

Proteínas Resistentes ao Calor em Grãos de Linhagens de Milho Tolerantes aos Grãos Ardidos

Rafael Oliveira Silio Vieira¹, Gabriella Santos Pereira¹, Édila Resende Von Pinho¹, Renzo Garcia Von Pinho¹ e Juan Rodrigues Privatte¹

¹Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, rafaelosv@yahoo.com.br; gabipereira87@yao.com.br; edila@dag.ufla.br; renzo@dag.ufla.br; juanRP@agronomia.ufla.br

RESUMO – Na literatura não há relatos sobre a relação de proteínas resistentes ao calor, expressas em grãos de milho, e a tolerância de genótipos aos fungos que causam grãos ardidos. Diante disto, objetivou-se neste trabalho avaliar o padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em grãos de linhagens de milho tolerantes e suscetíveis aos grãos ardidos. A partir de 30 linhagens foram selecionadas cinco que apresentaram maior tolerância aos grãos ardidos e cinco linhagens que apresentaram um maior nível de severidade da doença. As espigas de todas as plantas foram inoculadas com uma suspensão de conídios 2×10^4 de *Fusarium verticillioides*. Para a extração das proteínas resistentes ao calor utilizou-se solução tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 5mM MgCl₂; 1 mM PMSF. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% no gel separador e 6%, no concentrador. Foi observado um padrão de bandas mais expressivas nos genótipos que apresentaram tolerância aos grãos ardidos quando comparado com o padrão de bandas observado nos genótipos que apresentaram alta severidade da doença. Os padrões eletroforéticos de enzimas resistentes ao calor diferem em grãos de linhagens tolerantes e de linhagens suscetíveis aos grãos ardidos causados por *F. verticillioides*.

Palavras-chave: *Fusarium verticillioides*, LEA, marcadores de proteínas.

Introdução

Na literatura não há relatos sobre a relação de proteínas resistentes ao calor, expressas em grãos de milho e a tolerância de genótipos aos fungos que causam grãos ardidos. Estas proteínas são hidrofílicas, compostas por aminoácidos localizados no citoplasma, no núcleo e nos vacúolos das células. Elas expressam em situações de estresses abióticos (GOYAL et al., 2005). A função dessas proteínas ainda não está totalmente elucidada, mas sua abundância em organismos que toleram a desidratação sugere que elas têm um papel importante na tolerância à dessecação (BLACKMAN et al., 1995).

Dentre as proteínas resistentes ao calor, a LEA (*late embryogeneses accumulated*) é a mais estudada em milho. Foi verificado maior quantidade destas em sementes de milho tolerantes à alta temperatura de secagem (ROSA et al., 2005). Estes autores afirmam que este

¹ Trabalho realizado com o apoio financeiro da CNPq e Fapemig

sistema proteico tem relação com o mecanismo de proteção celular contra danos causados pela dessecação.

Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi avaliar o padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em grãos de linhagens de milho tolerantes e suscetíveis aos grãos ardidados.

Material e Métodos

A partir de 30 linhagens de milho, foram selecionadas visualmente, grãos de cinco linhagens que apresentaram maior tolerância aos grãos ardidados e grãos de cinco linhagens que apresentaram um maior nível de severidade da doença.

È importante ressaltar que as espigas de todas as plantas foram inoculadas com uma suspensão de conídios 2×10^4 de *Fusarium verticillioides*.

Para a extração das proteínas resistentes ao calor, foram macerados, em nitrogênio líquido, 100 grãos de cada linhagem selecionada que foram previamente submetidos à secagem natural.

Para a extração das proteínas foram adicionados solução tampão (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 5mM MgCl₂; 1 mM PMSF) na proporção de 1:10 (peso do material: volume tampão extração) e transferidos para microtubos de capacidade de 1500 mL. O homogeneizado foi centrifugado por 45 minutos a 4°C a 16000 xg e o sobrenadante retirado foi incubado em banho-maria a 85°C por 15 minutos, sendo novamente centrifugado como citado acima, por 30 minutos. O sobrenadante foi vertido em microtubos e o pellet descartado. Antes da aplicação no gel, os tubos de amostras contendo 70 ml de extrato + 40 mL de solução tampão da amostra (2,5 mL de glicerol; 0,46 g de SDS; 20 mg de azul de Bromofenol e completado o volume para 20 mL com o tampão de extração Tris pH 7,5) foram colocados em banho-maria com água em ebulição por 5 minutos. Foram aplicados 50 mL dessa solução em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% no gel separador e 6%, no concentrador. A corrida eletroforética foi realizada a 150 V e os géis corados em Coomassie Blue a 0,05%, conforme Alfenas *et al.* (1991), durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10%.

Os padrões eletroforéticos de cada genótipo foram avaliados, utilizando como referência o padrão de proteína da INVITROGEN, contendo 15 padrões de peso molecular entre 10 e 220 kDa.

Resultados e Discussão

Houve diferenças entre os padrões protéicos de bandas das linhagens que foram selecionadas como tolerantes e as selecionadas como suscetíveis.

