

PLANTAS DE PIMENTÃO SUBMETIDAS À INJÚRIA MECÂNICA MODIFICAM A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS EM PLANTAS VIZINHAS NÃO INJURIADAS¹

Patrícia Dias Games², Patrícia Pereira Fontes², Lanna Clícia Carrijo², Marcos Jorge Magalhães Júnior², Paulo Roberto Gomes Pereira³, Maria Cristina Baracat-Pereira²

RESUMO – A proteômica avalia eventos biológicos por análise das proteínas expressas em células ou tecidos em situações fisiológicas diferentes. Na proteômica de plantas, visando manter padrões de cultivo, plantas tratadas e não tratadas são muitas vezes cultivadas no mesmo ambiente, sem considerar alterações por plantas tratadas sobre a expressão de proteínas de plantas não tratadas. O objetivo desse trabalho foi, por proteômica, avaliar a expressão diferencial de proteínas em folhas de plantas de pimentão (*Capsicum annuum* L. 'Magali R') não-feridas (não-tratadas) e feridas (tratadas) por injúria mecânica, quando cultivadas ou não próximas fisicamente. Aos 40 dias após o plantio, parte das plantas foi submetida à injúria por ferimentos nas folhas totalmente expandidas (feridas, F), e parte foi reservada como plantas não-feridas, ou cultivadas perto das plantas F (NFP, a 0,15 m) ou cultivadas longe das plantas F (NFL, a 10 m). As folhas das plantas NFP e NFL foram coletadas às 12, 48 e 168 h após ferimentos das plantas F, e os extratos NFL e NFP foram analisados por eletroforese bidimensional (2-DE). Os perfis proteicos foram comparados por Image Master, e as proteínas identificadas usando espectrometria de massas. Houve menor concentração de proteína em extratos de NFP 12 h; em 48 h e 168 h, a proteína foi semelhante entre NFL e NFP. Por 2-DE, não houve diferenças significativas entre NFP e NFL 12 h, porém para NFP 48 h foi observada maior expressão de proteínas envolvidas na defesa de plantas. Para NFP 168 h, houve aumento da expressão de proteínas envolvidas no metabolismo normal. Esses resultados indicam ter havido respostas de defesa das plantas NFP, decorrentes da proximidade do cultivo dessas plantas com as plantas F, possivelmente por ação de voláteis. Coloca-se assim a importância da escolha das condições de cultivo dos tratamentos-controle, não apenas para análises proteômicas.

Palavras-chave: compostos voláteis, defesa de plantas, pimentão, proteômica.

MECHANICALLY INJURED BELL PEPPER PLANTS CAUSE CHANGES IN PROTEIN EXPRESSION OF NONINJURED NEIGHBORING PLANTS

ABSTRACT – *Proteomics evaluates biological events by analysis of the expression of proteins in cells or tissues under different physiological situations. For plant proteomics, in order to maintain similar cultivation conditions, treated and non-treated plants are generally cultivated under the same environment without considering changes by the treated plants in protein expression of non-treated neighboring plants. The aim of this work was, by proteomics, assess the differential expression of proteins in non-wounded (non-treated) and wounded (treated) leaves of bell pepper (*Capsicum annuum* L. 'Magali R') by mechanical injury, when plants were grown physically nearby or not. At 40 days of cultivation, some plants were wounded by mechanical injury in all expanded leaves (wounds, F), some plants were maintained as non-injured plants, or being grown near to F plants (NFP, 0.15 m) or being grown away from F (NFL, 10 m). NFP and NFL plant leaves were harvested at 12, 48, and 168 h after injury of F plants, and the NFL and NFP extracts were analyzed by two-dimensional electrophoresis (2-DE). The protein profiles were compared using Image Master and the proteins were identified*

¹ Fontes financiadoras: CAPES, CNPq, FAPEMIG e FINEP. Recebido para publicação em 30/04/2013 e aprovado em 25/07/2013.

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs s/n, 36.570-000 Viçosa-MG, Brasil. Autor para correspondência: baracat@ufv.br.

³ Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa.



using mass spectrometry. NFP 12 h extract presented a lower protein concentration; for 48 h and 168 h, the protein was similar for NFL and NFP. For 2-DE, no significant difference was observed between NFP 12 h and NFL 12 h. However, NFP 48 h showed a higher expression of proteins involved in plant defense. For NFP 168 h, an increased expression of proteins involved in normal metabolism was detected. These results indicated that defense responses were developed by NFP plants considering the proximity of non-wounded plants from wounded plants during cultivation, with volatile compounds involvement. In this sense, it should be emphasized the importance of the choice of the growth conditions for the control-treatments, not only for proteomics.

Keywords: bell pepper, plant defense, proteomics, volatile compounds.

1. INTRODUÇÃO

A proteômica estuda eventos biológicos por meio de análises das proteínas expressas em células ou tecidos em situações fisiológicas. Essa abordagem experimental auxilia no estudo da informação contida nas sequências genômicas em termos de estruturas, funções e controles dos eventos biológicos, evidenciando alterações na expressão proteica frente a eventos em estudo (Aebersold & Goodlett, 2001). Diversas áreas do conhecimento, como a fitopatologia, a produção vegetal e a fisiologia vegetal têm investido na proteômica para desenvolver procedimentos para a agricultura sustentável. A exemplo, ferramentas proteômicas identificaram compostos naturais de defesa em extratos peptídicos de pimentão, que podem complementar o uso de agrotóxicos, reduzindo danos à saúde humana e ao ambiente (Games et al., 2013).

