

O ESTUDO DE PROTEÍNAS COM POTENCIAL BIOPESTICIDA CONTRA O NEMATÓIDE *Meloidogyne mayaguensis* PRESENTES EM PLANTAS DE AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.)

Juliana Martins Ribeiro ¹; Eduardo Alves Gamosa de Oliveira ²; José Mauro da Cunha e Castro ³, Katia Valevski Sales Fernandes ⁴; Nataniel Franklin de Melo ⁵; Débora Costa Bastos ⁶; Márcio dos Santos Teixeira Pinto ⁷

¹ Bióloga, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Semiárido, e-mail: juliana.ribeiro@cpatsa.embrapa.br; ² Biólogo, graduado, bolsista BFT / FACEPE; ³ Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Semiárido; ⁴ Bióloga, Ph.D., Professora Pesquisadora da Universidade Estadual do Norte Fluminense; ⁵ Biólogo, D. Sc., Pesquisador da Embrapa Semiárido; ⁶ Agrônoma, D.Sc., Pesquisadora da Embrapa Semiárido; ⁷ Biólogo, D.Sc. bolsista DCR/ CNPq.

INTRODUÇÃO

A espécie de nematóide *Meloidogyne mayaguensis* vem causando sérios prejuízos à fruticultura no Submédio do Vale do São Francisco, bem como em outros estados brasileiros. Este patógeno é também responsável por perdas em diversas culturas comerciais, frutíferas ou não. Plantas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) são imunes ao ataque de *M. mayaguensis* e, embora ocorra infecção e desenvolvimento de fêmeas do nematóide nas raízes das plantas desta espécie, estas permanecem, por razão desconhecida, estéreis sem produzirem ovos (GUIMARÃES et al., 2003). Polifenoloxidasas, peroxidases e cistatinas são proteínas descritas como tendo efeito inibitório contra nematóides, inclusive do gênero *Meloidogyne* (SILVA et al.; CHAN et al., 2010). Por esse motivo, o presente trabalho visou detectar e quantificar estas proteínas em plantas de *A. hypogaea*, com o intuito de prospecção futura de genes que confirmam resistência a *M. mayaguensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Duas sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) foram semeadas em quarenta sacos plásticos contendo 5 kg de solo autoclavado. Após a germinação, a planta menos vigorosa foi eliminada de modo a se conduzir uma planta em cada saco plástico. Quinze dias após a semeadura, 20 plantas de amendoim foram inoculadas com 10.000 ovos de *M. mayaguensis* e 20 plantas não foram inoculadas de maneira a se obter um controle. Trinta

dias após, as plantas inoculadas e não inoculadas foram individualmente colhidas, as raízes foram separadas e liofilizadas.

As amostras liofilizadas foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. Foram pesadas 100mg das amostras maceradas e a elas foi adicionado tampão de extração (Tris HCL 0,1M pH 8,0; NaCl 0,5M; PVPP 10% e PMSF 2mM) na proporção de 1:10. Os tubos contendo a extração protéica foram colocados em agitador magnético no interior da geladeira durante 4 horas. Após este período, os tubos foram centrifugados durante 20 minutos a 20 000 g em temperatura de 4° C. Os sobrenadantes foram recolhidos e o sedimentos foram descartados. Os extratos obtidos das raízes de plantas de amendoim foram quantificados segundo o método de Bradford (1976) e usados para dosagens de atividades das respectivas enzimas: polifenoloxidasas (PINTO et al., 2008), peroxidases (BERGMEYER, 1974) e cistatinas (MICHAUD et al., 1995). A medida de atividade foi representada em unidade de atividade ou atividade inibitória (no caso de dosagem de cistatinas) por mg de proteína total, (UA/mg). O valor de 1 UA corresponde a variação de 0,01 de absorbância por minuto. As medições foram feitas em número de cinco repetições e o teste Tukey com 5% de probabilidade foi usado para avaliar as diferenças representativas entre as medias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a figura 1A, os níveis de inibidores de proteinases cisteínicas (cistatinas) aumentaram em uma proporção de 1,5 vezes em raízes de plantas de amendoim inoculadas com *M. mayaguensis*. De forma similar, o nível de atividade peroxidásica aumentou em aproximadamente três vezes (Figura 1B). É possível que estas proteínas estejam atuando na imunidade de *A. hypogaea* contra o nematóide em questão, uma vez que cistatinas e peroxidases já foram descritas como sendo proteínas de efeito inibitório contra nematoides, inclusive do gênero *Meloidogyne* (CHAN et al., 2010; SILVA et al., 2010).

Os dados relativos às dosagens de polifenoloxidasas (PFO) mostram não terem ocorrido diferenças no nível de atividade desta enzima entre plantas de amendoim infectadas e não infectadas com o nematóide (Figura 1C). No entanto, os níveis de PFO em raízes de amendoim foram muito elevados quando comparados com aqueles obtidos em raízes de espécies vegetais sensíveis ao ataque de nematóides do gênero *Meloidogyne*, como a banana (WUYTS et al., 2006) e tomate (MANDAL et al., 2007).