Foi observado um padrão de bandas mais expressivas nos genótipos que apresentaram tolerância aos grãos ardidos quando comparado com o padrão de bandas observado nos genótipos que apresentaram alta severidade da doença (Figura 1). Isto indicou que a concentração das proteínas resistentes ao calor foi mais alta nos grãos que apresentaram menor severidade da doença causada pelo *F. verticillioides*. Este resultado sugere que estas proteínas podem estar envolvidas no mecanismo de defesa da planta ao fungo. Segundo Rosa et al. (2005), este sistema protéico pode estar envolvido com mecanismos de proteção celular contra os efeitos danosos da perda de água em sementes de milho.

As proteínas resistentes ao calor têm sido relacionadas com a preservação e o reparo das estruturas macromoleculares da membrana plasmática durante a desidratação de sementes e das plantas (VERTUCCI e FARRANT, 1995; ROSA et al., 2005; HORVÁTH et al., 2012).

A vantagem das proteínas resistentes ao calor é o fato delas apresentarem padrões eletroforéticos estáveis em sementes (JOSÉ et al., 2004). Portanto, o perfil destas proteínas apresenta potencial como marcador para característica de tolerância aos grãos ardidos, porém é necessário verificar se elas são expressas em outras partes da planta.

Conclusão

Os padrões eletroforéticos de enzimas resistentes ao calor diferem em grãos de linhagens tolerantes e de linhagens suscetíveis aos grãos ardidos causados por *F. verticillioides*.

Literatura Consultada

ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUNE, W. & PASSADOR, G.C. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos de essências florestais. Viçosa: UFV. 1991.

BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. *Physiologia Plantarum*, v.93, p.630-638, 1995.

GOYAL, K. WALTON, L.J.; TUNNACLIFFE, A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress *Biochem. J.* 388, 151–157, 2005.

HORVÁTH, I., GLATZ, A., NAKAMOTO, H., MISHKIND, M. L., MUNNIK, T. SAIDI, Y., GOLOUBINOFF, P., HARWOOD, J. L., VIGH, L. Heat shock response in photosynthetic organisms: Membrane and lipid connections Progress in Lipid Research 51 208–220, 2012.

JOSÉ, S. C. B. R.; VON PINHO E. V. R.; SALGADO, K. C. C.; VON PINHO, R. G. Identificação de cultivares de milho por meio de proteínas resistentes ao calor Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.3, n.1, p.1-9, 2004

ROSA, S. D. V. F., VON PINHO, E. V. R., VIEIRA, E. S. N., VEIGA, R. D., VEIGA, A. D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas *lea* associadas à tolerância de sementes milho à alta temperatura de secagem. Rev. bras. sementes vol.27 no.2 Pelotas Dec. 2005

VERTUCCI, C. W., FARRANT J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Kigel J, Galilli G, eds. Seed development and germination. New York: Marcel Dekker, Inc., 237-271, 1995

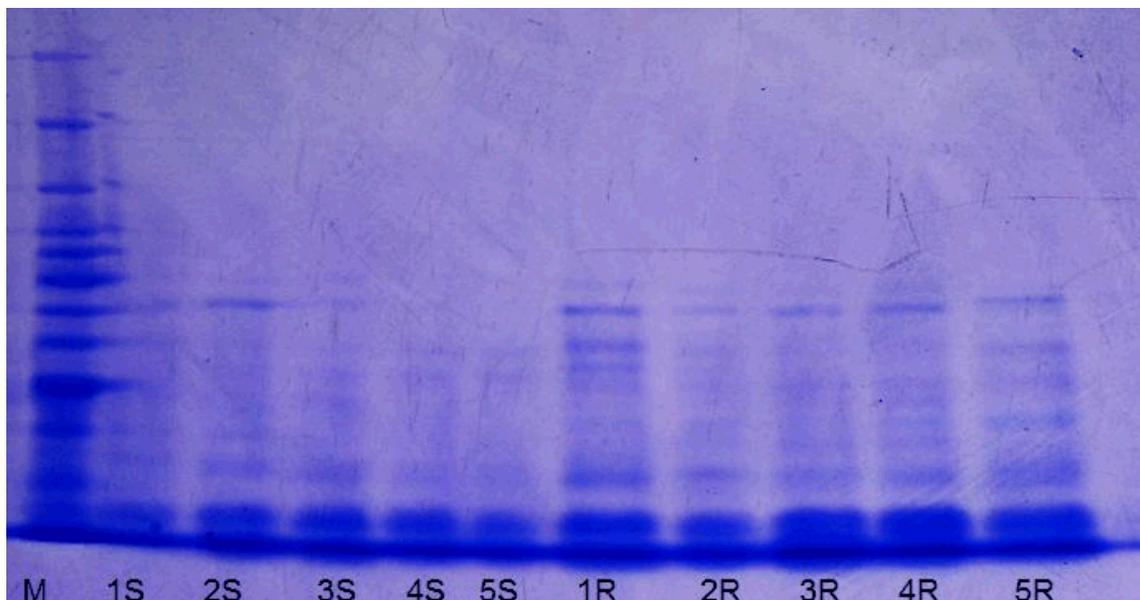


Figura 1. Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor expressas em grãos de linhagens suscetíveis (1S, 2S, 3S, 4S, 5S) e resistentes (1R, 2R, 3R, 4R, 5R) e o padrão molecular de 15 a 220kDa (M).