

Alterações no proteoma de *Brachiaria brizantha* relacionadas à resistência as cigarrinhas-das-pastagens

Danila Cabral do Nascimento¹, Carolina Sant'Ana Robles², Cacilda Borges do Valle³ e Karem Guimarães Xavier Meireles⁴

Introdução

Estima-se que o Brasil tenha mais de 120 milhões de hectares de pastagens cultivadas, e que mais de 85% da área seja ocupada por braquiárias (BARBOSA et al., 2006). Dentre as cultivares de *Brachiaria brizantha* disponíveis no mercado, a cv. Marandu é a principal fonte de resistência às cigarrinhas-das-pastagens, razão que justifica seu cultivo extensivo. Estes insetos são particularmente importantes devido a suas ocorrências generalizadas, aos altos níveis populacionais e a severidade dos danos que causam. Em função disso, são considerados "pragas chave" para as pastagens (VALÉRIO & KOLLER, 1993).

Neste contexto, a Embrapa Gado de Corte vem investindo na pesquisa na área de Proteômica de forrageiras, com a finalidade de contribuir na elucidação dos genes envolvidos em mecanismos de resistência de capins a estresses bióticos. Recentemente, estudos vem sendo realizados para incorporar ferramentas biotecnológicas para se estudar questões biológicas, como, por exemplo, resistência a pragas e a estresses ambientais. A Proteômica dedica-se ao estudo funcional do conjunto de proteínas (proteoma) expresso pelo genoma de uma célula, tecido ou organismo em determinado ambiente (GRAVES; HAYSTEAD, 2002).

O objetivo deste estudo foi detectar proteínas com alterações de expressão em plantas da cv. Marandu infestadas com a praga entre dois estágios do período de infestação.

Material e métodos

A cv. Marandu é a cultivar conhecida mais resistente aos ataques da cigarrinha-das-pastagens *Notozulia entreciana*. Para esse estudo foram utilizadas folhas de *Brachiaria brizantha* cultivar Marandu, que foram submetidas ao contato com as cigarrinhas-das-pastagens em ambiente controlado. As folhas das

plantas foram coletadas em dois tempos de avaliação. O primeiro foi às 48h do início da interação planta x praga, considerado um ponto intermediário do período de infestação. A segunda coleta ocorreu 96 horas após o início da infestação, observado como o período máximo em que as plantas suportam os danos causados pela praga sem acarretar na morte da parte aérea.

As proteínas foram extraídas de acordo com o procedimento descrito por Wang et al. (2006), no qual a primeira etapa as proteínas foram solubilizadas em ácido tricloroacético e precipitadas com acetato de amônio em metanol e na segunda etapa as proteínas foram solubilizadas em fenol e precipitadas com acetato de amônio em metanol. O próximo passo foi a quantificação dos extratos protéicos. A base do Corante de Bradford, as amostras foram preparadas e colocadas em um espectrofotômetro para efetuar a leitura da absorbância no comprimento de 595 nm. (BRADFORD, 1976).

Os géis bidimensionais foram preparados em duas repetições para cada tratamento. A isofocalização das proteínas foram realizadas em fitas de acrilamida com gradiente de pH 4 a 7, região onde expressa um número significativo de moléculas. Após a focalização isoeletrica, as fitas foram equilibradas e transferidas para géis de acrilamida, colocados em cubas refrigeradas de eletroforese, para proceder à eletroforese da segunda dimensão. Em seguida, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250, de acordo com o protocolo de Consoli e Damerval (2001).

Os géis foram digitalizados no "Image scanner" e suas imagens analisadas pelo programa Image Master 2D Platinum v. 7.0 (GE Life Sciences). Os géis 2D foram comparados a fim de se detectar *spots* (lê-se pontos de proteínas) com expressão diferencial ou exclusiva entre os tratamentos 48h x 96h. Os critérios adotados para um *spot* ser aceito como diferencialmente expresso foram: (i) a razão entre o volume (medida que quantifica a intensidade de expressão de um spot no gel) de um *spot* no tratamento

1. Aluna de Biologia, Estagiária Embrapa Gado de Corte, Universidade Anhanguera UNIDERP, Campo Grande, MS, CEP 79003-010. E-mail: danila_cabral@hotmail.com

2. Aluna de Mestrado em Biologia Vegetal, Bolsista FUNDECT, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, CEP 79070-900. E-mail: carolrobles82@yahoo.com.br

3. Pesquisador da Área de Melhoramento Genético Vegetal, Embrapa Gado de Corte, Laboratório de Citogenética, Campo Grande, MS, CEP 79002-970. E-mail: cacilda@cnpvc.embrapa.br

4. Pesquisador da Área de Proteômica Vegetal, Embrapa Gado de Corte, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Campo Grande, MS, CEP 79002-970. E-mail: karem@cnpvc.embrapa.br

Apoio financeiro: MP3-EMBRAPA, FUNDECT e UFMS.



