

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE GENÓTIPOS DE ALGODÃO NATURALMENTE COLORIDO SUBMETIDO À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA-B

DIFFERENTIAL PROTEOME ANALYSIS OF NATURALLY COLORED COTTON GENOTYPES SUBMITTED TO ULTRAVIOLET-B RADIATION

Rocha, GMG¹; Silva, FAC¹; Pena, EPN¹; Lima, LM²; Calsa Júnior, T¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Genética, Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Recife, PE, Brasil. geisenilma@hotmail.com; fabiana.acs@gmail.com; eltonnunes1@yahoo.com.br; terciliojr@yahoo.com.br

²Embrapa Algodão, Laboratório de Biotecnologia, Campina Grande, PB, Brasil. liziane.lima@embrapa.br

RESUMO

A demanda por fibras de algodão colorido tem crescido em nível internacional, motivada especialmente pelo apelo ecológico que o manejo proporciona, além da geração de emprego e renda. No entanto, o aumento na incidência de radiação ultravioleta-B (UVB) promove diversas respostas mediadas por processos fotomorfológicos nas plantas. Contudo, as plantas respondem a radiação UVB por meio de adaptações morfológicas e fisiológicas, mas os mecanismos celulares e moleculares que controlam essas adaptações são pouco conhecidos. Objetivou-se com este trabalho identificar proteínas produzidas diferencialmente em folhas de duas cultivares de algodão colorido submetidas à radiação UVB. Plantas com 60 dias após a germinação foram submetidas aos seguintes tratamentos: I- BRS Rubi com UV ambiente; II- BRS Rubi com UV ambiente + UVB adicional; III- BRS Verde com UV ambiente; IV- BRS Verde com UV ambiente + UVB adicional. Após seis dias, folhas foram coletadas e maceradas em N₂ líquido. A extração de proteínas totais foi realizada utilizando o método com TCA 10% e fenol modificado. As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford e separadas em gel SDS-PAGE (12%). As bandas foram excisadas, submetidas à digestão com tripsina e em seguida analisadas em espectrômetro de massas. Foram identificadas proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos e de proteínas, fotossíntese, relacionadas com o crescimento, defesa e proteção contra fatores de estresse oxidativo. Os resultados obtidos poderão ser úteis como biomarcadores funcionais auxiliares na seleção de variedades com maior tolerância à radiação UVB, contribuindo com o programa de melhoramento genético do algodoeiro.

PALAVRAS-CHAVE: *Malvaceae*; *Gossypium hirsutum*; UVB; SDS-PAGE; Estresse abiótico.

INTRODUÇÃO

O algodão planta dicotiledônea, pertencente à família *Malvaceae* e gênero *Gossypium* é a cultura de fibra têxtil mais importante do mundo e fornece a maior parte da fibra usada na indústria têxtil (NIU et al., 2018). O algodão naturalmente colorido possui fibra natural, dispensando o processo de tingimento químico e reduzindo os custos e os problemas ambientais acarretados pela deposição de resíduos tóxicos, sendo assim, agrega valor aos produtos da indústria têxtil por atender a uma demanda do mercado agroecológico (CARVALHO et al., 2011; CARVALHO et al., 2014).

No entanto, as plantas estão expostas a vários estresses ambientais que afetam de maneira negativa seu crescimento, metabolismo e produtividade. Seca, salinidade,



baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes e radiação ultravioleta B (UVB) são alguns dos fatores de estresse que limitam a produtividade das culturas (HOSSAIN et al., 2012).

As plantas submetidas a estresses ambientais desencadeiam vários mecanismos fisiológicos e bioquímicos, a fim de minimizar ou evitar os danos celulares (TAIZ et al., 2017). As plantas respondem a radiação UVB por meio de adaptações morfológicas e fisiológicas, mas os mecanismos celulares e moleculares que controlam essas adaptações são pouco conhecidos (RODRIGUES et al., 2016).

Entretanto, pouco se conhece sobre as proteínas de algodão naturalmente colorido diferencialmente acumuladas em condições de estresse biótico ou abiótico, que podem ser identificadas por análise proteômica. Sendo assim, objetivou-se com este trabalho identificar proteínas produzidas diferencialmente em folhas de duas cultivares de algodão colorido submetidas à radiação UVB.

