

DEISY XAVIER AMORA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE PLANTAS ANTAGONISTAS EM
REPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Meloidogyne javanica***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A524a
2014 Amora, Deisy Xavier, 1982-
Análise proteômica de plantas antagonistas em reposta à
inoculação com *Meloidogyne javanica* / Deisy Xavier Amora. –
Viçosa, MG, 2014.
vi, 69f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Silamar Ferraz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Eletroforese. 2. Nematóide das galhas. 3. *Crotalaria spectabilis*. 4. *Zinnia elegans*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de Pós-graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.96

DEISY XAVIER AMORA

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE PLANTAS ANTAGONISTAS EM
REPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Meloidogyne javanica***

Tese apresentada a Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2014

Everaldo Antônio Lopes
(Coorientador)

Leandro Grassi de Freitas
(Coorientador)

Humberto Josué de Oliveira Ramos

Trazilbo José de Paula Júnior

Silamar Ferraz
(Orientador)

RESUMO

AMORA, Deisy Xavier, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Análise proteômica de plantas antagonistas em resposta à inoculação com *Meloidogyne javanica*.** Orientador: Silamar Ferraz. Coorientadores: Everaldo Antônio Lopes e Leandro Grassi de Freitas.

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são fitopatógenos responsáveis por reduções de até 12% na produção e podem ser manejados de forma eficiente com a rotação de culturas, no entanto, por serem polípagos essa técnica é dificultada pela falta de boas opções de plantas não hospedeiras. Assim, faz-se necessário avaliar culturas economicamente viáveis aos produtores para o cultivo em áreas infestadas, como, por exemplo, as plantas antagonistas de uso medicinal e, ou ornamental. Embora algumas substâncias nematicidas já tenham sido isoladas destas plantas, ainda são escassos os estudos direcionados à compreensão dos mecanismos envolvidos na supressão do desenvolvimento dos nematoides nas plantas antagonistas. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar o comportamento de plantas medicinais e ornamentais quando inoculadas com *M. javanica* e identificar proteínas diferencialmente expressas por essas plantas em resposta à inoculação do nematoide utilizando a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa. As plantas testadas foram: falso-boldo (*Plectranthus barbatus*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), zínia (*Zinnia elegans*) e losna (*Artemisia absinthium*). Tomateiro (*Solanum lycopersicum*) foi utilizado como controle suscetível e crotalária (*Crotalaria spectabilis*) como planta não hospedeira. Houve baixa reprodução de *M. javanica* nas raízes de todas as plantas antagonistas testadas. Não foram visualizados nematoides nas raízes de hortelã-pimenta e falso boldo e, em losna, poucas galhas e fêmeas adultas. Nas raízes de zínia e crotalária foram encontrados nematoides pouco desenvolvidos, alguns em formato salsichoide, mas raramente fêmeas totalmente desenvolvidas, mesmo após 30 dias da inoculação. Das plantas antagonistas testadas, as mais eficientes para o controle de *M. javanica*

foram hortelã-pimenta, zínia e crotalária. Para identificação das proteínas diferencialmente expressas foram avaliadas amostras de raízes de *C. spectabilis* e *Z. elegans* às 24 e 48 horas após a inoculação com o nematoide. As proteínas foram extraídas pelo método fenol-SDS e separadas por eletroforese bidimensional. Por meio da análise comparativa dos géis foram detectadas proteínas diferencialmente expressas e foram posteriormente identificadas por espectrometria de massa. Em *C. spectabilis* foram identificadas quatro proteínas diferenciais às 24 horas após a inoculação: V-type proton ATPase subunit B 1-like, ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e Heat Shock Protein. Estas proteínas estão relacionadas com o restabelecimento da homeostase sob condições de estresse biótico. Em *Z. elegans* foi identificada a proteína metionina adenosiltransferase, diferencialmente expressa às 48 horas após a inoculação, que pode estar ligada a resposta de defesa da planta através da síntese de etileno, peróxido de hidrogênio e alcaloides pirrolizidínicos. Esses resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos de defesa das plantas antagonistas à *M. javanica*.

ABSTRACT

AMORA, Deisy Xavier, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Proteomic analysis of antagonistic plants in response of *Meloidogyne javanica* inoculation.** Adviser: Silamar Ferraz. Co-advisers: Everaldo Antônio Lopes and Leandro Grassi de Freitas.

