

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOLOGIA

DETECÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE DEFESA HOMÓLOGA À CISTATINA DO TOMATE EM PLANTAS DE SABOEIRO (*SAPINDUS SAPONÁRIA*)

¹ Aloma Nogueira Rebello da Silva (IC-UNIRIO); ¹ César Luis Siqueira Junior (orientador).

1- Instituto de Biociências (IBIO), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro;

Apoio financeiro: UNIRIO, FAPERJ

Palavras-chave: sapindácea; defesa induzida; metil jasmonato; ferimento;

INTRODUÇÃO

Espécies da família Sapindaceae são conhecidos por seus usos medicinais tradicionais como diurético, expectorante, sedativo, vermífugo e dermatite em muitas partes do mundo. As investigações químicas desta família levaram ao isolamento de saponinas, terpenos e flavonóides, entre outros metabólitos secundários vegetais. Várias saponinas, sesquiterpenos acíclicos foram isolados como principais metabólitos secundários de várias espécies de Sapindaceae utilizadas na medicina oriental tradicional (Cavalcanti et al. 2001). O saboeiro (*Sapindus saponaria*), uma planta da família das Sapindaceae, caracteriza-se como uma árvore de médio porte que ocorre nos trópicos, na América e na Índia, onde utilizam sua fruta como sabão, também é utilizado para a recuperação de margens degradadas de rios (Paoli e Santos, 1998), e como remédio contra lesões de pele causadas por fungos (Murgu e Rodrigues Filho, 2006). As grandes perdas na agricultura se devem as pragas e patógenos (vírus, fungos e bactérias), estes são responsáveis por causar injúrias e doenças, o saboeiro encontra-se diariamente exposto a esses estresses, porém ao longo da coevolução dos vegetais e seus predadores, os vegetais desenvolveram meios de se defender, através de uma linguagem química. Ao longo dos anos, estudos sobre a biossíntese e a regulação de compostos químicos de plantas associados as defesas tem sido conduzidos. Através desse mecanismo químico, as plantas podem produzir compostos ou moléculas capazes de retardar, ou até mesmo interromper o processo de invasão. A partir da ação do predador, lesionando a folha, diversos genes defensivos são induzidos de modo que ocorra o reconhecimento de diferentes moléculas sinalizadoras. Esta cadeia complexa resulta na resposta de defesa induzida, podendo ser caracterizada por: modificações estruturais (Benhamou, 1996) como também produção de compostos químicos. Entre as diferentes moléculas induzidas podemos citar os inibidores de proteinases, as peroxidases, as polifenol oxidases, as proteínas PR entre outras (Ryan, 1990; Ananthakrishnan, 1999; Mitra et al, 2008). Os inibidores de proteinase estão relacionados às suas funções como compostos de defesas de vegetais contra insetos, bem como ao seu potencial como uma ferramenta para obtenção de vegetais resistentes a pragas (Franco, et al 1999). No presente estudo, plantas de saboeiro foram analisadas em relação ao seu mecanismo de defesa, com ênfase em sua produção de proteínas de defesa induzidas em resposta a estímulos, tais como: ferimento mecânico, semelhante a mastigação por insetos herbívoros e tratamento com moléculas eliciadoras como o metil jasmonato (MeJa).

OBJETIVO

Detectar e caracterizar inibidores de proteinases cisteínicas (cistatinas) em folhas de saboeiro (*Sapindus saponaria*) envolvidos no mecanismo de resposta ao ataque de predadores.

METODOLOGIA

Material vegetal

Sementes de saboeiro foram escarificadas em dois lados opostos durante aproximadamente 1 minuto, foram plantadas em vermiculita, colocadas em estufa BOD com iluminação diária num período de 12 horas à 30°C. Após aproximadamente 20 dias, a planta já possuía folhas com tamanho adequado para a extração de proteína de tecido foliar. A fim de avaliar o mecanismo de defesa dessas plantas, as mesmas foram submetidas dois tratamentos: A) ferimento mecânico utilizando uma pinça hemostática, denominando esse tratamento de folhas “feridas”, enquanto que as folhas opostas não feridas receberam a denominação de “sistêmicas”; B) tratamento com metil jasmonato, onde as plantas foram submetidas a vapores de metil jasmonato (MeJa) em recipientes de plástico hermeticamente fechados.

Extração de proteínas a partir do material foliar

A extração de proteínas do material foliar, se deu através de maceração de folhas de saboeiro em nitrogênio líquido e adição de tampão de extração (Tris HCl 20 mM, Sacarose 10%, EDTA 2mM, β -mercaptoetanol 2mM, pH 7,2) e PVPP (10% do peso seco das folhas) ao pó macerado. Foi utilizada a proporção de 3 mL de tampão para cada 1g de folhas. O extrato foi centrifugado- durante 20 min a 14.000 xg, a 4°C. O sedimentado foi descartado e o sobrenadante foi novamente centrifugado por 10 min a 14.000 xg. Após esse processo, o material sedimentado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado como extrato bruto contendo proteínas de defesa para os ensaios de inibição de atividade de papaína.

