

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EM TECIDOS DE PLÂNTULAS DE *Hevea brasiliensis* A PARTIR DE EMBRIÕES ZIGÓTICOS *IN VITRO*

Josiane Celerino de Carvalho¹; Alzira Frota Marreiros Bezerra²; Rosineide da Paz Machado³; Ana Claudia Lopes da Silva⁴; Andrea Raposo⁵; José Francisco de Carvalho Gonçalves⁶

¹ Eng. Flo., e Doutoranda do Lab. Fisiologia e Bioquímica Vegetal INPA; ² Bio., e mestranda UEA; ³ Eng. Agr.; Lab. Fisiologia e Bioquímica Vegetal INPA; ⁴ Eng. Flo., Lab. Fisiologia e Bioquímica Vegetal INPA; ⁵ Pesq. Lab. de Biotecnologia Vegetal, Embrapa Gado de Corte; ⁶ Coord. Lab. Fisiologia e Bioquímica Vegetal INPA

Identificação do evento: VI Congresso Brasileiro de Heveicultura - 22 a 24 de outubro de 2019, Belo Horizonte /MG.

Resumo: Proteínas são responsáveis pela maioria dos processos funcionais e metabólicos, além de serem importantes componentes estruturais de parede celular e membranas. Estudos com proteínas são essenciais para entender como os organismos respondem com relação ao seu crescimento e desenvolvimento. Nesse trabalho avaliou-se o perfil proteico em tecidos da parte aérea e radicular de plântulas de *Hevea brasiliensis* provenientes de embriões zigóticos cultivados *in vitro* de modo a verificar se há diferenças na expressão de proteínas. As sementes foram provenientes de cinco matrizes de *H. brasiliensis* foram coletadas em Altamira-PA. O perfil proteico foi analisado nos tecidos da parte aérea e dos tecidos radiculares das plântulas e as sementes quiescentes. Para isto, foram coletadas 12 plântulas cultivadas *in vitro* e os perfis proteicos foram realizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Os tecidos da semente e das plântulas de *H. brasiliensis* (parte aérea e radicular) exibiram bandas proteicas nas faixas de 10 a 40 kDa. Essas bandas proteicas desde a semente até o crescimento inicial das plântulas podem estar associadas às principais proteínas da rota de síntese do látex. Estes resultados sugerem estudos mais avançados em proteômica, que podem auxiliar nas descobertas sobre os mecanismos de sementes e, podem contribuir para seleção de clones.

Palavra chaves: perfil proteico, sementes e síntese de látex.

Introdução

A maioria dos estudos relacionados à espécie *Hevea brasiliensis* concentra-se no melhoramento genético voltado para características de crescimento e de resistência a doenças (ex. mal das folhas), havendo poucos estudos que relacione sementes ou proteínas e desenvolvimento do vegetal (DAUD et al., 2012). O entendimento de mecanismos fisiológicos e metabólitos podem contribuir para a adoção de medidas que favoreçam a seleção de clones “elite” viabilizando a produção em larga escala.

Além das técnicas de propagação convencionais da espécie, como a enxertia, a micropropagação, ou propagação *in vitro*, consiste em gerar nova planta a partir de sementes, fragmentos de tecido vegetal ou embriões (ANDRADE, 2002). A cultura *in vitro* possui diversas vantagens, tais como: a produção em grande escala num curto espaço e tempo, independentemente das condições climáticas e da época do ano (CARVALHO e VIDAL, 2003). Em termos de uso de explantes específicos, o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos oriundos de sementes recalcitrantes, como é o caso da seringueira, pode aumentar a viabilidade da germinação e o desenvolvimento embrionário, bem como possibilita o seu uso em trabalhos de criopreservação e a criação de bancos de germoplasmas (NAKKANONG e NUALSRI, 2018). Portanto, neste trabalho, avaliou-se o perfil proteico em tecidos da parte aérea e radicular de plântulas de *Hevea brasiliensis* de modo a verificar se há diferenças na expressão de proteínas.