A proteômica diferencial vem sendo amplamente utilizada para estudos de defesa de plantas (Komatsu et al., 2012; Rodrigues et al., 2012; Wang et al., 2012; Valdes et al., 2013). Os produtos de defesa naturais em plantas podem ser obtidos do metabolismo primário, como proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-PR) e peptídeos antimicrobianos (AMPs), e, ou, do metabolismo secundário, como compostos fenólicos, e aldeídos e cetonas voláteis.

A proteína Harpina (Messenger®) é um agente de biocontrole que tem ação contra fitopatógenos, ativando a síntese de moléculas sinalizadoras e induzindo resistência sistêmica adquirida, e tem seu uso liberado nos EUA (Capdeville et al., 2003; Clarke et al., 2005). Os AMPs são importantes membros da defesa constitutiva e induzida de plantas, e são alvos da prospecção de compostos de defesa naturais (Games et al., 2013).

Como respostas de defesa a injúrias em plantas, por herbivoria, patógeno ou dano ambiental, há a liberação

de compostos voláteis, ao lado de alterações de expressão de proteínas relacionadas à defesa. Os compostos voláteis pertencem a grupos de terpenóides, ácidos graxos derivados de voláteis e derivados de compostos aromáticos. Eles atuam na defesa diretamente por intoxicar, repelir ou deter insetos herbívoros, ou indiretamente por atrair predadores naturais e parasitoides de herbívoros, protegendo a planta de danos futuros. Além de atuar na defesa, têm ação como sinais na comunicação planta-planta, quando plantas não submetidas a agressões são influenciadas por plantas vizinhas que estão sob estresse e que liberam voláteis, alterando o padrão de expressão proteica da planta não submetida ao estresse (Dudareva et al., 2004; Dudareva & Pichersky, 2008).

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma hortaliça pertencente à família das solanáceas e é uma importante cultura comercial em todo o mundo. No Brasil, é uma das dez hortaliças mais importantes economicamente (Viana et al., 2007). Dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2011), entretanto, apontam o pimentão como um dos alimentos que lideram o *ranking* na utilização de agrotóxicos. Há preocupação em diminuir o uso de agrotóxicos por estratégias que aumentem a produção e a qualidade dos frutos, por práticas de fertilidade do solo, aumento da resistência das plantas a estresses ambientais, aplicação de produtos naturais não nocivos ao ambiente e à saúde humana, visando à produção sustentável (Pascual et al., 2010; Airaki et al., 2012).

Em estudos envolvendo proteômica diferencial para avaliar respostas de defesa em plantas, a comparação dos tratamentos é realizada entre plantas não-tratadas ou não-modificadas, e plantas sob estresse abiótico ou biótico, que são plantas tratadas. Em geral, o cultivo experimental das plantas não-tratadas e tratadas é realizado sem a preocupação de distanciar plantas



do grupo não-tratado daquelas do grupo tratado. Não são assim consideradas possíveis influências de respostas de plantas tratadas sobre plantas não-tratadas cultivadas próximas. Assim, o objetivo desse trabalho foi, por ferramentas proteômicas, avaliar a expressão diferencial de proteínas em folhas de plantas de pimentão (*Capsicum annuum* L. 'Magali R') não-feridas e feridas quando cultivadas ou não próximas fisicamente.

2. MATERIALE MÉTODOS

Plantas de pimentão (*Capsicum annuum* L. 'Magali R') originadas de sementes foram cultivadas durante o mês abril de 2011, em casa-de-vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, Brasil (20° 45' S, 42° 52' O, 690 m). As plantas foram cultivadas sob luz natural em casa-de-vegetação, umidade relativa acima de 85%, temperatura entre 20 e 38°C, a 1 m de altura e 11 h de luz do dia. Foram cultivadas duas plantas por vaso, com 10 vasos (10 repetições) para cada tratamento (nove tratamentos), totalizando 90 vasos. Aos 40 dias após o plantio, 1/3 das plantas (30 vasos) foram submetidas a seis ferimentos em todas as folhas totalmente expandidas, sendo nomeadas Plantas Feridas (F). Os ferimentos foram por esmagamento de áreas circulares de 0,5 cm de diâmetro. O restante das plantas não recebeu nenhum tipo de ferimento (60 vasos), sendo metade dessas plantas cultivadas perto (0,15 m) das plantas feridas e a outra metade foi cultivada longe (10 m) das plantas feridas, na mesma casa-de-vegetação, com o cuidado de estarem afastadas de outros cultivos vegetais que pudessem interferir no crescimento das plantas, e mantendo condições de cultivo similares para todas as plantas. Os tratamentos foram nomeados Plantas Não Feridas Perto (NFP) e Plantas Não Feridas Longe (NFL), respectivamente. A coleta das folhas foi realizada às 12, 48 e 168 h após o ferimento (F), e as respectivas folhas de plantas não-feridas (NFP e NFL), foram coletadas simultaneamente em 12, 48 e 168 h.