Diferentemente do observado para a enzima PFO, ocorreu uma correlação entre infecção com *M. mayaguensis* e aumento da atividade das peroxidases e cistatinas nas raízes das plantas. No entanto serão necessários experimentos de toxicidade para avaliar o real potencial biopesticida dessas três proteínas sobre o referido patógeno.

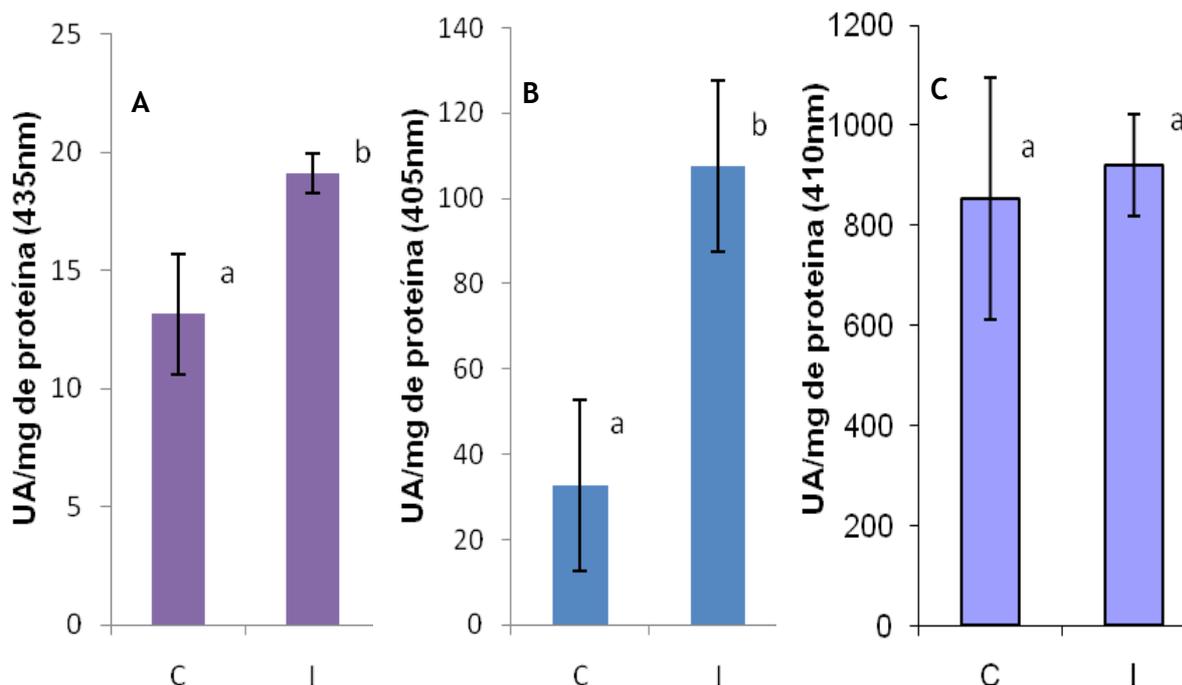


FIGURA 1 - Medições de proteínas em raízes de plantas de *A. hypogaea* não inoculadas (C) e inoculadas (I) com *Meloidogyne mayaguensis*. A: Atividade inibitória de papaína (cistatina); B: Atividade de peroxidases POX; C: Atividade de Polifenoloxidasas PFO. Dados acompanhados de uma mesma letra são estatisticamente iguais segundo teste Tukey com 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

Polifenoloxidasas estão presentes, de forma constitutiva, em elevada concentração (~1000 UA/mg) em raízes de *A.hypogaea* e seus níveis não são alterados pela inoculação com *M. Mayaguensis*.

Peroxidasas e cistatinas, proteínas comumente relacionadas com defesa vegetal, tiveram seus níveis alterados após inoculação com *M. mayaguesis*.

AGRADECIMENTOS

À FACEPE, CNPq e Embrapa Semiárido pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

BERGMEYER H. U., Methods of Enzymatic Analysis 1, **Academic Press, New York. 2nd Edition**, p 495,1974.

CHAN YUAN-LI; YANG AI-HWA; CHEN JEN-TZU; YEH KAI-WUN; CHAN MING-TSAIR
Heterologous expression of taro cystatin protects transgenic tomato against *Meloidogyne incognita* infection by means of interfering sex determination and suppressing gall formation. **Plant Cell Reports**, v. 3, 231-238, 2010

GUIMARÃES, L.M.; MOURA, R.M. e PEDROSA, E.M.R. . Parasitismo de *Meloidogyne mayaguensis* em diferentes espécies botânicas. **Nematologia Brasileira**, v. 27, p. 139-145, 2003.

MANDAL, S., MITRA A., Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71 : p. 201-209. 2007.

MICHAUD, D. CANTIN, L. and VRAIN, T. C. Carboxy-terminal truncation of oryzacystatin II by oryzacytatin-insensitive insect digestive proteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 322, p. 469-474, 1995.

SILVA, R. V.; OLIVEIRA R. D. L.; NASCIMENTO, K. J. T. and F. A. RODRIGUES
Biochemical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicon. **Plant Pathology**, v. 59, p. 586-593, 2010.

WUYTS, N.; WAELE, D. D., SWENNEN, R. Extraction and partial characterization of polyphenoloxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 308-314, 2006.