

Análise do perfil protéico de calos embriogênicos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) sob estresse salino.

DANTAS, Cibelle Vanúcia Santana¹; GOMES, Isabele Aragão²; MARQUES, Maria Tereza França²; MACEDO, Cristiane Elizabeth Costa³ & UCHÔA, Adriana F.³

¹Bolsista Pibic CNPQ, estudante do curso de Ciência Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Campos Universitário, Lagoa Nova, s/n, Centro de Biociências-Departamento de Biologia Celular e Genética, fone (84) 32153425; CEP 59072970, Natal, RN, (cibelley_rn@hotmail.com); ²Estudantes do curso de Ciência Biológicas UFRN; ³Profas. Dras. do Departamento de Biologia Celular e Genética da UFRN.

INTRODUÇÃO

O estado do Rio Grande do Norte, situado na região Nordeste (NE) do país é um dos grandes produtores de cana-de-açúcar no Brasil, entretanto tal região possui quase 92% de seu território inserido em clima semi-árido onde a forte escassez pluviométrica provoca no solo já pobre e deficiente em água um aumento de salinização. Esta salinização excessiva do solo ocorre em muitas regiões áridas e semi-áridas do mundo inibindo o crescimento e a produtividade das plantas. Desta forma a cana-de-açúcar são constantemente submetidas ao estresse salino, reduzindo assim a produtividade agrícola.

As plantas expostas à salinidade estão sempre alterando seu metabolismo e ativando diferentes mecanismos de resistência para se adaptar e conviver com este tipo de estresse ambiental. Uma das estratégias de sobrevivência em ambientes salinos é o ajustamento osmótico, seja através do acúmulo e/ou da compartimentalização de solutos orgânicos e inorgânicos. Basicamente, esse mecanismo envolve dois processos: absorção de íons do sistema radicular seguido pelo acúmulo dos mesmos dentro dos vacúolos e síntese de solutos orgânicos que são acumulados no citosol.

Dentre os solutos mais conhecidos destacam-se além da prolina (Yoshida *et al.*, 1997), proteínas solúveis (Niu *et al.*, 1997); carboidratos (Garcia *et al.*, 1997) e poliaminas (Turano *et al.*, 1997), todos esses com a finalidade de proteger os tecidos vegetais do estresse osmótico. Neste sentido, diferentes pesquisas têm sido realizadas na tentativa de melhor conhecer os mecanismos de toxidez e resistência a esse fator de estresse.

Estudos bioquímicos, relacionados a proteínas que provavelmente possam estar implicadas em mecanismos de tolerância a salinidade, são de grande interesse dentro dos programas de melhoramento genético, pois com o auxílio de técnicas moleculares, pode-se localizar o ou os genes responsáveis que conferem a resistência a salinidade e posteriormente introduzi-los dentro de plantas sensíveis.

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi dosar as proteínas totais e analisar o perfil protéico de calos embriogênicos expostos ao cloreto de sódio (NaCl), agente estressante utilizado para simular o estresse salino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extração de proteínas dos calos de cana-de-açúcar

Explantos de cana-de-açúcar da variedade SP 813250 foram cultivados por 90 dias em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de hormônio 2,4-D para a formação de calos. Após este período os calos foram transferidos para o mesmo meio contendo concentrações crescentes de NaCl (0; 50; 100 e 200 mM) para induzir um estresse salino e mantidos neste meio por 15 dias. Em seguida, os calos foram retirados do meio de cultivo, lavados, secos em papel toalha e pesados. Cerca de 600 mg de cada calo foram submetidos a rápido

congelamento e pulverização em nitrogênio líquido, a farinha de calos foi obtida com o auxílio de um almofariz e pistilo. A farinha de cada calo foi transferida para um tubo de centrifuga (Fálcón de 14 mL) ao qual foram adicionados 4 mL de tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,6. Os extratos foram incubados em banho de gelo por 2 horas. Após este período o extrato bruto foi centrifugado a 21.000 x g por 10 min a 4 °C. O sedimentado (precipitado) foi descartado e o sobrenadante coletado para a determinação da quantidade de proteína solúvel total e análise por eletroforese em gel de poliacrilamida do perfil protéico.

Determinação de proteínas.

As determinações de proteínas solúveis totais dos calos foram feitas segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se como padrão albumina sérica bovina (BSA).

Eletroforese em gel de poliacrilamida.