As folhas de pimentão (5 g) de cada tratamento, em duas repetições biológicas, foram pulverizadas com nitrogênio líquido, maceradas com 20 mL de Tris 40 mM, pH 7,5, sacarose 250 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 1% (p/v), fluoreto de fenilmetil sulfonila (PMSF) 1 mM, benzamidina 1 mM e ditiotreitól (DTT) 1 mM, conforme Shen et al. (2002) com modificações. Cada homogenato obtido foi adicionado de PVPP 2% (p/v), agitado por 2 h a 4°C, e centrifugado a 10.000 x

g por 15 min a 4°C. O precipitado foi adicionado da mesma solução de extração, e o homogenato foi agitado por 1 h a 4°C e centrifugado sob as mesmas condições. Os dois sobrenadantes foram combinados e precipitados com ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) em acetona gelada, na presença de DTT 1 mM por 16 h a -20°C, seguindo-se centrifugação a 20.100 x g por 30 min a 4°C. O precipitado foi lavado com acetona gelada e DTT 1 mM por quatro vezes, e com etanol 80% e DTT 1 mM uma vez, realizando-se centrifugações a 20.100 x g por 30 min a 4°C. O precipitado foi seco em *speed-vac*, ressuspendido em tiourea 2 M, 3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamônio]-propanosulfonato) (CHAPS) 2% (p/v) e ureia 7 M, e a concentração proteica foi determinada pelo método do coomassie blue (Bradford, 1976).

A eletroforese monodimensional em gel de poli(acrilamida) desnaturante na presença de Tricina (SDS-Tricina-PAGE) foi de acordo com Judd (1994). As amostras foram fervidas por 10 min em tampão de amostra SDS 1,0% (p/v), glicerol 5,0% (v/v), Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, e azul de bromofenol 0,05% (p/v) e separadas em gel de três fases, gel de separação 14% T e 3,0% C, gel intermediário 9,9% T e 3,0% C e gel de concentração 5,12% T e 2,6% C. Foi utilizado o sistema de tampão Tris-Tricina utilizando solução de acrilamida/bis 49,5% T e 3,0% C, tampão do gel de separação contendo Tris-HCl 3,0 M, pH 8,45, SDS 0,3%, glicerol 10,7% (v/v), persulfato de amônio 0,033% (p/v) e TEMED 0,033% (v/v). O gel intermediário foi preparado com os mesmos componentes do gel de separação, excetuando-se o glicerol, que não foi adicionado, e o gel de concentração foi composto de tampão do gel contendo Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8, EDTA 0,2 M, persulfato de amônio 0,033% (p/v) e TEMED 0,033% (v/v). O tampão de corrida para o catodo foi Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M e SDS 0,1%, pH 8,25, e o tampão do anodo foi Tris 0,2 M, pH 8,9. A eletroforese foi realizada a 100 V (15 min), 80 V (20 min) e 60 V (240 min). O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 coloidal (Neuhoff et al., 1988) com solução fixadora (ácido acético 10% (v/v) e metanol 50% (v/v)), por 30 min, e solução de coloração (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,08% (p/v), metanol 30% (v/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v) e sulfato de amônio 8% (p/v)) por 72 h, lavados com água Milli-Q e digitalizados.

Na eletroforese bidimensional (2-DE), a focalização isoeletrica (IEF) das proteínas foi realizada

utilizando fitas de 7 cm contendo gradiente imobilizado de pH (IPG) entre 3 e 10, em equipamento Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, USA). Uma alíquota da amostra contendo 150 µg de proteína foi acrescida de tampão de reidratação constituído de DTT 40 mM, tampão de gradiente imobilizado de pH 3 a 10 e o reagente comercial DeStreak (GE Healthcare, USA) para um volume total de 125 µL. O modo linear de voltagem em IEF foi aplicado e as fitas foram focalizadas em um total de 21.500 Vh, com valor máximo de 50 mA por fita. A segunda dimensão da eletroforese foi realizada em SDS-PAGE 12,5%, em sistema vertical Mini-PROTEAN Tetra-Cell (Bio-Rad, USA), como descrito por Laemmli (1970).

As fitas IPG foram equilibradas primeiramente, por 15 min, com tampão DTT (ureia 6 M, glicerol 25,5% (v/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% (p/v), DTT 1% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v) e Tris-HCl 75 mM, pH 8,8), e depois com tampão similar ao tampão DTT, porém contendo iodoacetamida 2,5% (p/v) substituindo o DTT por 15 min. As fitas foram colocadas no topo do gel-SDS com fixação com solução de agarose (agarose 0,5% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v), Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 1% (p/v)). A eletroforese foi realizada a 80 V, até o marcador azul de bromofenol atingir o final do gel. Foram realizados quatro géis por tratamento, correspondentes a duas repetições biológicas e duas replicatas experimentais.

Os géis bidimensionais foram corados com Coomassie Brilliant Blue G-250 coloidal (Neuhoff et al., 1988) e digitalizados com o auxílio do equipamento Image Scanner III (GE Healthcare, USA). As imagens dos géis foram analisadas utilizando o *software* Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, USA). Os valores de expressão foram considerados significativos segundo ANOVA a $P < 0,05$. As proteínas em que a expressão modificou pelo menos 1,2 vezes foram selecionadas para identificação.