METODOLOGIA

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, no período de junho a setembro de 2017. Sementes das cultivares BRS Rubi e BRS Verde foram semeadas em bandejas e 15 dias após a germinação, as plântulas foram transplantadas para vasos contendo solo adubado com níveis adequados de macro e micronutrientes, sob condições de fotoperíodo natural.

Plantas com 60 dias após a germinação foram submetidas aos seguintes tratamentos: I- BRS Rubi com UV ambiente (controle); II- BRS Rubi com UV ambiente + UVB adicional (estresse); III- BRS Verde com UV ambiente (controle); IV- BRS Verde com UV ambiente + UVB adicional (estresse).

Como fonte de radiação UVB foram utilizadas oito lâmpadas fluorescentes de 40 W (TL 40W/12 RS SLV; Philips) fixadas em estrutura metálica com sistema de roldanas para regular a distância entre as lâmpadas e o topo das plantas. As lâmpadas foram dispostas 40 cm acima dos vasos e estes foram separados com uma cortina de poliéster para impedir a passagem lateral de UVB para os tratamentos controles (Figura 1). As lâmpadas UVB foram envoltas com acetato de celulose (0,10 mm de espessura; Grafix Plastics) para bloquear a radiação UVC ($\lambda < 280$ nm) (Figura 1).

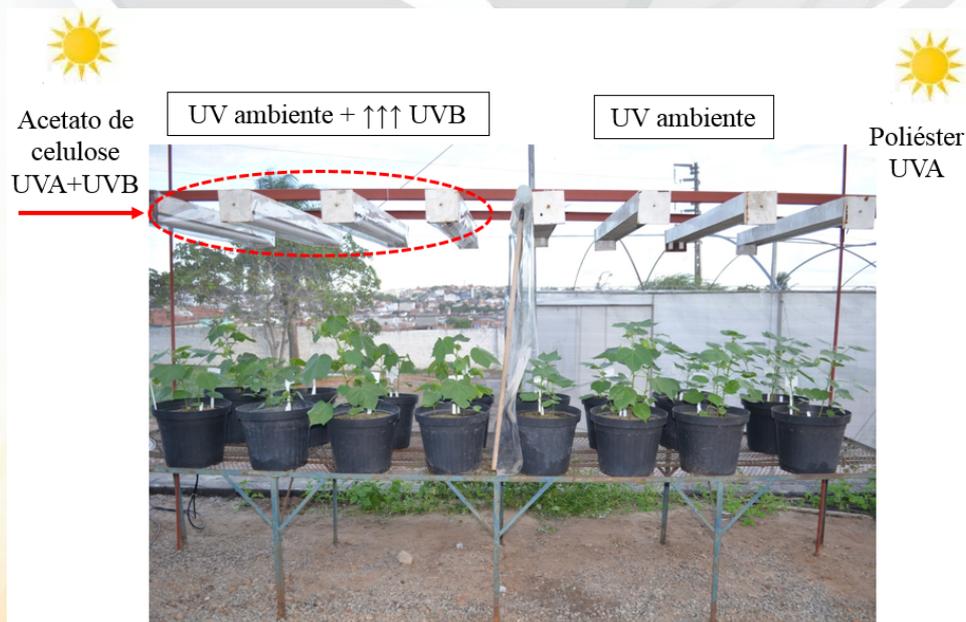


Figura 1. Esquema da transmissão e bloqueio das radiações UVA, UVB e UVC através dos filtros de poliéster e acetato de celulose.

Após seis dias, folhas foram coletadas e maceradas em N₂ líquido. A extração de proteínas totais foi realizada utilizando o método com TCA 10% e fenol modificado, conforme Hurkman e Tanaka (1986). Os extratos proteicos foram quantificados pelo método de Bradford e separadas em gel SDS-PAGE (12%).

Os géis foram escaneados e as bandas que apresentaram maior variação quantitativa na comparação UV ambiente x UV ambiente + UVB adicional foram excisadas, submetidas à digestão com tripsina e em seguida analisadas em espectrômetro de massas AutoFlex III ToF/ToF (*Bruker Daltonics*, Bremen, Alemanha), baseado na ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI/ToF).

A identificação das proteínas foi realizada pela análise dos espectros através do *software* Mascot (matrixscience.com) contra base de dados *Swissprot* e unidade taxonômica *Viridiplantae*. Após a identificação das proteínas, os acessos foram submetidos ao banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) para definição de sua função molecular e processo biológico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se no gel SDS-PAGE bandas definidas em todos os tratamentos. A análise da intensidade de bandas entre tratamentos permitiu identificar diferenças quali-quantitativas que podem refletir variações no proteoma em resposta à radiação UVB (Figura 2).



