

## PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE *STYLOSANTHES SCABRA* SUBMETIDA AO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO

### DIFFERENTIAL PROTEOMICS OF *STYLOSANTHES SCABRA* UNDER WATER DEFICIT STRESS

Silva-Lima, SCB<sup>1</sup>; Oliveira, M. S<sup>1</sup>; Silva, F.A.C<sup>1</sup>; Benko-Iseppon, A. M<sup>2</sup>; Calsa-Junior, T<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Genética, Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Recife-PE. Brasil. [sheylac.b@gmail.com](mailto:sheylac.b@gmail.com); [oliveirams@outlook.com](mailto:oliveirams@outlook.com); [fabiana.acs@gmail.com](mailto:fabiana.acs@gmail.com); [terciliojr@yahoo.com.br](mailto:terciliojr@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Genética, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Recife-PE. Brasil. [ana.iseppon@gmail.com](mailto:ana.iseppon@gmail.com);

**RESUMO:** *Stylosanthes scabra* é uma planta pertencente à família das leguminosas com importância econômica devido ao uso na agropecuária como forragem animal. No atual cenário de mudanças climáticas globais, a ocorrência de secas duradouras compromete a produtividade das plantas cultivadas. Dessa forma, as análises das proteínas envolvidas na resposta ao déficit hídrico podem auxiliar no entendimento dos mecanismos de defesa da *S. scabra* quando exposta a esta condição. Plantas de *S. scabra* foram submetidas ao déficit hídrico pelo período de 6 e 24 h após supressão de rega, e para cada tempo dois tratamentos foram utilizados: o irrigado e sob déficit hídrico. Foi realizada a extração de proteínas solúveis das raízes, em triplicata utilizando método fenólico. Após quantificação, as amostras foram submetidas à focalização isoeletrica (fitas *dry-strip* de 13 cm, pH 3-10, Sistema IPGphor III) seguida de eletroforese bidimensional em SDS-PAGE 12,5%. Os géis foram digitalizados e as imagens analisadas (Image Master 2D Platinum v.7.05; GE Life Sciences) para a seleção dos *spots* diferenciais (ANOVA  $\leq 0,05$ ; *ratio*  $\geq 1,5$ ). Após digestão com tripsina, os peptídeos foram analisados via espectrometria de massas (MALDI-ToF/ToF) e as proteínas correlatas foram presumivelmente identificadas por meio do programa Mascot contra base de dados Swissprot. Foram observadas 195 proteínas diferencialmente acumuladas, das quais 92 já foram identificadas. As proteínas identificadas como envolvidas na resposta a seca são promissoras para o desenvolvimento de biomarcadores moleculares funcionais visando auxiliar a seleção de acessos mais tolerantes ao déficit hídrico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estresse abiótico; SDS-PAGE; Eletroforese bidimensional.

**INTRODUÇÃO:** *Stylosanthes scabra* Vogel (Fabaceae) é uma leguminosa de hábito herbáceo, nativa do semiárido brasileiro, sendo amplamente cultivada em ambientes tropicais e subtropicais (WILLIAMS et al., 1984; CAMERON et al., 1996, COSTA, 2015). Apresenta alta plasticidade frente aos fatores abióticos, ocorrendo desde o agreste até o semiárido do Nordeste do Brasil (FAO, 2017). Destaca-se como uma das espécies de importância econômica, principalmente devido a sua capacidade de restaurar a fertilidade e melhorar as propriedades físicas do solo, além de fornecer cobertura vegetal permanente, por apresentar tolerância à seca (NAGAICH et al., 2013), tornando-se alternativa para a melhoria da fertilidade em pastagens consorciadas com gramíneas. Por outro lado, espécies do gênero *Stylosanthes* destacam-se pela sua relevância na atividade agropecuária, principalmente devido seu alto potencial forrageiro, tanto para a alimentação de gado de corte, como para produção leiteira nas