As proteínas foram submetidas à precipitação por 30 min com TCA (ácido tricloroacético) a 100 % na proporção de 9:1. Após este período, as proteínas precipitadas foram obtidas por centrifugação a 21.500 x g por 15 min a 12° C. O precipitado foi lavado três vezes com acetona gelada e centrifugado com descrito acima. A análise do perfil eletroforético das proteínas dos calos submetidos a diferentes concentrações de NaCl foi realizada segundo metodologia de Laemmli (1970), por eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %) na presença de SDS. A eletroforese foi processada a voltagem constante de 50 V no gel de aplicação e 100 V no gel de separação. Após a corrida o gel foi revelado segundo o método descrito por Shevchenko (1996) com modificações, usando-se nitrato de prata.

RESULTADOS E DISCUSÃO

A adição de NaCl ao meio de cultura afetou a concentração de proteínas solúveis totais nos calos embriogênicos de cana-de-açúcar submetidos ao estresse salino, apresentando uma diminuição ou queda de 35,1 % da proteína solúvel total na presença de 50 mM de NaCl, seguida de uma restauração da concentração a 100 mM, e um aumento de 29,5 % na dose mais elevada (200 mM de NaCl) quando comparada a concentração de proteínas do controle na ausência do sal (Figura 1). Provavelmente a dose de 50 mM de NaCl tenha induzido uma redução na síntese e/ou um aumento na degradação de proteínas solúveis totais e as doses mais elevadas (100 e 200 mM) uma resposta inversa ou um “turnover” de proteínas envolvidas no ajustamento osmótico dos calos. Tais hipóteses corroboram com os resultados obtidos do perfil protéico em gel de poliacrilamida onde se pode observar uma redução de algumas bandas de proteínas com massa molecular entre 30 e 35 kDa nos extratos dos calos cultivados em meio contendo 50 mM de NaCl, já nos calos cultivados em meio contendo 100 e 200 mM de NaCl é possível observar a intensificação de algumas bandas de alta massa molecular, variando entre 100 e 130 kDa, indicadas na figura por setas (Figura 2).

O estresse hídrico ou salino provoca o ajustamento osmótico que proporciona à planta um abaixamento do potencial osmótico, mediante um aumento líquido nos solutos intracelular. Esse ajustamento pode auxiliar a planta a manter o turgor, sustentando, dessa maneira a alongação celular e expansão de regiões de crescimento com o desenvolvimento do déficit (Premachandra *et al.*, 1992). Segundo Sancho *et al.*, 1996, as plantas respondem ao estresse salino desenvolvendo mecanismos de tolerância como o acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos, requeridos para manter o turgor necessário ao crescimento. O NaCl provoca diminuição da síntese de proteína e aumenta a hidrólise protéica em grande grupo de plantas, sendo a hidrólise considerada o efeito primário do sal. O decréscimo no conteúdo de proteína pode refletir retardamento na síntese protéica ou aceleração na sua degradação, levando ao aumento na quantidade de aminoácidos livres ou à inibição da incorporação destes aminoácidos nas proteínas.

Os calos embriogênicos de cana-de-açúcar da variedade SP 813250 submetidos a estresse salino com concentrações entre 50 e 200 mM de NaCl apresentaram uma alteração tanto na concentração, quanto no perfil de proteínas. Estes dados sugerem que na presença de NaCl nestas concentrações pode estar ocorrendo um ajuste do metabolismo celular dos calos. Com degradação de proteínas e conseqüente liberação de aminoácidos livres que podem atuar neste ajustamento osmótico e também servir como fonte de nitrogênio para a síntese de novas proteínas envolvidas neste ajuste.