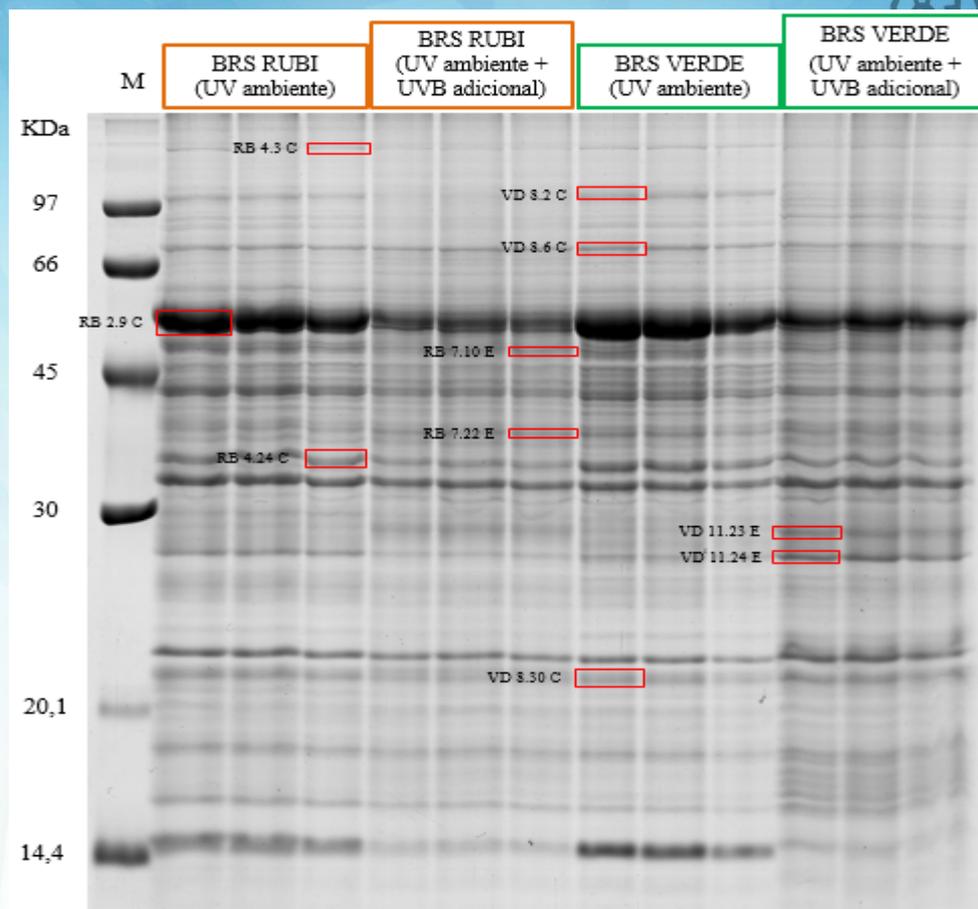


Figura 2. Gel SDS-PAGE de dois genótipos (BRS Rubi e BRS Verde) de algodão naturalmente colorido submetidos à radiação UVB. Marcador de proteínas de baixo peso molecular (GE Low Marker).

A anotação presumível permitiu a identificação de proteínas associadas a respostas da planta à radiação UVB. Foram identificadas proteínas envolvidas com diversos processos biológicos, tais como: metabolismo de carboidratos e de proteínas, fotossíntese, relacionadas com o crescimento, defesa e proteção contra fatores de estresse oxidativo (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação das proteínas diferencialmente expressas em folhas de algodão naturalmente colorido (BRS Rubi e BRS Verde) através de gel SDS-PAGE e espectrometria de massas.