Os *spots* correspondentes às proteínas diferencialmente expressas foram excisados, desidratados com acetonitrila 50% (v/v) e bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8,0, e secos em temperatura ambiente. Para a tripsinização, conforme Shevchenko et al. (2006) com modificações, as proteínas foram reduzidas com DTT 65 mM por 30 min a 56°C, alquiladas com iodoacetamida 200 mM, por 30 min, à temperatura ambiente e digeridas com tripsina 25 µg.µL⁻¹ (Tripsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, USA) por 16 h a 37°C. As amostras

foram dessalinizadas em microcolunas C18 (Zip-Tip, Millipore, USA), levadas à placa de aço MTP *Anchor Chip* TM 600/384 TF (Bruker Daltonics, USA) com a matriz ácido á-ciano-4-hidroxicinâmico (5 µg.mL⁻¹ em 50% de acetonitrila e TFA 0,1%), e analisadas em espectrômetro de massas (MS) MALDI-TOF/TOF (Ultraflex III - Bruker Daltonics).

Os espectros foram processados no *software* FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, USA) e o algoritmo utilizado foi SNAP (Sort Neaten Assign and Place). Os picos de auto-digestão da tripsina e de contaminação por queratina foram eliminados. As massas obtidas foram submetidas à análise em MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>). Os parâmetros utilizados foram a busca em bancos de dados NCBI e Swiss-Prot, grupo taxonômico das plantas verdes (Viridiplantae), enzima tripsina, a carbamidometilação das cisteínas como modificações fixas, e a oxidação da metionina como modificação variável. Foram toleradas no máximo uma clivagem perdida para peptídeos semi-trípticos e uma variação de massa dos peptídeos de 0,1 Da e de 0,5 Da.

3. RESULTADOS

As plantas submetidas à injúria mecânica por ferimentos (F) apresentaram, por eletroforese bidimensional, expressão proteica diferencial quando comparadas às plantas não feridas cultivadas perto (NFP) ou longe (NFL) das feridas (dados não apresentados). Plantas NFL apresentaram também expressão proteica diferencial quando comparadas às plantas NFP, tanto em tipos quanto em quantidades de proteínas expressas. Para extratos das folhas de pimentão de plantas NFP, a concentração de proteínas foi menor no tempo 12 h quando comparada com plantas NFL. Em 48 e 168 h, as concentrações de proteína foram semelhantes entre plantas NFL e NFP (Figura 1).

Mudanças nos padrões de expressão das proteínas entre os tratamentos NFL e NFP foram observadas por eletroforese monodimensional (SDS-Tricina-PAGE), nos três tempos avaliados. Bandas de dadas proteínas apresentaram diferentes intensidades entre os diferentes tratamentos (Figura 2), porém, por se tratar de eletroforese monodimensional, as bandas proteicas não estavam isoladas.

As amostras foram submetidas à eletroforese bidimensional (2-DE) visando melhor separação das proteínas, pois é a ferramenta proteômica mais eficiente



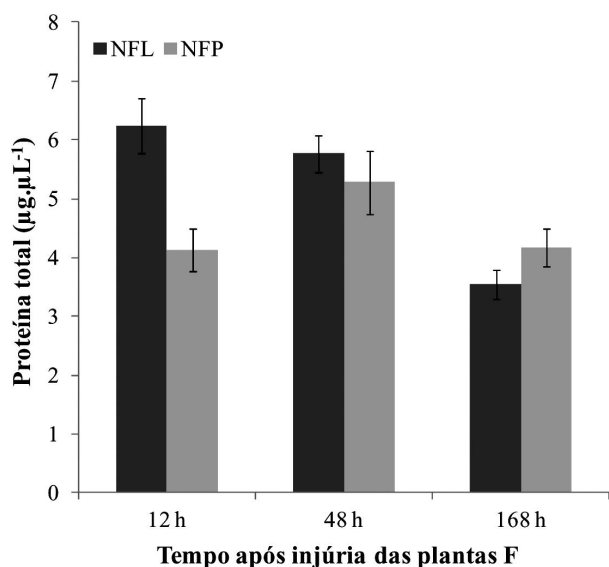


Figura 1 - Concentração de proteínas de extrato de folhas de plantas de pimentão não feridas cultivadas longe (NFL) e não feridas cultivadas perto (NFP) das plantas feridas.

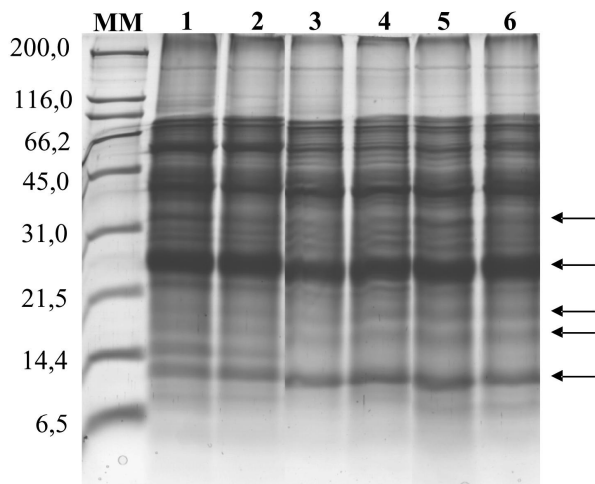


Figura 2 - SDS-Tricine-PAGE (14% T) dos extratos de folhas de pimentão não feridas cultivadas longe (NFL) e não feridas cultivadas perto (NFP) das plantas feridas, coletadas nos tempos 12, 48 e 168 h após injúria das plantas F. As amostras foram NFL coletadas 12 h (1), 48 h (3) e 168 h (5), e NFP coletadas 12 h (2), 48 h (4) e 168 h (6). As amostras foram 15 µg de proteína em cada canaleta. MM corresponde ao marcador de massa molecular (*Broad Range* - Bio-Rad, USA). As setas indicam algumas bandas proteicas com diferentes intensidades entre plantas NFL e NFP. As bandas proteicas foram reveladas por Coomassie Brilliant Blue G-250 coloidal.

para isolar proteínas de amostras complexas. Foram detectados 555 *spots* nas plantas NFL e 593 *spots* nas plantas NFP no tempo de 12 h, 436 *spots* nas plantas NFL e 287 *spots* nas plantas NFP no tempo de 48 h, e 395 *spots* nas plantas NFL e 348 *spots* nas plantas NFP no tempo de 168 h (Figura 3).

