

ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL DE HÍBRIDOS DE MILHO EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO NO MUNICÍPIO DE POMBAL-PB.

DIFFERENTIALY PROTEOMIC ANALYZES OF MAYZE HYBRIDS UNDER WATER DEFICIT IN POMBAL-PB

Pinto, MC¹; Oliveira, OH¹; Rocha, GMG²; Calsa Júnior, T²; Dutra Filho, JA¹

¹ Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, CP 58840-000, Pombal-PB. Brasil. cabralpmariana@gmail.com; odairhonorato2020@gmail.com; joaodutrafilho7@gmail.com

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, CP 50670-901, Recife-PE. Brasil. geisenilma@hotmail.com; terciliojr@yahoo.com.br

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura de relevada importância econômica sendo fonte de alimento para famílias de baixa renda no semiárido do Nordeste. Para que todo seu potencial genético se expresse é de suma importância tratos culturais adequados e boas condições ambientais principalmente precipitação pluviométrica, este último é de grande escassez nas regiões semiáridas. O estresse hídrico é um fator limitante de produção, sendo imprescindíveis plantas adaptadas a essa condição ambiental para incremento na produtividade que se expressa em caracteres agrônômicos favoráveis. O melhoramento genético de planta com o auxílio da análise proteômica, dentre outras ferramentas, visa desenvolver genótipos que se adaptem a essas condições extremas. Neste trabalho, objetivou-se identificar peptídeos de híbridos de milho em resposta ao déficit hídrico. O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG campus de Pombal. As plantas foram cultivadas em vasos de 20 L por 90 dias. Os híbridos de milho utilizados foram: Robusto, 2B688PW, AG1051, 2B604PW, 30F53YH e AG8677PRO2. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3 repetições e 2 níveis de água (T1 = 30% da capacidade de água do solo; T2 = 60% da capacidade de água do solo). Para a extração de proteínas totais de folhas de milho utilizou-se o método fenol modificado. Dentre os genótipos avaliados, destacaram os híbridos 2B604PW (controle) e 30F53YH (estressado) e em ambos identificaram-se peptídeos relacionados ao estresse hídrico, os quais estão relacionados a vários processos biológicos realizados pelas plantas.

PALAVRAS-CHAVE: Estresse abiótico; SDS-PAGE; *Zea mays*

INTRODUÇÃO





III SINPROVS
III SIMPÓSIO NACIONAL DE ESTUDOS E AVANÇOS EM
PRODUÇÃO VEGETAL NO SUDOESTE PARANENSE

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

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea que pertence à família Poaceae, com origem americana, mais especificamente no México, sendo domesticado pelos povos da América Central (PATERNIANI et al., 2000). Economicamente, caracteriza-se por sua diversidade nas formas de utilização, que vai desde a alimentação até a indústria de alta tecnologia.

Estresses ambientais ou abióticos representam um dos principais fatores limitantes para a produtividade agrícola no mundo inteiro e a capacidade das plantas em resistir a tal estresse é de grande valia para o agronegócio de qualquer país (Nogueira et al. 2004; Shao et al., 2008).

Diversos acessos não comerciais e selvagens são cultivados e armazenados em bancos de germoplasma para adicionar diversidade genética durante processo de seleção de novas sementes para o desenvolvimento de novos híbridos adaptados as condições edafoclimáticas das diversas regiões produtoras (CRUZ et al., 2007). O melhoramento genético e a biotecnologia são ferramentas de grande relevância para agricultura moderna e para o mercado, de acordo com a Embrapa (2014), nas safras de 2013/14 foram disponibilizadas 467 cultivares de milho, sendo 253 transgênicos e 214 convencionais.

A utilização comercial de novos híbridos que apresentem tolerância ao estresse por déficit hídrico contribui para o aumento da produtividade em regiões com limitação hídrica (LI et al., 2009), principalmente nas regiões semiáridas do Nordeste do Brasil.

A identificação de peptídeos relacionados a uma determinada condição química de um ser vivo garante a identificação das moléculas responsáveis pelo estado molecular encontrado no mesmo. Para estresse hídrico, permite-se conhecer as proteínas que conferem a planta a capacidade da planta de tolerar as condições adversas impostas.

Em virtude dos fatos mencionados, objetivou-se com esse trabalho identificar peptídeos de híbridos de milho em resposta ao déficit hídrico cultivados nas condições edafoclimáticas de Pombal-PB.

METODOLOGIA

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG campus de Pombal, as plantas foram cultivadas em vasos de 20 L por 90 dias. Os híbridos de milho utilizados foram: Robusto, 2B688PW, AG1051, 2B604PW, 30F53YH e AG8677PRO2. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3 repetições e 2 níveis de água (N1 = 30% da capacidade de água do solo; N2 = 60% da capacidade de água do solo).

A extração de proteínas totais de folhas de milho submetido a diferentes tratamentos (controle e estressado) foram realizadas utilizando o método com fenol conforme Hurkman e Tanaka (1986) com modificações conforme Boaretto (2012). Os extratos proteicos foram quantificados de acordo com o protocolo descrito por Bradford (1976).

Para verificar a integridade das proteínas realizou-se uma eletroforese em gel SDS-PAGE 1D (12%). Os géis foram escaneados e as bandas que apresentaram maior variação quantitativa na comparação estresse x controle 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

III SINPROVS
III SIMPÓSIO NACIONAL DE ESTUDOS PARA
PRODUÇÃO VEGETAL NO SEMÁRIDO

A visualização das bandas no gel SDS-PAGE permitiu a observação de bandas definidas em ambos os tratamentos (Figura 1).