96h e o volume do mesmo spot no tratamento 48h deve-se ser superior a 1,5; (ii) a análise estatística realizada para o volume médio de expressão de um *spot* em ambos os tratamentos deve ser significativa ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussão

Os proteomas das folhas de plantas de braquiária resistentes às cigarrinhas-das-pastagens foram investigados após 48 e 96 horas de interação forrageira x praga. A análise computacional detectou 620 spots de proteínas comuns nas réplicas dos géis 2D confeccionados para o tratamento 48h e 627 spots comuns nos géis do tratamento 96 h após infestação. Embora a eletroforese bidimensional seja uma técnica robusta e capaz de isolar em gel centenas de proteínas expressas em cada tempo avaliado, apenas uma pequena fração delas está efetivamente envolvida na resposta da planta ao estresse causado pela praga. Nesta análise, ainda deve ser considerado que o genótipo submetido à ação da praga foi comparado a ele mesmo, sob as mesmas condições, variando apenas os tempos de avaliação. Assim, espera-se que as diferenças de expressão detectadas devam estar relacionadas à regulação dos níveis de proteínas na planta durante sua reação aos danos causados pela praga.

Essa ideia foi confirmada ao se contrastar os géis de ambos os tratamentos. Apesar de revelar 181 spots se expressando comumente nos dois pontos de infestação, a análise considerou que apenas 6 deles mostraram alterações significativas em seus níveis de expressão, de acordo com os critérios estabelecidos (Fig. 1). A expressão diferencial desses spots em ambos os tratamentos é apresentada na Fig. 2. Foi observado que 5 spots foram super expressos na plantas mantidas sob a ação das cigarrinhas por 48h, e apenas 1 spot teve sua intensidade de expressão aumentada após 96h de infestação. Dentre as proteínas super expressas, a maior diferença de intensidade entre os spots diferencialmente expressos foi verificada no spot 172, que foi 3,5 vezes mais expresso nas plantas infestadas durante 96h. A menor diferença no nível de expressão foi detectada no spot 130. A Fig. 3 traz as imagens tridimensionais desse spot nas réplicas dos géis de ambos os tratamentos, mostrando intensidade aumentada em 1,9 vezes no tratamento 48 h. Também foram detectados spots expressos exclusivamente em cada ponto de infestação (Fig. 1). Quatorze spots foram expressos somente no tratamento 48 h, ao passo que às 96h da infestação foram detectados apenas 3 spots exclusivos. A Figura 4 ilustra a expressão em 3D de um spot exclusivo no tratamento 48h e de outro se expressando especificamente após 96 h de infestação.

Os resultados indicam que o genótipo resistente, ao ser atacado pela praga, reage intensamente nas primeiras horas (48 h), acionando a expressão de um grande número de proteínas que atuam especificamente nesta fase. À medida que a planta intensifica a

manifestação dos sintomas dos danos causados pelas cigarrinhas (96 h), seu proteoma apresenta um aumento significativo da expressão de algumas proteínas comuns, também expressas na fase inicial. Como a cultivar Marandu é reconhecida como o genótipo de *B. brizantha* mais resistente às cigarrinhas-das-pastagens, entende-se que os genes que codificam essas proteínas estão envolvidos na resistência de gramíneas forrageiras a esta praga. A identificação dessas moléculas e o entendimento de seus papéis celulares é de fundamental importância para se compreender a regulação gênica ao nível do proteoma em pontos-chave da interação *Brachiaria* x cigarrinhas-das-pastagens. Com esse propósito, o presente estudo segue adiante com a análise dos spots de proteínas por espectrometria de massas e bioinformática.

Agradecimentos

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública, CCBS/UFMS, sob coordenação da Prof^a. Dra. Maria Ligia Rodrigues Macedo.

Ao Laboratório de Genômica e Proteômica, da Universidade Federal de Pernambuco, sob coordenação do Professor Dr. Tercílio Calsa Junior.