Foram realizadas análises de comparação de NFL12 x NFP12, NFL48 x NFP48 e NFL168 x NFP168. Na comparação de NFL12 x NFP12 por eletroforese bidimensional, utilizando os parâmetros estatísticos do Image Master, não foi encontrada nenhuma proteína diferencialmente expressa, indicando que não houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 12 h. Na comparação de NFL48 x NFP48, foram detectadas 10 *spots* de proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos, sendo seis proteínas

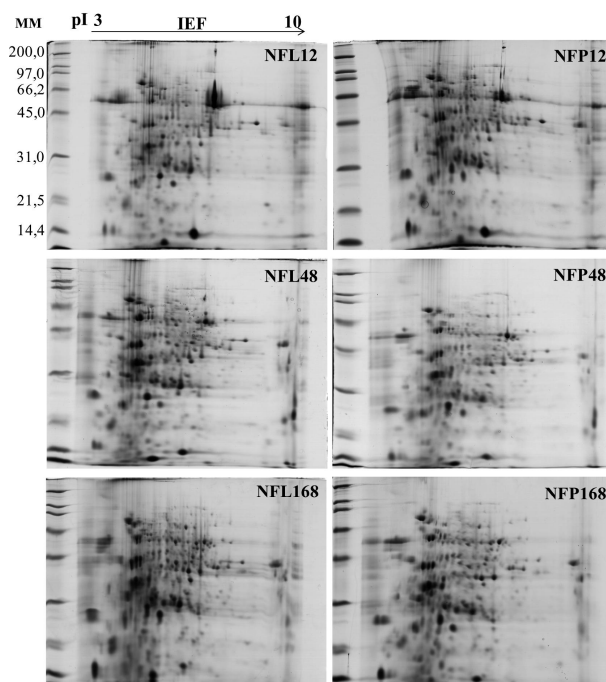


Figura 3 - Perfil de proteínas por 2-DE de folhas de pimentão não feridas perto 12 h (NFP12), não feridas longe 12 h (NFL12), não feridas perto 48 h (NFP48), não feridas longe 48 h (NFL48), não feridas perto 168 h (NFP168) e não feridas longe 168 h (NFL168), em IPG pH 3 a 10 e SDS-PAGE 12,5% em gel de 7,0 cm. MM corresponde ao marcador de massa molecular (*Broad Range* - Bio-Rad, USA). Os *spots* foram revelados por Coomassie Brilliant Blue G-250 coloidal e as proteínas diferencialmente expressas foram identificadas por MS-MALDI-TOF/TOF.

down-reguladas e três *up*-reguladas em NFL48 comparado com NFL48, e uma proteína foi somente detectada no tratamento NFL48. Sete proteínas foram identificadas por MS-MALDI-TOF/TOF a partir dos 10 *spots* encontrados, sendo cinco *down*-reguladas e duas *up*-reguladas (Tabela 1).

Na comparação de NFL168 x NFP168, foram detectadas seis proteínas diferencialmente expressas entre os tratamentos, sendo uma proteína *down*-regulada e cinco *up*-reguladas em NFP168. Quatro proteínas *up*-reguladas foram identificadas (Tabela 2).

As proteínas comuns e exclusivas detectadas nos tempos de 12, 48 e 168 h para os diferentes tratamentos estão apresentadas na forma do diagrama de Venn (Oliveros, 2007). A ATP sintase foi comum entre os tempos de 48 e 168 h, nove proteínas foram exclusivas do tempo 48 h e cinco exclusivas do tempo 168 h (Figura 4).

4. DISCUSSÃO

Em geral, quando plantas são submetidas a estresses, há diminuição na síntese de proteínas celulares

em geral e há aumento na síntese específica de proteínas envolvidas em mecanismos de defesa; as últimas estão em geral em menor concentração relativa nas células (Gulen & Eris, 2004). Vários estudos demonstram menor concentração de proteína quando plantas são afetadas por diferentes tipos de estresses, sejam bióticos ou abióticos. Como investigado por Li et al. (2012), raízes de pepino submetidas a estresse por hipoxia demonstraram que a concentração de proteína foi reduzida significativamente após o tratamento por baixo teor de oxigênio (estresse), equivalendo à redução de 60% das condições normais de oxigênio.

Na comparação dos tratamentos NFL x NFP, a expressão de proteínas do tratamento NFP no tempo de 12 h pode ter sido influenciada por respostas de defesa das plantas feridas vizinhas, que poderiam promover a diminuição da expressão de proteínas do metabolismo normal em favorecimento do aumento da expressão de proteínas de defesa, alterando assim a concentração de proteína nas plantas NFP. Nos tempos de 48 h e 168 h, pode-se sugerir a ocorrência do restabelecimento da síntese de proteínas às condições de metabolismo normal.