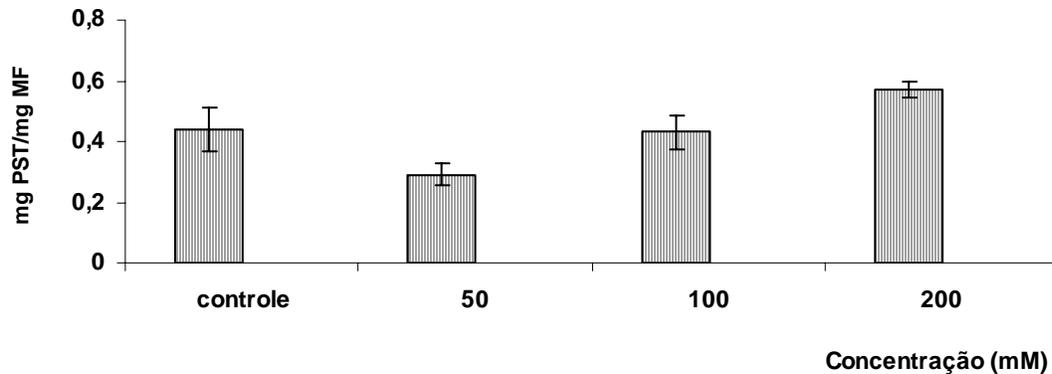


Figura 1 – Concentração de proteínas solúveis totais (PST) em calos de cana-de-açúcar da variedade SP 813250 submetidos a diferentes concentrações de NaCl (Controle = 0; 50; 100 e 200mM) durante quinze dias.

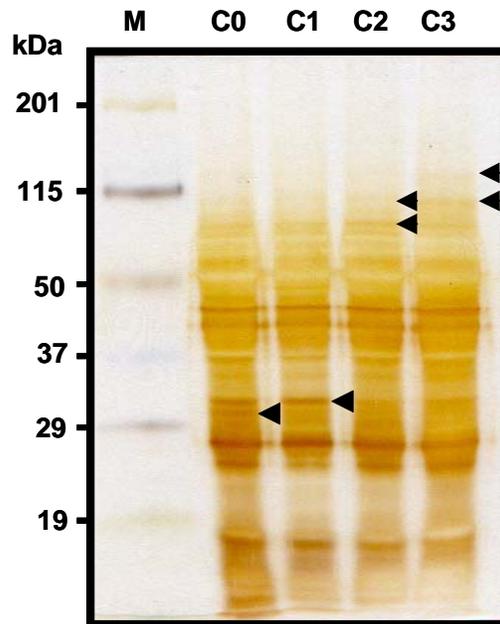


Figura 2 – Perfil eletroforético de proteínas totais em SDS-PAGE de calos de cana-de-açúcar da variedade SP 813250 submetidos a diferentes concentrações de NaCl (Controle = 0; 50; 100 e 200mM) durante quinze dias. As setas indicam bandas protéicas intensificadas com as

concentrações de 100 e 200 mM e as cabeças de setas indicam as proteínas que apresentaram redução com as concentrações de 100 e 200 mM de NaCl.

CONCLUSÃO

As doses de NaCl adicionadas ao meio de cultura dos calos embriogênicos de cana-de-açúcar da variedade SP813250 afetaram a concentração de proteínas e o perfil protéico. A concentração de 50mM de NaCl promoveu uma redução na concentração de proteínas solúveis totais e alterações no padrão de proteínas, quando comparada ao tratamento controle. Nas concentrações de 100 e 200 mM de NaCl ocorreu um aumento na concentração de proteínas solúveis totais e uma alteração no perfil protéico dos extratos dos calos, com o surgimento de bandas com massa molecular entre 100 e 130 kDa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, M. M. A., 1976. rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Garcia, A. B.; Engler, J. A.; Iyer, S.; Gerat, S.T.; Montagu, M.V. & Caplan, A. B., 1997. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiology*, 115:159-169.
- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Murashige T. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Niu, D. K.; Wang, M. G. & Wang, Y. F., 1997. Plant cellular osmotica. *Acta Biotheoretica*, 45:161-169.
- Premachandra, G. S., Saneoka, H. & Ogata, S., 1991. Cell membrane stability and leaf water relations as affected by potassium nutrition of water stressed maize. *Journal of Experimental Botany*, 42 : 739-745.
- Sancho, M. A.; Forchetti, S. M.; Pliego, F.; Valpuesta, V.; Quesada, M. A., 1996. Peroxidase activity and isoenzymes in the culture medium of NaCl adapted tomato suspension cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v.44, p.161-167,.
- Shevchenko, A.; Wilm, A.; Vorm, O. & Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*; 68 (5) 850 - 858.
- Turano, F. J.; Kramer, G. F. & Wang, C. Y., 1997. The effect of methionine, ethylene and polyamine catabolic intermediates on polyamine accumulation in detached soybean leaves. *Physiologia Plantarum*, 101:510-518.
- Yoshida, Y.; Kyiosue, T.; Nakashima, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K., 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant and Cell Physiology*, 38:1095-1102.

PALAVRAS CHAVE:

Saccharum officinarum, perfil protéico, ajuste osmótico e estresse salino.

¹AGRADECIMENTOS

¹ A Usina Estivas, CNPq, LBMG-DBG-UFRN, DBQ-UFRN e FINEP.