Meloidogyne spp. are plant pathogens responsible for up to 12% of reductions in the production and can be managed efficiently by the use of crop rotation, but for being polyphagous this technique is hampered by the lack of good choices of non-host plants. Thus, it is necessary to evaluate economically viable crops for producers to treat infested areas, such as the nematode antagonistic plants of medicinal and or ornamental uses. Although some nematicides substances have been isolated from these plants, there are still few studies for the understanding of the mechanisms involved in the suppression of the nematode development in to the antagonistic plants. Thus, the objective of this study was to evaluate the behavior of medicinal and ornamental plants when inoculated with *M. javanica* and identify differentially expressed proteins in these plants in response to nematode inoculation using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. The plants tested were: *Plectranthus barbatus*, *Mentha piperita*, *Zinnia elegans*, and *Artemisia absinthium*. *Solanum lycopersicum* was used as susceptible control and *Crotalaria spectabilis* as a non-host plant. There was a low reproduction of *M. javanica* on the roots of all antagonist plants tested. No nematodes were observed within *M. piperita* and *P. barbatus* roots and just few adult females could be seen within *A. absinthium* roots. In the roots of *Z. elegans* and *C. spectabilis* some underdeveloped nematode, at the salsichoide format, were found, but, rarely females fully developed even after 30 days of inoculation. Among the antagonists plants tested, the most effective in controlling *M. javanica* are *M. piperita*, *Z. elegans* and *C. spectabilis*. For the identification of differentially expressed proteins, root samples of *C. spectabilis* and *Z. elegans* collected at 24 and 48 hours after inoculation

with the nematodes were evaluated. Proteins were extracted with phenol - SDS method and separated by two-dimensional electrophoresis. Through the comparative analysis of differentially expressed proteins gels were detected, and were subsequently identified by mass spectrometry. On *C. spectabilis* four differential proteins were identified at 24 hours after inoculation and on *Z. elegans* one differential protein was identified at 48 hours after inoculation. These results contribute to the understanding of the defense mechanisms of plants antagonistic to *M. javanica*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
LITERATURA CITADA	6
CAPÍTULO I - Reação de plantas medicinais e ornamentais à inoculação com <i>Meloidogyne javanica</i>	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
DISCUSSÃO	19
LITERATURA CITADA	21
CAPÍTULO II - Análise proteômica de raízes de <i>Crotalaria spectabilis</i> em resposta à inoculação com <i>Meloidogyne javanica</i>	24
RESUMO	25
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	42
LITERATURA CITADA	44
CAPÍTULO III – Aumento na expressão de S-adenosil-L-metionina em <i>Zinnia elegans</i> inoculada com <i>Meloidogyne javanica</i>	48
RESUMO	48
ABSTRACT	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
LITERATURA CITADA	65
CONCLUSÕES GERAIS.....	69

INTRODUÇÃO GERAL

Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) são patógenos amplamente difundidos nas áreas de plantio ao redor do mundo e são responsáveis por grandes reduções na produção. Esses patógenos podem ser controlados por práticas culturais, nematicidas químicos e pela utilização de variedades resistentes. No entanto, os nematicidas além de não fornecerem supressão em longo prazo, são caros, nocivos ao meio ambiente e à saúde humana (FERRAZ et al., 2010).

A adoção de práticas ambientalmente sustentáveis para o manejo de nematoides tem chamado a atenção de produtores e de consumidores. Dentre as mais eficientes para o controle de nematoides estão a rotação de culturas, o uso de variedades resistentes ou de plantas antagonistas. Algumas plantas antagonistas são capazes de fixar nitrogênio da atmosfera e fornecerem expressivos volumes de matéria orgânica, melhorando as características químicas, físicas e biológicas do solo (FERRAZ & FREITAS, 2004).

Plantas antagonistas são aquelas que, de alguma forma, afetam negativamente a população dos nematoides no solo, podendo atuar como más hospedeiras, plantas armadilhas ou como produtoras de compostos nematicidas (FERRAZ & VALE, 1997). Nas plantas más hospedeiras, há penetração dos nematoides, mas poucos se desenvolvem. Por sua vez, os nematoides penetram nas plantas armadilhas, mas não completam o seu desenvolvimento. Por fim, as plantas produtoras de compostos nematicidas contêm substâncias tóxicas aos nematoides que são liberadas durante sua decomposição ou atuam no interior das plantas (FERRAZ et al., 2010).

Os nematoides das galhas são polívoros, o que torna difícil encontrar boas opções de culturas agronômicas não hospedeiras para o seu manejo através da rotação de culturas. Algumas plantas recomendadas

para adubação verde, principalmente espécies do gênero *Crotalaria*, são eficientes no controle de fitonematoides (WANG et al., 2002), além da considerável produção de massa verde e fixação biológica de nitrogênio atmosférico. É comum ao gênero a produção de monocrotalina, alcaloide pirrolizidínico que afeta o movimento de juvenis de fitonematoides, reduzindo a taxa de infecção (WANG et al., 2002). Os alcaloides pirrolizidínicos também são tóxicos a vertebrados e são não palatáveis a insetos herbívoros (THODEN & BOPPRÉ, 2010). O alto teor de nitrogênio da matéria orgânica de *C. spectabilis* causa a proliferação de microrganismos ligados à ciclagem do nitrogênio e a liberação de compostos nitrogenados tóxicos aos nematoides, a exemplo do amônio (RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1986; WANG et al., 2004).