Tabela 1 - Proteínas diferencialmente expressas na análise NFL48 x NFP48 de folhas de pimentão

Spot ID	Nº de acesso	Nome da Proteína	Organismo	Mr/pI Teórico	Mr/pI Experimental	Score	Cobertura sequência %	Diferença expressão ^a	M/S ^b
1	gi 255538258	Serina protease do xilema	<i>Ricinus communis</i>	35.343/7,25	34.329/8,82	49	37	-1,53	15/128
2	gi 381353618	Proteína ribossomal L2	<i>Centrolepis monogyna</i>	27.753/6,93	29.979/11,45	66	27	-1,37	9/115
3	gi 115454317	Transportador de prolina	<i>Oryza sativa</i>	53.029/5,85	52.362/7,68	36	13	-1,26	7/119
4	gi 28261702	ATP sintase	<i>Atropa belladonna</i>	54.459/5,12	55.476/5,26	65	35	-1,25	15/151
5	gi 381353618	Proteína ribossomal L2	<i>Centrolepis monogyna</i>	38.750/7,29	29.979/11,45	79	31	-1,34	10/112
6	gi 3122394	Maturase K	<i>Saxifraga cernua</i>	37.956/7,59	41.856/9,26	42	30	+1,30	9/115
7	gi 75122569	Fosfolipase A1	<i>Oryza sativa</i>	43.175/7,81	45.808/8,61	42	15	+1,76	5/25

^a A diferença de expressão foi calculada como a % do volume do *spot* entre plantas Não Ferida Perto (NFP) em relação às plantas Não Ferida Longe (NFL), quando os sinais negativo e positivo indicam, respectivamente, expressão menor (*down*-regulação) e maior (*up*-regulação) em NFP em relação a NFL; ^b M/S é o número de valores de massas encontradas/número de massas pesquisadas.

Tabela 2 - Proteínas diferencialmente expressas na análise NFL168 x NFP168 de folhas de pimentão

Spot ID	Nº de acesso	Nome da Proteína	Organismo	Mr/pI Teórico	Mr/pI Experimental	Score	Cobertura sequência %	Diferença expressão ^a	M/S ^b
8	gi 28261702	ATP sintase	<i>Atropa belladonna</i>	62.325/5,2	55.476/5,26	38	29	+2,57	13/101
9	gi 82792094	Glicerofosforil diester fosfodiesterase	<i>Oryza sativa</i>	34.834/4,86	36.865/4,82	55	28	+1,55	10/136
10	gi 28261702ATP	sintase	<i>Atropa belladonna</i>	62.325/5,3	55.476/5,26	53	24	+1,58	10/144
11	gi 114558	ATP sintase	<i>Nicotiana sp.</i>	59.629/4,97	53.608/5,04	139	63	+1,20	27/177

^a A diferença de expressão foi calculada como a % do volume do *spot* entre plantas Não Ferida Perto (NFP) em relação às plantas Não Ferida Longe (NFL), quando os sinais negativo e positivo indicam, respectivamente, expressão menor (*down*-regulação) e maior (*up*-regulação) em NFP em relação a NFL; ^b M/S é o número de valores de massas encontradas/número de massas pesquisadas.



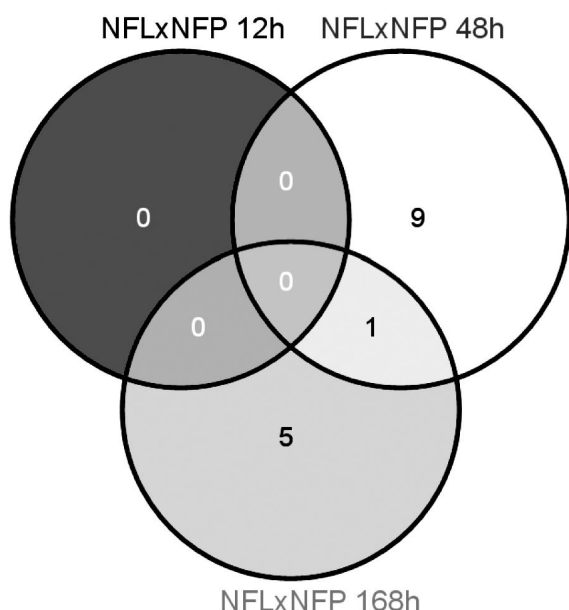


Figura 4 - Diagrama de Venn das proteínas identificadas após separação dos extratos de folhas de pimentão NFL e NFP por 2-DE, nos três tempos avaliados. A comparação foi entre os tempos de 12, 48 e 168 h após a injúria das plantas feridas. Nas interseções do diagrama estão as proteínas comuns aos tempos.

A ocorrência de diferenças de expressão proteica entre NFL e NFP sugere que compostos sinalizadores podem ter ativado respostas de defesa em plantas NFP que foram cultivadas nas proximidades das plantas F, o que não ocorreu com plantas NFL que foram cultivadas a cerca de 10 metros das plantas F. A literatura relata a liberação de compostos voláteis acompanhando alterações da expressão de proteínas relacionadas à defesa em plantas submetidas a estresses. Os compostos voláteis podem atuar em situações de defesa, protegendo a planta de danos futuros, e atuar como sinais na comunicação planta-planta (Maffei, 2010). Dolch & Tschamtko (2000), em um estudo envolvendo desfolhagem de amieiro (*Alnus glutinosa*), verificaram que plantas vizinhas não desfolhadas foram mais resistentes à herbivoria do que plantas cultivadas distantes das plantas desfolhadas. Os autores sugeriram o envolvimento de voláteis na indução de resistência à herbivoria, e observaram que o efeito da ação dos voláteis diminuiu com o aumento da distância entre plantas desfolhadas e não desfolhadas e com o tempo de início da liberação desses compostos voláteis.