regiões tropicais e subtropicais, além de ser bastante produtiva, com qualidade nutricional significativa, tendo 10% de proteína bruta. Muitas espécies ainda apresentam características de adaptação ao semiárido brasileiro e tolerância às condições bióticas e abióticas, sendo algumas ainda pouco exploradas comercialmente (AYARZA et al., 1997; BARCELLOS et al., 2001; COSTA, 2006). Dentre os maiores desafios na produção de rebanhos está a deficiência de forrageiras produtivas e de alta qualidade nutricional, fator esse que é agravado pelos longos períodos de seca e exploração indiscriminada dos recursos forrageiros nativos (ARAÚJO FILHO, 2013). Além disso, a extensão agrícola para cultivos destinados à produção de grãos e gramíneas para a composição de pastagens, tem se intensificado, principalmente pelo aumento da demanda por alimentos e matéria-prima para alimentação de animais. Assim, mudança na vegetação natural, por pastagens cultivadas no cerrado, por exemplo, criam mudanças ambientais ainda mais importantes e problemáticas desse ecossistema (HORVATHY NETO et al., 2012). A busca por genes e produtos gênicos com novas características em espécies de importância agrícola, biotecnológica e nativas poderá trazer grandes avanços no melhoramento genético desta e de outras leguminosas. É cada vez mais necessário um melhor entendimento dos mecanismos de resposta das plantas em nível celular e molecular frente a tais condições ambientais adversas. As observações de expressão gênica em nível transcricional podem fornecer informações importantes sobre o pool gênico que é transcrito em determinado organismo (CHEN e HARMON, 2006). Para estudos onde a compreensão de mecanismos de resposta ao estresse é o objetivo, a principal abordagem deve ser direcionada a analisar diferentes níveis de estresse, viabilizando a identificação de padrões de expressão de genes e proteínas codificadas como responsivas ao fator de estresse (SENGUPTA et al., 2011). Neste contexto, a proteômica comparativa apresenta-se como uma alternativa adequada e promissora para análises globais de expressão gênica em nível traducional e pós-traducional, mais próxima do fenótipo (CÁNOVAS et al., 2004; PACHECO et al., 2013). Assim, objetivo deste estudo foi identificar proteínas da raiz de *Stylosanthes scabra* submetida ao déficit hídrico.

**METODOLOGIA:** As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação. Após quatro meses de cultivo, as plantas foram categorizadas em dois tratamentos: controle e o déficit hídrico. As plantas do tratamento controle receberam irrigação durante todo o experimento, ao passo que as plantas do outro tratamento foram submetidas ao déficit hídrico progressivo, por um período de 6 h e outro de 24 h, cada um com seu respectivo controle. A parte aérea e radicular foram coletadas separadamente, congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas em -80 °C. De acordo com resultados fisiológicos e bioquímicos prévios (Araújo et al., dados não publicados) os tempos de 6 h e 24 h foram selecionados para análise proteômica. Foi observado que a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> e a condutância estomática apresentaram redução significativa já com 6 h de supressão de rega e os teores de carboidratos, aminoácidos, proteínas e prolina apresentaram aumento nas raízes a partir de 24 h, assim selecionamos o tecido radicular para extra de proteínas. O método utilizando fenol (HURKMAN e TANAKA, 1986) foi usado para extração das proteínas de *S. scabra*, com poucas as modificações. A solução proteica, foi quantificada pelo método Bradford (1976), e a integridade das proteínas foi verificada em SDS-PAGE em gel a 12 %. Foi realizada a focalização isoeletrica utilizando fitas de pH 3-10 linear, com 13 cm para 500 µg de proteínas. Em seguida as proteínas foram separadas em gel 12,5 % (em placas de poliacrilamida vertical) e os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250. Os géis 2D-PAGE foram digitalizados e as imagens foram analisadas com o software ImageMaster 2D Platinum