No entanto, muitos produtores ignoram o uso de adubos verdes, como, por exemplo, *Crotalaria* spp., uma vez que elas não oferecerem retorno econômico imediato. Assim, faz-se necessário avaliar culturas que sejam economicamente viáveis aos produtores para o tratamento de áreas infestadas. Plantas medicinais e ornamentais se encaixariam como boas opções para garantir retorno econômico ao produtor, como por exemplo, plantas dos gêneros *Mentha*, *Artemisia*, *Plectranthus* e *Zinnia*, nas quais o potencial nematicida já foi relatado (GUARRERA, 1999; OKA et al., 2000; PANDEY & KALRA, 2010).

Mentha piperita (família Lamiaceae), conhecida como hortelã-pimenta, é uma planta obtida do cruzamento entre *M. aquatica* e *M. spicata*. O plantio de hortelã pode diminuir a densidade populacional do nematoide das galhas, como, por exemplo, *Meloidogyne arenaria* (WALKER & MELIN, 1996). Além disso, espécies de *Mentha* spp. possuem compostos na parte aérea com atividade nematicida sobre o nematoide das galhas (PANDEY & KALRA, 2010; CABONI et al., 2013), especialmente ácido clorogênico, ácido salvianólico, ácido salicílico e ácido rosmarínico (CABONI et al., 2013).

Plantas do gênero *Artemisia* (família Asteraceae) são conhecidas como absinto, losna ou sintro e são ricas em óleos essenciais. Produzem flores amarelas e são usadas na medicina, no controle de helmintoses e de dores estomacais, e na fabricação da bebida alcoólica absinto (ABERHAM et al., 2010). Além disso, algumas pesquisas comprovaram a ação nematicida de plantas do gênero *Artemisia*. Extratos aquosos de raízes frescas de losna (*A. absinthium*) inibiram a eclosão de juvenis de *M. incognita* e a incorporação ao solo das raízes secas da planta diminuiu a infecção pelo patógeno em raízes de berinjela (*Solanum melongena*) (SHARMA & TRIVEDI, 1992). Em outro trabalho, os extratos de partes aéreas secas de losna causaram a morte de mais de 90% de juvenis de *M. incognita* após exposição de 24 horas (DIAS et al., 2000).

O gênero *Plectranthus* (Lamiaceae) engloba espécies usadas na medicina popular (dor de estômago e purgante), alimentação de gado (ovinos, caprinos e bovinos) e na ornamentação, sendo o falso-boldo (*P. barbatus*) a espécie mais utilizada (LUKHOBBA et al., 2006). Ainda que a incorporação da parte aérea seca de falso-boldo não tenha controlado *M. javanica* em estudo conduzido por Lopes et al. (2008), é possível que *P. barbatus* possua ação nematicida, uma vez que contém diterpenos, compostos antimicrobianos e que conferem resistência ao ataque de insetos (ABDEL-MOGIB et al., 2002; LUKHOBBA et al., 2006).

Plantas ornamentais do gênero *Zinnia* (família Asteraceae), conhecidas como zínia ou canela-de-velho, podem ser uma das opções para o manejo de fitonematoides, como, por exemplo, *M. incognita* e *Rotylenchulus reniformis* (YASSIN & ISMAIL, 1994). Apesar de plantas da família Asteraceae também serem ricas em alcaloides pirrolizidínicos, poucos trabalhos foram realizados sobre a ação das espécies de zínia no controle do nematoide das galhas e os eventuais compostos responsáveis pela ação nematicida (THODEN & BOPPRÉ, 2010).

De forma geral, ainda são escassos os estudos direcionados à compreensão dos mecanismos que envolvem a supressão do desenvolvimento dos nematoides nas plantas antagonistas ainda que algumas substâncias nematicidas já tenham sido isoladas, como α -terthienyl de *Tagetes*, isotiocianatos de brássicas, glicosídeos cianogênicos de *Sorghum* (CHITWOOD, 2002; LOPES et al., 2008; FERRAZ et al., 2010; OKA, 2010).