Resultados da separação dos extratos NFL e NFP por eletroforese monodimensional também sugeriram diferenças entre os dois tratamentos, indicando haver interferência de plantas feridas vizinhas em plantas que não sofreram ferimento nas folhas. Visando melhor separação e identificação das proteínas, os extratos de plantas NFL e NFP, nos três tempos, foram avaliados por 2-DE e MS.

Na 2-DE, a análise de comparação NFL x NFP no tempo de 12 h não apresentou diferenças significativas no padrão de expressão de proteínas. Porém existem diferenças entre esses dois tratamentos no tempo de 12 h, considerando as concentrações diferentes de proteína nos extratos nesse tempo (Figura 1). Além disso, análises de comparação da expressão proteica por 2-DE às 12 h em plantas não feridas e feridas, a saber, NFP12 x F12 e NFL12 x F12 indicaram diferenças na expressão da enzima marcadora de indução de resistência fenilalanina amônia-liase (PAL) (MacDonald & D’Cunha, 2007) entre os tratamentos. Para NFP12 x F12, PAL apresentou-se *up*-regulada com expressão 1,48 vezes superior em plantas F, enquanto que para NFL12 x F12, PAL apresentou-se também *up*-regulada com expressão 2,27 vezes superior em plantas F, indicando diferenças entre NFL e NFP.

Na análise de comparação NFL x NFP no tempo de 48 h, a maior parte das proteínas encontradas apresentou-se *down*-regulada em NFP, com menor expressão em plantas vizinhas às plantas feridas (Tabela 1). Os resultados indicam que a modulação das respostas de defesa das plantas por possíveis voláteis liberados por plantas feridas favoreceram o aumento da expressão de proteínas de defesa em NFP, como a fosfolipase e a maturase K (Tabela 1). As fosfolipases são enzimas envolvidas na hidrólise dos glicerofosfolipídeos da membrana que liberam substratos para a ação das lipoxigenases, importantes enzimas de defesa de plantas (Joo & Oh, 2012). A maturase K está envolvida na modificação de DNAs e RNAs, e funciona como chaperona em plantas, também envolvida na defesa (Jiang et al., 2008). Assim, NFP48 apresentou menor síntese de proteínas e respostas de defesa não encontradas em NFL48, corroborando a sugestão da ação de voláteis produzidos por plantas feridas sobre plantas NFP.

Na análise de comparação NFL x NFP no tempo de 168 h, ATP sintase e glicerofosforil diester fosfodiesterase, proteínas envolvidas no metabolismo

celular, apresentaram-se *up*-reguladas em NFP. A ATP sintase é uma importante enzima envolvida no metabolismo energético das plantas, que sintetiza ATP celular utilizando ADP e fosfato inorgânico (Yoshida et al., 2001). A glicerofosforil diester fosfodiesterase é importante enzima no metabolismo de lipídeos e glicerol, e ainda participa na organização da parede celular (Hayashi et al., 2008), sugerindo uma redução da ação dos voláteis na expressão de proteínas de defesa em favorecimento à expressão de proteínas do metabolismo celular das plantas NFP.

Poucos estudos estão disponíveis na literatura sobre a expressão diferencial de proteínas em plantas não tratadas que foram influenciadas por voláteis liberados por plantas tratadas vizinhas. Um estudo envolvendo proteínas de defesa foi abordado em plantas de álamo, gênero *Populus*, feridas por ataque de herbívoros, e plantas próximas que não sofreram herbivoria. Foi verificado o aumento de duas importantes enzimas de defesa, a lipoxigenase e a fenilalanina amônia-liase não somente nas plantas feridas, mas também nas plantas que não sofreram ferimento, porém que sofreram interferência de voláteis liberados pelas vizinhas. Com esse resultado, observa-se a existência de uma comunicação planta-planta, envolvida não somente na síntese de voláteis e no impedimento de ataque de herbívoros, mas também na diferença de expressão de proteínas envolvidas com a defesa (Zeng-Hui et al., 2009). Considerando a pouca disponibilidade de estudos envolvendo a identificação de proteínas expressas em plantas sob a influência de voláteis, esse trabalho alerta para a importância das condições de cultivo de plantas não tratadas que possam ser influenciadas por voláteis produzidos por plantas vizinhas tratadas, não apenas em proteômica.

5. CONCLUSÕES

Plantas de pimentão não feridas e cultivadas próximas (NFP, a 0,15 m) a plantas feridas (F) por injúria mecânica apresentaram respostas de defesa não observadas em plantas não feridas e cultivadas a cerca de 10 m (NFL) das plantas F, concluindo-se ter havido a influência de voláteis na modificação da expressão proteica em plantas NFP quando comparada com NFL. Considerando que plantas NFL e NFP são controles do tratamento plantas F, coloca-se a importância da escolha das condições de cultivo do tratamento controle.