Banda*	Identificação	Score	Proteína	Localização Subcelular	Função
RB 2.9 C	AAL92882.1	83	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase	Cloroplasto	Fotorrespiração
RB 4.3 C	DF257_ARATH	32	Defensina 257	Parede celular	Defesa
RB 4.24 C	CDPKG_ORYSJ	52	Quinase dependente de cálcio 16	Membrana	Transdução de sinal
RB 7.10 E	H2B9_ORYSI	34	Histona H2B.9	Núcleo	Ligação de



						DNA
RB 7.22 E	YCF4_AEGTA	44	Ycf4 fotossistema I	Cloroplasto	Fotossíntese	
VD 8.2 C	GRC13_ORYSJ	34	Glutaredoxina-C13	Citoplasma e núcleo	Transporte de elétrons	
VD 8.6 C	PPO_VICFA	38	Polifenol oxidase A1	Cloroplasto	Processo biossintético de pigmento	
VD 8.30 C	GT643_ARATH	55	Glicosiltransferase 64 C3	Membrana	Glicosilação de proteínas	
VD 11.23 E	YCF4_IPOPU	46	Ycf4 fotossistema I	Cloroplasto	Fotossíntese	
VD 11.24 E	CLPP3_ARATH	43	Protease dependente de ATP	Estroma de cloroplasto	Hidrólise de proteínas	

RB – BRS Rubi; VD – BRS Verde; C – Controle (UV ambiente); E – Estresse (UV ambiente + UVB adicional).

Dentre as várias proteínas identificadas, destaca-se a Rubisco (Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase), uma enzima que está sujeita tanto ao aumento como a diminuição da expressão em condições de estresse (ABREU et al., 2014). Essa enzima atua na fixação do carbono no ciclo de Calvin-Benson. Observa-se que na condição de estresse por radiação UVB, a expressão desta proteína diminuiu tanto para BRS Rubi como para BRS Verde (Figura 2).

Segundo Qureshi e colaboradores (2007), estudos com proteômica são importantes para a compreensão da expressão gênica, pois a análise proteômica fornece um quadro direto dos processos bioquímicos pela verificação das proteínas que desempenham as funções enzimáticas, de sinalização e de regulação codificadas pelo genoma e transcriptoma.

As células vegetais respondem ao estresse desenvolvendo mecanismos de defesa (TAIZ et al., 2017). Essa defesa é provocada pela alteração no padrão de expressão gênica. Isso leva à modulação de certos caminhos metabólicos e defensivos. Devido à expressão gênica alterada sob estresse, ocorre mudanças qualitativas e quantitativas nas proteínas. Estas proteínas podem desempenhar um papel na transdução de sinal, defesa antioxidante, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos poderão ser úteis como biomarcadores funcionais auxiliares na seleção de variedades com maior tolerância à radiação UVB, contribuindo com o programa de melhoramento genético do algodoeiro.

AGRADECIMENTOS

Embrapa Algodão, UFPE, CAPES e RENORBIO.

REFERÊNCIAS





ABREU, C.E.B.; ARAÚJO, G.S.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; COSTA, J.H.; DEBITE, H.B.; MORENO, F.B.M. B.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Proteomic analysis of salt stress and recovery in leaves of *Vigna unguiculata* cultivars differing in salt tolerance. **Plant cell reports**, v.33, p.1289- 1306, 2014.

CARVALHO, L.P.; ANDRADE, F.P.; SILVA FILHO, J.L. Cultivares de algodão colorido no Brasil. **Revista Brasileira de Oleaginosas e fibrosas**, v.15, p.37-44, 2011.

CARVALHO, L.P.; FARIAS, F.J.C.; LIMA, M.M.A.; RODRIGUES, J.I.S. Inheritance of different fiber colors in cotton (*Gossypium barbadense* L.). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.14, p.256-260, 2014.

HOSSAIN, Z.; NOURI, M.Z.; KOMATSU, S. Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. **Journal of Proteome Research**, v.11, p.37-48, 2012.

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

NIU, J.,; ZHANG S.; LIU, S.,; MA, H.; CHEN, J.; SHEN, Q.; GE, C.; ZHANG, X.; PANG, C.; ZHAO, X. The compensation effects of physiology and yield in cotton after drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v.224-225, p.30-48, 2018.

QURESHI, M.I.; QADIR, S.; ZOLLA, L. Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.1239-1260, 2007.

RODRIGUES, J. D.; SILVA, C. R. C.; PEREIRA, R. F.; RAMOS, J. P. C.; MELO FILHO, P. A.; CAVALCANTI, J. J. V.; SANTOS, R. C. Characterization of water-stress tolerant cotton cultivars based on plant growth and in activity of antioxidant enzymes. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, p.3763-3770, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6a ed. Artmed, 888p, 2017.