Material e métodos

As sementes dos indivíduos na floresta nativa (selvagens) provenientes de cinco matrizes de *Hevea brasiliensis* foram coletadas em área localizada no Ramal Tatajuba km 17, município de Altamira-PA. Após a coleta, os frutos foram acondicionados em sacos de polietileno e transportados para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV-INPA), local onde foi realizado o beneficiamento das sementes e os experimentos relacionados ao cultivo *in vitro*.

O perfil proteico foi analisado nos tecidos da parte aérea (PA) e parte radicular (PR) da plântula, com padrão de comparação a semente quiescente. Para tanto, foram coletadas 12 plântulas cultivadas a partir do cultivo *in vitro*. Estas foram lavadas, e posteriormente fez-se o seccionamento no eixo hipocótilo-radícula, com o auxílio de um bisturi, para dividir a parte aérea da radicular. Fez-se também as medições de comprimento da parte aérea, parte radicular, diâmetro do colo e número de folhas. Após a secção das partes vegetativas, as mesmas foram liofilizadas durante 72 h. A quantificação de proteínas dos extratos foi determinada pelo método proposto por Bradford (1976).

Os géis de poliacrilamida de separação foram preparados a partir de uma solução de acrilamida a 30% (v/v). As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo 1% de SDS, 10% de glicerol com 1% de β-mercaptoetanol. Após as corridas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue dissolvido em ácido acético 0,1%, etanol e água destilada 1:4:5 (v/v/v) durante 2 horas e descorados em solução de ácido acético glacial, etanol e

água destilada 1:4:5 (v/v/v). Neste trabalho utilizou-se os marcadores moleculares da Promega (10 – 100 kDa). O gel foi escaneado, a imagem foi editada no software ImageJ. Os dados foram analisados e apresentados como média e desvio padrão.

Resultados e Discussão

Os percentuais de germinação dos embriões *in vitro* foram de 50%, a baixa porcentagem de germinação no estabelecimento *in vitro* de espécies de *Hevea* pode estar associada ao rápido escurecimento e/ou necrose dos explantes. Provavelmente esses problemas são causados pela oxidação de polifenóis, abundantes em espécies de *Hevea* (MORADPOUR, AZIZ E ABDULLAH, 2016). Porém este percentual de 50 % não representa ganhos sobre o que já está estabelecido na literatura para a espécie. O fato é que dado o caráter recalcitrante das sementes, as taxas de germinação giram em torno de 50 a 80 % (VIEIRA et al., 1994; DE PAULA et al., 1997).

Com relação à concentração de proteínas, observou-se na semente quiescente como reserva inicial 0,413 mg/mL de proteínas solúveis, já de cultivo *in vitro* a parte aérea apresentou menor concentração de proteínas do que a radicular, supõe-se que como inicialmente não se teve a reserva primária, o endosperma, tendo apenas o meio de cultivo MS, a mesma investiu mais em parte radicular do que em parte aérea devido ao ambiente controlado (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de proteínas solúveis em diferentes tecidos das plântulas de *Hevea brasiliensis in vitro*.

Tipo de amostra	Concentração de proteínas solúveis (mg/mL)
Semente quiescente	0,413 ± 0,03
Parte aérea	0,233 ± 0,03
Parte radicular	0,252 ± 0,04

Médias ± Desvio Padrão

Na fase de semente quiescente observou-se proteínas de massa molecular aparente de 14, 20, 30 e 40 kDa similar as bandas encontradas na parte aérea e radicular das plântulas *in vitro* (Figura 1). A partir da observação dos perfis proteicos em ambos tecidos, constatou-se a presença de proteínas na faixa de 14 e 20 kDa que podem estar associadas as principais proteínas da síntese do látex. As proteínas de fator de alongação de borracha (rubber elongation factor – REF) que possui massa molecular de 14,7 kDa e as proteínas de partículas pequenas de borracha (small rubber particle protein - SRPP) de 22,3 kDa (BERTHELOT, 2014).