6. AGRADECIMENTOS

À CAPES, à FAPEMIG, ao CNPq e à FINEP, pelo apoio financeiro, ao Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBioMol-UFV), pela estrutura física, ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), pelo uso da casa-de-vegetação, e à EMATER-MG pela doação das sementes de pimentão.

7. LITERATURA CITADA

- AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chemical Reviews**, v.101, p.269-295, 2001.
- AIRAKI, M.; LETERRIER, M.; MATEOS, R.M. et al. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. **Plant Cell and Environment**, v.35, p.281-295, 2012.
- ANVISA (2011) Contaminação por agrotóxicos persiste em alimentos analisados pela ANVISA. In [Http://portal.anvisa.gov.br](http://portal.anvisa.gov.br) (acessado em 15 de janeiro de 2013).
- 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, p.248-254, 1976.
- CAPDEVILLE, G.; BEER, S.V.; WATKINS, C.B. et al. Pre- and post-harvest harpin treatments of apples induce resistance to blue mold. **Plant Disease**, v.87, p.39-44, 2003.
- CLARKE, A.; MUR, L.A.; DARBY, R.M. et al. Harpin modulates the accumulation of salicylic acid by Arabidopsis cells via apoplastic alkalization. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p.3129-3136, 2005.
- DOLCH, R.; TSCHARNTKE, T. Defoliation of alders (*Alnus glutinosa*) affects herbivory by leaf beetles on undamaged neighbours. **Oecologia**, v.125, p.504-511, 2000.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Metabolic engineering of plant volatiles. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, p.181-189, 2008.



- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v.135, p.1893-1902, 2004.
- GAMES, P.D.; KOSCKY-PAIER, C.R.; ALMEIDA-SOUZA, H.O. et al. In vitro anti-bacterial and anti-fungal activities of hydrophilic plant defence compounds obtained from the leaves of bell pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, in press, 2013.
- GULEN, H.; ERIS, A. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. **Plant Science**, v.166, p.739-744, 2004.
- HAYASHI, S.; ISHII, T.; MATSUNAGA, T. et al. The glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like proteins shv3 and its homologs play important roles in cell wall organization. **Plant and Cell Physiology**, v.49, p.1522-1535, 2008.
- JIANG, Q.Y.; CHEN, H.; PAN, X.L. et al. Proteomic analysis of wheat (*Triticum aestivum* L.) hybrid necrosis. **Plant Science**, v.175, p.394-401, 2008.
- JOO, Y.C.; OH, D.K. Lipoxygenases: potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds. **Biotechnology Advances**, v.30, p.1524-1532, 2012.
- JUDD, R.C. Electrophoresis of peptides. **Methods in Molecular Biology**, v.32, p.49-57, 1994.
- KOMATSU, S.; KUJI, R.; NANJO, Y. et al. Comprehensive analysis of endoplasmic reticulum-enriched fraction in root tips of soybean under flooding stress using proteomics techniques. **Journal of Proteomics**, v.77, p.531-560, 2012.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LI, J.; SUN, J.; YANG, Y.J. et al. Identification of hypoxic-responsive proteins in cucumber roots using a proteomic approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.51, p.74-80, 2012.
- MACDONALD, M.J.; D'CUNHA, G.B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. **Biochemistry and Cell Biology**, v.85, p.273-282, 2007.
- MAFFEI, M.E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, v.76, p.612-631, 2010.
- NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D. et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric-focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using coomassie brilliant blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v.9, p.255-262, 1988.
- OLIVEROS, J.C. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. **BioinfoGP, CNB-CSIC**, 2007.
- PASCUAL, I.; AZCONA, I.; AGUIRREOLEA, J. et al. Growth, Yield, and Fruit Quality of Pepper Plants Amended with Two Sanitized Sewage Sludges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.6951-6959, 2010.
- RODRIGUES, S.P.; VENTURA, J.A.; AGUILAR, C. et al. Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in the latex of sticky diseased *Carica papaya* L. plants. **Journal of Proteomics**, v.75, p.3191-3198, 2012.
- SHEN, S.; MATSUBAE, M.; TAKAO, T. et al. A proteomic analysis of leaf sheaths from rice. **The Journal of Biochemistry**, v.132, p.613-620, 2002.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v.1, p.2856-2860, 2006.
- VALDES, A.E.; IRAR, S.; MAJADA, J.P. et al. Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): a research on plant morphology, physiology and proteomics. **Journal of Proteomics**, v.79, p.263-276, 2013.

VIANA, F.M.P.; FREIRE, F.C.O.; PARENTE, G.B. Controle das Principais Doenças do Pimentão Cultivado nas Regiões Serranas do Estado do Ceará. **Embrapa Agroindústria Tropical Comunicado Técnico**, v.132, p.1-4, 2007.

WANG, Y.D.; WANG, X.; WONG, Y.S. Proteomics analysis reveals multiple regulatory mechanisms in response to selenium in rice. **Journal of Proteomics**, v.75, p.1849-1866, 2012.

YOSHIDA, M.; MUNAYUKI, E.; HISABORI, T. ATP synthase – a marvellous rotary engine of the cell. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, p.669-677, 2001.

ZENG-HUI, H.U.; WEN, Z.; YING-BAI, S. et al. Activities of lipoxygenase and phenylalanine ammonia lyase in poplar leaves induced by insect herbivory and volatiles. **Journal of Forestry Research**, v.20, p.372-376, 2009.