Referências

- BARBOSA, R.A. (2006)/ In: Mortalidade de plantas forrageiras em pastagens nas regiões Centro Oeste e Norte do Brasil – Introdução ao problema, Morte de Pastos de Braquiarias/ Editor Técnico Rodrigo Amorim Barbosa, - Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, v.1, pág. 15-21
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, n.1/2, p.248-254. 1976.
- CONSOLI, L.; DAMERVAL, C. Quantification of individual zein isoforms resolved by two-dimensional electrophoresis: genetic variability in 45 maize inbred lines. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 22, p. 2983-2989, 2001.
- GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 66, n. 1, p. 39-63, Mar. 2002.
- VALÉRIO, J.R. & KOLLER, W.W. Proposição para o manejo integrado das cigarrinhas-das-pastagens. **Pasturas Tropicais**, v. 15, n. 3, p. 10-16, 1993.
- WANG, W.; VIGNANI, R.; SCALI, M.; CRESTI, M. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 27, 2782-2786, 2006.



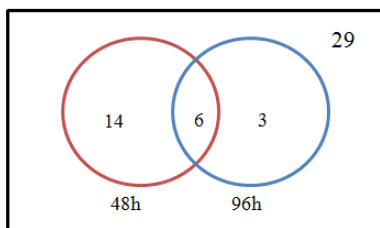


Figura 1. Diagrama demonstrando o número de *spots* exclusivamente expressos após 48 h (vermelho) e 96 h (azul) da interação cv. Marandu x Cigarrinhas-das-pastagens. A interseção dos círculos representa o número de *spots* comuns a ambos os tratamentos.

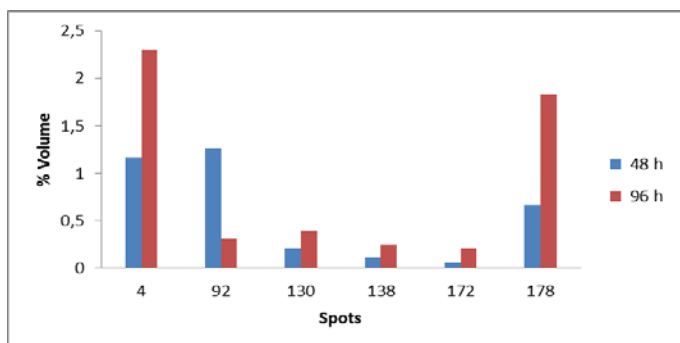


Figura 2. Expressão dos *spots* considerados como diferencialmente expressos em plantas da cv. Marandu sob infestação por 48 h e 96 h.

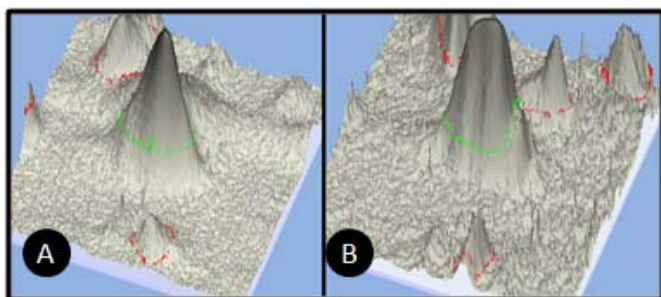


Figura 3. Picos referentes ao volume médio de expressão do spot 130 em plantas da cv. Marandu após 48 h (A) e 96 h (B) da infestação.

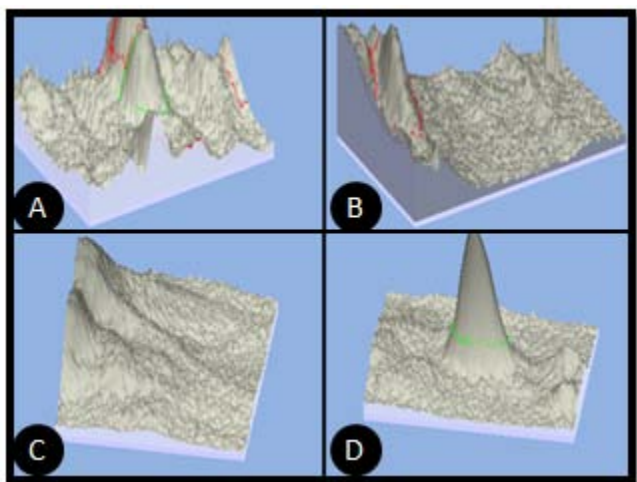


Figura 4. Imagem 3D de *spots* exclusivamente expressos no tratamento 48 h (A e B) e no tratamento 96 h (C e D).