tem sido observada em resposta a estímulos ambientais (LESS et al., 2011). Portanto os resultados observados aqui sugerem que plantas assintomáticas utilizam melhor o metabolismo energético para resistir à doença.



GLICÓLISE/GLICONEOGÊNESE

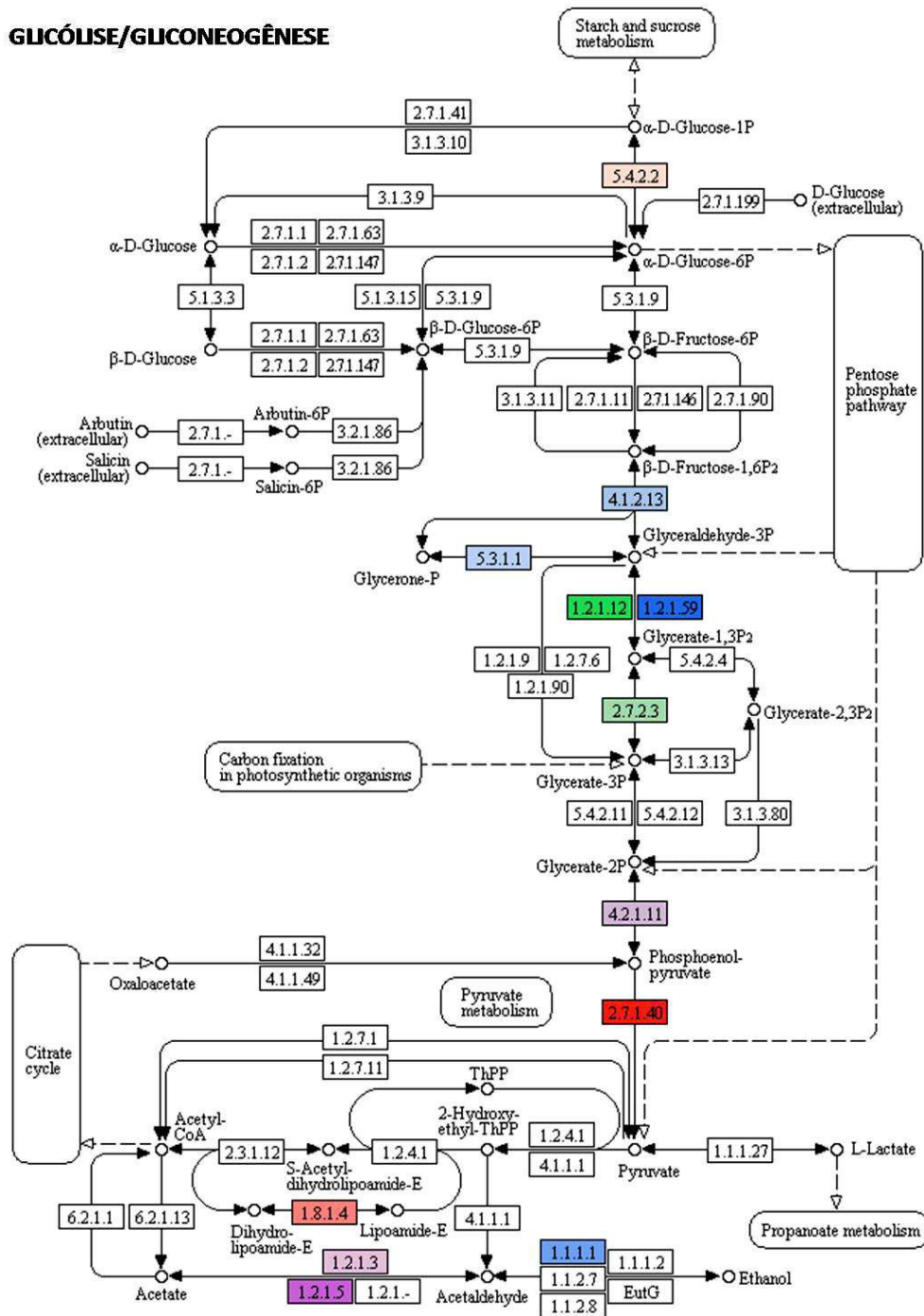


Figura 01 - Mapa incluindo a via glicolítica com funções das proteínas diferencialmente abundantes em plantas com AF. 5.4.2.2 - Fosfoglicomutase; 4.1.2.13 - Frutose-bisfosfato aldase; 5.3.1.1 - Triose fosfato isomerase; 1.2.1.12 - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 1.2.1.59 - Gliceraldeído-3-fosfato; 2.7.2.3 - Fosfoglicerato cinase; 4.2.1.11 - Enolase; 2.7.1.40 - Piruvato cinase; 1.8.1.4 - Dihidroxi-ácido desidratase; 1.2.1.3 - Aldeído desidrogenase; 1.2.1.5 -Aldeído desidrogenase; 1.1.1.1 - Álcool desidrogenase.



Conclusão

Foi identificada a expressão diferencial de proteínas envolvidas no metabolismo energético. A regulação negativa de proteínas da glicólise em raízes de plantas com sintomas do AF sugere que plantas assintomáticas utilizam melhor o metabolismo energético, podendo haver relação com a resistência ao desenvolvimento dos sintomas do AF.

Referências Bibliográficas

ALAM, I.; LEE, D.-G.; KIM, K.-H.; PARK, C.-H.; SHARMIN, S.-A.; LEE, H.; OH, K.-W.; YUN, B.-W.; LEE, B.-H. Proteome analysis of soybean roots under waterlogging stress at an early vegetative stage. **Journal of Biosciences**, v. 35, n. 1, p. 49-62, 2010.

BOARI, A. J. **Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guinensis* Jacq.) no Brasil**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 62 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 348).

CAMPOS, N. A.; ALVES, J. D.; SOUZA, K. R. D.; PORTO, B. N.; MAGALHÃES, M. M.; SILVA, G. J.; PAIVA, L. V. Evolution of aerenchyma formation in a maize breeding program. **Plant Omics Journal**, v. 9, n. 1, p. 19-25, 2016.

LESS, H.; ANGELOVICI, R.; TZIN, V.; GALILI, G. Coordinated gene networks regulating Arabidopsis plant metabolism in response to various Stresses and nutritional cues. **The Plant Cell**, v. 23, n. 4, p. 1264-1271, 2011.

ROJAS, C. M.; SENTHIL-KUMAR, M.; TZIN, V.; MYSORE, K. S. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in Plant Science**. v. 5, article 17, Feb. 2014.

SCHEIDELER, M.; SCHLAICH, N. L.; FELLENBERG, K.; BEISSBARTH, T.; HAUSER, N. C.; VINGRON, M.; SHUSARENKO, A. J. HOHEISEL, J. D. Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 10555-10561, 2002.

WANG, W.; VIGNAN, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, v. 27, n. 13, p. 2782-2786, 2006.