Análise da atividade enzimática de papaína em presença de extrato foliar de saboeiro

A fim de avaliar a atividade enzimática de papaína em presença de extrato foliar utilizou-se BANA (Na-Benzoyl-DL-Arginine β -Naphthylamide) (SIGMA-ALDRICH) de acordo com a metodologia descrita por Siqueira Junior et al (2002). A enzima papaína (5 μ g) foi pré-incubada com 100 μ g do extrato bruto

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

por um período de 5 min a 37°C em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0 contendo EDTA 2.5 mM e β -mercaptoetanol 25 mM. A reação foi iniciada pela adição de 35 μ L de BANA 5 mM em DMSO 10%, para um volume total de ensaio de 350 μ L. Após a incubação a 37 °C durante 10 min, parou-se a reação pela adição de 500 μ L de HCl 2% em etanol e a coloração foi obtida pela adição de 500 μ L de p-dimetilaminacinnaldeído 0,06% em etanol. Avaliou-se a atividade enzimática espectrofotometricamente a 540 nm, utilizando um leitor de Elisa. A inibição foi avaliada como porcentagem de redução da absorbância em relação à amostra controle.

Fracionamento por SDS-PAGE

As amostras proteicas extraídas foram fracionadas em gel de poliacrilamida 10% para a separação de proteínas. Após fracionamento um dos géis foi corado e solução corante, contendo 40% metanol, 10% ácido acético e 0,1 % coomassie por 40 minutos e descorado em solução descorante contendo 40% metanol, 10% ácido acético; enquanto que o outro gel foi submetido a eletrotransferência proteica para membrana de PVDF.

Imunodeteção de proteínas de defesa em tecido vegetal

Os ensaios de imunodeteção foram conduzidos conforme metodologia descrita por Towbin et al. (1979). A proteínas fracionadas por SDS_PAGE foram eletrotransferidas para membrana de PVDF em tampão fosfato 50 mM pH 7,4 durante um período de 2 horas a 10V. Após a transferência, incubou-se a membrana em tampão de bloqueio Tris 20mM pH 7,5, NaCl 100 mM, leite em pó 5% durante 1 hora. Posteriormente a esse período a membrana foi lavada em tampão da lavagem (tampão de bloqueio na ausência de leite) por 3 vezes durante 10 minutos cada. Em sequência a membrana foi incubada em solução de bloqueio adicionando o anticorpo policlonal produzido em coelho contra a cistatina do tomate em uma diluição de 1:10.000 por 2 horas. Em seguida a membrana foi novamente lavada no tampão de lavagem por 3 vezes de 10 minutos cada e a seguir incubada em tampão de bloqueio contendo proteína A peroxidase (atuando como anticorpo secundário) em uma diluição de 1:5.000 por 1,5 hora. Após esse período, a membrana foi novamente lavada nas condições descritas acima e em seguida revelada com a utilização de TrueBlue Peroxidase Substrate, produzido pela Sinapse Biotecnologia.

RESULTADOS

Os resultados obtidos através da indução das plantas por injúria mecânica e Metil Jasmonato durante 24 horas, indicam que a planta produz proteínas com atividade de inibidores de proteinase cisteínica (cistatinas) em resposta ao tratamento. Com a adição de 100 μ g de proteína total do extrato bruto de saboeiro, foi observada uma redução de ~70% na atividade catalítica da enzima comercial papaína nas amostras "Ferida" e "MeJa". As análises por SDS-PAGE e imunoblotting permitiram a detecção de uma banda de ~40kDa que reagiu cruzadamente com um anticorpo policlonal produzido contra cistatina de folhas de tomate.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode ser observada a presença de uma proteína de ~40 kDa que reage cruzadamente com anticorpos produzidos contra cistatina de tomate, corroborando a indução de cistatinas em folhas de saboeiro em resposta a ferimento e tratamento com MeJa.

REFERÊNCIAS

- ANANTHAKRISHNAN, T.N. (1999) Induced responses, signal diversity and plant defense: implications in insect phytophagy. *Curr. Sci.* 76: 285.
- BENHAMOU, N. (1996) Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science.* 1: 233.
- CAVALCANTI SB, TELES HL, SILVA DHS, FURLAN M, YOUNG MCM AND BOLZANI V. (2001) New tetra-acetylated oligosaccharide diterpene from *Cupania vernalis*. *J Braz Chem Soc* 12: 413-416.
- FRANCO, O. L. ; GROSSI-DE-SA, M.F. Resistencia de Plantas a insectos- Inibidores de enzimas digestivas e a obtenção de plantas resistentes. *Biotecnologia*, v. 11, p. 36-40, 1999.
- MITRA, S., WUENSCH, H., GIRI, A. P., HIVRALE, V., BALDWIN, I.T. (2008) Silencing 7 herbivory-regulated proteins in *Nicotiana attenuata* to understand their function in plant-herbivory interactions. *Funct. Ecol.* 22:606-615.
- MURGU M AND RODRIGUES-FILHO E. (2006) Dereplication of glycosides from *Sapindus saponaria* using liquid chromatography-mass spectrometry *J Braz Chem Soc* 17: 1281-1290.
- PAOLI, A. A. S., SANTOS, M. R. O. (1998) Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sapindus saponaria* L. (SAPINDACEAE). *Revista Brasileira de Sementes.* 20: 147-153.
- RYAN, C.A. (1990) Proteinase inhibitors in plant: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual. Review of Phytopathology.* 28: 425.
- SIQUEIRA JUNIOR, C.L., FERNANDES, K.V.S., MACHADO, O.L.T., CUNHA, M., GOMES, V. M., MOURA, D., JACINTO, T. (2002) 87 kDa Tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* 40: 247.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350.