v7.05, os spots que apresentaram  $ratio \geq 1,5$  para porcentagem de volume (%vol.) e ANOVA significativa ( $p \leq 0,05$ ) foram selecionados como diferencialmente acumuladas (DAPs). Os spots selecionados com variação significativa entre os tratamentos foram excisados e submetidos a digestão utilizando tripsina, de acordo com protocolo especificado por (WEBSTER e OXLEY, 2005) com algumas modificações. Em seguida as amostras foram submetidas ao espectrômetro de massas MALDI-ToF/ToF AutoFlex III. A identificação presumível dos espectros de massa (MS e MS/MS) obtidos na análise dos peptídeos foi realizada com uso dos programas Mascot ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) e SearchGUI (VAUDEL et al., 2011). No Mascot foram utilizados os bancos de proteínas Viridiplantae, Bacteria e outra identificação complementar foi realizada, através de versão privada do programa Mascot, disponibilizada em colaboração com o Centro de Proteômica Avançada da Universidade de Washington, Seattle, EUA. Para o SearchGui foi utilizado como base o proteoma de referência de *Medicago truncatula*, disponível no UniProt.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Na análise comparativa entre os tratamentos das imagens digitalizadas para o tempo 6 h, foram detectados 110 spots com variação significativa. Obteve-se 60 spots exclusivos do tratamento irrigado, 11 exclusivos do tratamento com déficit hídrico e 39 spots comuns a ambos, destes sendo 32 mais acumulados no tratamento com déficit hídrico e sete no irrigado. Nos géis de 24 h, 85 spots foram estatisticamente variáveis, sendo sete exclusivos do tratamento irrigado, 45 exclusivos do tratamento sob déficit hídrico e 33 spots comuns a ambos os tratamentos, onde 22 foram mais acumulados no tratamento sob déficit hídrico e 11 no irrigado. Após análise por MS, das 195 proteínas diferencialmente acumuladas totais (incluindo 6 e 24 h), até o momento foram identificadas 92 DAPs, 58 para o tempo de 6 h e 34 para o tempo de 24 h. Dentre as proteínas identificadas, destacamos a proteína de resistência à doenças, NBS, que apresenta repetições ricas em leucinas (LRR). Alguns estudos relatam a regulação da expressão destes genes através da exposição aos estresses abióticos como seca e salinidade em *Nicotiana benthamiana* (LI et al., 2017). Outra proteína identificada neste trabalho foi a proteína de detoxificação, que já foi relatada em *Arabidopsis*, apresentando função no transporte de alcaloides derivado de plantas, antibióticos e compostos tóxicos e metais pesados como o cádmio (LI et al., 2002). A DEAD-box RNA helicase também identificada, é relatada em estudos sobre regulação de genes nas plantas frente aos estresses abióticos em *Arabidopsis thaliana* (KIM et al., 2008) e estresse salino em arroz (TUTEJA et al., 2013). Outra proteína que apresenta destaque é a proteína tipo dissulfeto isomerase, que apresenta funções na via redox à base de tiorredoxina e faz parte do sistema de defesa antioxidante. Em estudo realizado com genótipos de soja submetidos ao estresse salino, esta proteína apresentou-se como integrante do conjunto de proteínas responsivas ao estresse (MA et al., 2012). As plantas utilizam vias de sinalização comuns para resposta a diferentes fatores de estresse, ou tolerância cruzada, permitindo que a exposição a um tipo de condição atue na regulação de genes envolvidos na resposta a outras condições, tanto de tolerância a estresses abióticos quanto bióticos (VELAZQUEZ et al., 2011; FOYER et al., 2016). As plantas, quando são submetidas às condições de estresse, apresentam alta capacidade de homeostase, mas essa resposta depende da intensidade do estresse, do tempo de exposição e do número de eventos de estresse (CHAVES et al., 2009). Estudos têm demonstrado que, quando a planta sofre uma exposição prévia a um estresse, ela tem a capacidade de responder mais rápido e com mais vigor a um evento de estresse recorrente, esse fenômeno é conhecido como *hardening* (WALTER et al., 2011). Isso implica que as plantas têm a capacidade de memória (*stress imprint*) que é resultado de



mudanças bioquímicas e/ou epigenéticas que ocorrem após a primeira exposição ao estresse (BRUCE et al., 2007).

**CONCLUSÕES:** Acredita-se que o fenômeno *hardening* faça parte do “arsenal” de *S. scabra* em respostas aos estresses, já que como foi observado, o número de proteínas ligadas a eventos de estresse é considerado, em um curto período de supressão de rega (6 h). Essas proteínas identificadas, especialmente as envolvidas na resposta aos estresses abióticos, se revelam como promissoras para o desenvolvimento de biomarcadores moleculares funcionais para a identificação e seleção de acessos tolerantes ao déficit hídrico.

**AGRADECIMENTOS:** CAPES, CETENE, EMBRAPA Semiárido.

#### REFERÊNCIAS:

ARAÚJO FILHO, J. A. Propuestas Tecnológicas para el manejo de la vegetación de la Caatinga com fines pastoriles. In: ROJAS, L. I. **La producción de rumiantes menores en las zonas áridas de Latinoamérica**. Brasília, Embrapa Caprinos e Ovinos, Cap.12, p.281-294, 2013.

AYARZA, M. et al. **Introdução de *Stylosanthes guianensis* Cv. Mineirão em pastagens de *Brachiaria ruziziensis*: Influencia na produção animal e vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Boletim técnico 1, 16p. 1997.

BARCELLOS, A. O. et al. Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 17, 2000, Piracicaba. A planta forrageira no sistema de produção: anais. Piracicaba: FEALQ, 2000. 2. ed. p. 297-357, 2001

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRUCE, T.J.A et al. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, n. 6, p. 603-608, 2007.

CAMERON, D.F., Edye, L.A., Chakraborty, S., Manners, J.M., Liu, C.J., Date, R.A., Boland, R.M. An integrated program to improve anthracnose resistance in *Stylosanthes* —a review. In Proc 8th Australian Agronomy Conf, Toowoomba. The Australian Institute of Agricultural Science, Carlton, Victoria, Australia. 112-115, 1996.

CANOVAS, F. M. et al. Plant proteome analysis. **Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 285-298, 2004.

CHAVES, M. M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany**, v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009.

CHEN, S. X.; HARMON A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v.6, p.5504-5516. 2006.