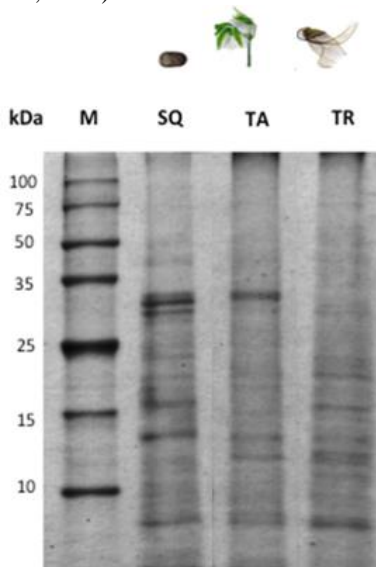


Figura 1. Perfil eletroforético dos extratos proteicos provenientes de plântulas de *Hevea brasiliensis in vitro*. M- marcador de massa molecular (kDa). SQ- semente quiescente. TA- parte aérea. TR- parte radicular.

Nossa expectativa é melhorar as condições do meio de cultivo visando minimizar os efeitos oxidativos, aumentando a germinabilidade dos embriões e a ampliar os achados sobre a funcionalidade das proteínas que são expressas durante as fases iniciais e, finais do processo germinativo, além do crescimento inicial das plântulas. Isto considerado poderemos sugerir o uso de algumas proteínas como marcadores moleculares para seleção de clones mais relacionados a síntese de látex, guardando-se as relações de massas entre as proteínas expressas e aquelas do metabolismo do látex.

Conclusão

Os tecidos das sementes e das plântulas de *H. brasiliensis* (parte aérea e radicular) exibiram bandas proteicas que podem estar associadas às principais proteínas da rota de síntese do látex. Estes resultados sugerem estudos mais avançados em proteômica, de maneira a analisar como essas diferenças afetam o desenvolvimento da plântula e sua produtividade de látex.

Referências Bibliográficas

ANDRADE, R.A.; MARTINS, A.B.G. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 25(1): 134-136, 2003.

BERTHELOT, K.; LECOMTE, S.; ESTEVEZ, Y.; PERUCH, F.E. 2014. *Hevea brasiliensis* REF (Hev b 1) and SRPP (Hev b 3): An overview on rubber particle proteins. **Biochimie**, 106: 1 e 9.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, 248–254p, 1976.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais**. 1 ed. Campina Grande, PB: EMBRAPA ALGODÃO, 2003. p. 39. (Embrapa Algodão. Documentos, n. 116).

DAUD, N. W.; MOKHATAR, S. J.; ISHAK, C. F. Assessment of selected *Hevea brasiliensis* (RRIM 2000 Series) seeds for rootstocks production. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 2, 3209-3216p, 2012.

DE PAULA, N. F.; BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; DE PAULA, R. C. Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 19, no 2, p.326-333 – 1997.

MORADPOUR, M.; AZIZ, M. A.; ABDULLAH, S.N.A. Establishment of *in vitro* Culture of Rubber (*Hevea brasiliensis*) from Field-derived Explants: Effective Role of Silver Nanoparticles in Reducing Contamination and Browning. **Journal of Nanomedicine e Nanotechnology**, 7(3), 2016.

NAKKANONG, K.; NUALSRI, C. Cryopreservation of *Hevea brasiliensis* zygotic embryos by vitrification and encapsulation-dehydration. **Journal of Plant Biotechnology**, 45, P. 333-339, 2018.

VIEIRA, R.D.; BERGAMASCHI, M.C.M.; MINOHARA, L. 1995. Qualidade fisiológica de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), tratadas com benlate durante o armazenamento. **Sci. Agri., Piracicaba**, 52(1):151-157.