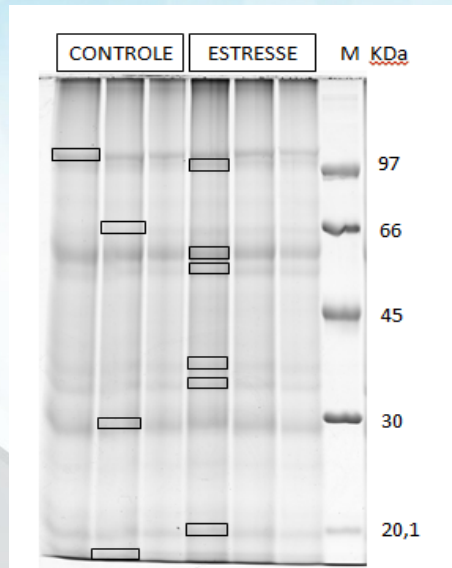


Figura 1. Gel SDS-PAGE de milho submetidos aos tratamentos controle com 60% de água no solo e estresse com 30% de água no solo. Marcador de proteínas de baixo peso molecular (GE Low Marker).

Dentre os genótipos avaliados, destacaram-se os híbridos 2B604PW (controle) e 30F53YH (estressado) e em ambos, identificaram-se peptídeos relacionados ao estresse hídrico.

No tratamento controle, observou-se as seguintes proteínas: Glutaredoxina-C13, Fator de transcrição GATA 19, Quinase 6, Cadeia leve-intermediária 2 da dineína citoplasmática 1. No tratamento estressado foram identificadas as proteínas: Molibdopterina sintase, Quisase 6, Domínio PsbP, Quinase 6, Expansin-B6 e Molibdopterina sintase.

Tabela 1: Identificação presumível das proteínas de folha de milho submetidas aos tratamentos controle (V4T1R2) e estresse (V5T1R2), por meio do programa Mascot.

| Tratamento | Spot ID | Acesso | Proteína | Score | Organismo | Função |
|------------|---------|--------|------------------------------|-------|-----------------------------|------------------------|
| Controle | 1.1_C | Q0IRB0 | Glutaredoxina-C13 | 47 | <i>Oryza sativa</i> | Transporte de elétrons |
| | 2.3_C | Q0DNU1 | Fator de transcrição GATA 19 | 49 | <i>Oryza sativa</i> | Diferenciação celular |
| | 2.8_C | Q38872 | Quinase 6 | 38 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Atividade catalítica |



| | | | | | | |
|----------|--------|--------|---|----|----------------------------------|-----------------------------|
| | 2.10_C | Q7XA07 | Cadeia leve-intermediária 2 da dineína citoplasmática 1 | 40 | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | Proteína de desenvolvimento |
| Estresse | 1.2_E | O22827 | Molibdopterina sintase | 39 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Atividade catalítica |
| | 1.4_E | Q38872 | Quinase 6 | 36 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Atividade catalítica |
| | 1.5_E | O49292 | Domínio PsbP | 41 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Fotossíntese |
| | 1.6_E | Q38872 | Quinase 6 | 43 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Atividade catalítica |
| | 1.7_E | Q61VU7 | Expansin-B6 | 49 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Reprodução |
| | 1.9_E | O22827 | Molibdopterina sintase | 39 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Atividade catalítica |

Os estudos com proteômicas 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 (Qureshi et al, 2007).

Nos peptídeos encontrados, há a relação direta destes a diversos processos biológicos como: fotossíntese, defesa, metabolismo de carboidratos, dentre outros processos responsáveis pelo mecanismo de tolerância ao estresse hídrico. Tais proteínas foram previamente identificadas em trabalhos com milho, cana-de-açúcar e outras espécies cultivadas, sendo as mesmas relacionadas ao estresse por déficit hídrico. Sendo assim, híbridos estudados tem grande potencial de produção em condições de escassez de água, sem que sua produtividade seja afetada negativamente.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, esses híbridos podem ser utilizados como genitores em programas de melhoramento genético e os peptídeos identificados no desenvolvimento de marcadores funcionais a serem usados na seleção de novos híbridos para as condições em que se desenvolveu o experimento.

AGRADECIMENTOS: CNPq, Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas-UFPE e UFCG.

REFERÊNCIAS

BOARETTO, L. F. (2012) Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose (Doctoral dissertation Escola Superior de Agricultura —Luiz de Queiroz) 178pp.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A. **Cultivares de milho disponíveis no mercado de sementes do Brasil para a safra 2005/06**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA-. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/> >. Acesso em 15março.2018.





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

HURKMAN, W. J; Tanaka, C. K. (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. **Plant Physiology** 81:3, 802-806.

LI et al., (2009): LI, Y.; SPERRY, J. S.; SHAO, M.; Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 66, p. 341-346, 2009.

NOGUEIRA, R.J.M.C. et al. Stomatic behaviour and leaf water potential in young plants of *Annona squamosa* submitted to saline stress. **Fruits**. v. 59, n. 3, p. 209-214, 2004.

PATERNIANI, E.; NASS, L. L.; SANTOS, M. X. **O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil: uma abordagem histórica da utilização do germoplasma**. In: UDRY, C.W. PERSPECTIVAS PARA A AGROPECUÁRIA; SAFRA 2015/2016; VOLUME3. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_24_11_44_50_perspectivas_agropecuaria_2015-16_-_produtos_verao.pdf> Acesso em: 27abril.2016.

QURESHI, M. I.; QADIR, S.; ZOLLA, L. (2007). Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *J Plant Physiol*. 164:1239-1260.

SHAO, H.; CHU, L.; JALEEL, C. A.; ZHAO, C. Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, p. 215-225, 2008.