COSTA, L.C., Da-Valls, J.F.M. ***Stylosanthes* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29854>. Acesso em 14 de Outubro de 2017.

COSTA, N. M. S. **Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw**. 2006. 470f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2006.



DAMERVAL, C. et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. **Electrophoresis**, v. 7, n. 1, p. 52-54, 1986.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2017. Bancos de germoplasma. Foa Fiat Panis. 2017; 1: 1. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000068.htm>. Acessado em 30 de outubro de 2017.

FOYER, C. H. et al. Cross-tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: a focus on resistance to aphid infestation. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 7, p. 2025-2037, 2016.

HORVATHY NETO, A. et al. Consórcio sorgo e braquiária para produção de grãos e biomassa na entressafra. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, suplemento, p. 743-749, 2012.

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant physiology**, v. 81, n. 3, p. 802-806, 1986.

KIM, J. S. et al. Functional characterization of DEAD-box RNA helicases in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. **Plant and cell physiology**, v. 49, n. 10, p. 1563-1571, 2008.

LI, L. et al. Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 5360-5368, 2002.

LI, X. et al. Overexpression of pathogen-induced grapevine TIR-NB-LRR gene VaRGA1 enhances disease resistance and drought and salt tolerance in *Nicotiana benthamiana*. **Protoplasma**, v. 254, n. 2, p. 957-969, 2017.

MA, Hongyu et al. Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 5, p. 1529-1546, 2012.

NAGAICH, D. et al. Assessment of genetic diversity and morpho-physiological traits related to drought tolerance in *Stylosanthes scabra*. **Acta physiologiae plantarum**, v. 35, n. 11, p. 3127-3136, 2013.

PACHECO, C. M. et al. Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 12, p. 5681-5695, 2013.

SENGUPTA, D. et al. A root proteomics-based insight reveals dynamic regulation of root proteins under progressive drought stress and recovery in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Planta**, v. 233, n. 6, p. 1111-1127, 2011.

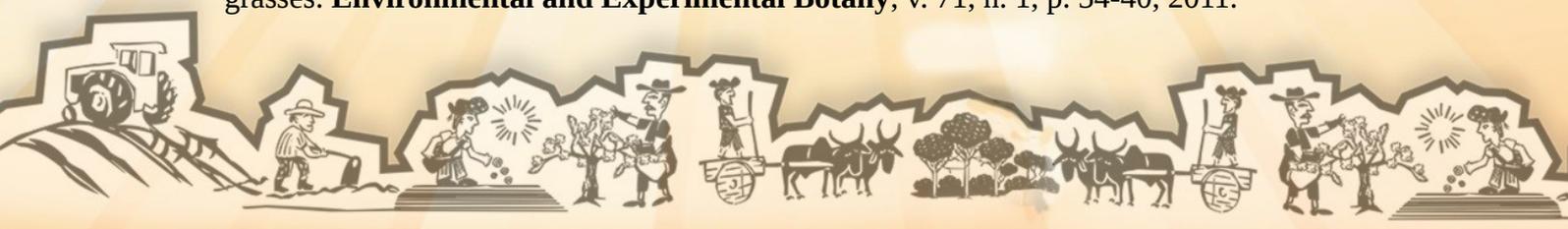
TUTEJA, N. et al. OsSUV3 dual helicase functions in salinity stress tolerance by maintaining photosynthesis and antioxidant machinery in rice (*Oryza sativa* L. cv. IR64). **The Plant Journal**, v. 76, n. 1, p. 115-127, 2013.

VAUDEL, M. et al. SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X! Tandem searches. **Proteomics**, v. 11, n. 5, p. 996-999, 2011.

VELAZQUEZ, F.S.; Guerra, R.R; Calderon, S.L. Abiotic and Biotic Stress Response Crosstalk in Plants. In: Shanker A, Venkateswarlu B (Eds) Abiotic Stress Response in Plants. **Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives**. 3-26, 2011.

WEBSTER J, OXLEY D. Peptide mass fingerprinting: protein identification using MALDI-TOF mass spectrometry. **Chemical Genomics: Reviews and Protocols**. 227-240, 2005.

WALTER, J. et al. Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 1, p. 34-40, 2011.





contato@sinprovs.com.br  
WWW.SINPROVS.COM.BR  
(83) 3322-3222

III SINPROVS  
III SIMPÓSIO NACIONAL DE ESTUDOS E PESQUISAS EM PRODUTOS VEGETAIS

WILLIAMS, R.J., Reid, R., Schultze-Kraft, R., Souza-Costa, N.M., Thomas, B.D.  
Natural distribution of *Stylosanthes*. The biology and agronomy of *Stylosanthes*.  
Academic Press, Sydney, 1984.