Nas últimas décadas, a análise da interação entre plantas e patógenos ganhou força com a utilização de ferramentas genômicas que permitem identificar grande quantidade de genes expressos durante o processo de infecção (MEHTA et al., 2008). Essa disponibilidade de dados genômicos aumentou o interesse científico pelo conhecimento das funções e modo de atuação dos genes. Além disso foram desenvolvidas técnicas para análise dos transcritos de RNAm (transcriptômica) e análise do conjunto de proteínas expressas (proteômica) (CÁNOVAS et al., 2004).

O termo proteômica foi inicialmente definido como a caracterização em larga escala das proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo num determinado momento (WILKINS et al., 1996). Atualmente, a proteômica é capaz de quantificar, localizar, determinar modificações pós-traducionais e atribuir funções às proteínas identificadas (CÁNOVAS et al., 2004).

Os estudos proteômicos desenvolvidos com nematoides parasitas de plantas ainda estão dando os primeiros passos. Algumas proteínas produzidas por estes patógenos, que estão envolvidas no processo de infecção, já foram identificadas, como alguns indutores de células de alimentação e enzimas degradadoras de parede celular (MEHTA et al., 2008). Por outro lado, a análise proteômica também pode ser utilizada para a identificação de proteínas envolvidas nos mecanismos de defesa de

plantas, sendo importante ferramenta na elucidação da forma de defesa das plantas antagonistas.

Um dos primeiros estudos para avaliar mudanças na expressão de proteínas em resposta ao parasitismo de nematoides foi realizado com *Globodera rostochienses* e cultivares suscetíveis e resistentes de batata, contendo o gene de resistência *H1* (HAMMOND-KOSACK et al., 1990). Neste estudo, a presença do patógeno nas raízes não alterou a expressão de proteínas nas raízes, mas aumentou a expressão em folhas jovens. Por sua vez, Callahan et al. (1997) notaram que o desenvolvimento de *M. incognita* em *Gossypium hirsutum* foi paralisado logo após a penetração nas raízes de algodoeiro resistente. Os autores observaram que uma proteína específica foi produzida nas raízes do algodoeiro resistente quando o desenvolvimento do nematoide foi interrompido, podendo tal proteína estar envolvida na resposta de resistência da planta.

Recentemente, a eletroforese bidimensional foi associada à espectrometria de massa para comparar o proteoma de raízes de soja resistentes e suscetíveis quando inoculadas com *H. glycines* (LIU et al., 2011). Com esse estudo, os autores identificaram proteínas diferenciais envolvidas com o sistema de defesa, metabolismo e produção de energia da planta.

As informações oriundas das diferentes análises comparativas das interações planta-nematoide ainda são fragmentadas. Embora em fase inicial, a aplicação da nova geração de tecnologias de sequenciamento e análise proteômica prometem fornecer informações mais funcionais das sofisticadas interações entre nematoides e suas plantas hospedeiras (ESCOBAR et al., 2011).

Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar o comportamento de plantas medicinais e ornamentais, relatadas como antagonistas a nematoides, quando inoculadas com *M. javanica*; identificar as proteínas

diferencialmente expressas por essas plantas em resposta à inoculação do nematoide utilizando a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa.

LITERATURA CITADA

- Abdel-Mogib, M., Albar, H. A. & Batterjee, S. M. (2002). Chemistry of the genus *Plectranthus*. *Molecules*, 7(2), 271–301. doi:10.3390/70200271
- Aberham, A., Cicek, S. S., Schneider, P. & Stuppner, H. (2010). Analysis of sesquiterpene lactones, lignans, and flavonoids in wormwood (*Artemisia absinthium* L.) using high-performance liquid chromatography (HPLC)-mass spectrometry, reversed phase HPLC, and HPLC-solid phase extraction-nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10817–10823. doi:10.1021/jf1022059
- Barker, K. R., Hussey, R. S., Krusberg, L. R., Bird, G. W., Dunn, R. A., Ferris, H., Ferris, V. R., Freckman, D. W., Gabriel, C. J., Grewal, P. S., Macguidwin, A. E., Riddle, D. L., Roberts, P. A. & Schmitt, D. P. (1994). Plant and soil nematodes: societal impact and focus for the future. *Journal of Nematology*, 26(2), 127–37. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2619488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Caboni, P., Saba, M., Tocco, G., Casu, L., Murgia, A., Maxia, A., Menkissoglu-Spiroudi, U. & Ntalli, N. (2013). Nematicidal activity of mint aqueous extracts against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(41), 9784–8. doi:10.1021/jf403684h
- Callahan, F. E., Jenkins, J. N., Creech, R. G. & Lawrence, G. W. (1997). Changes in cotton root proteins correlated with resistance to root knot nematode development. *The Journal of Cotton Science*, 1, 38–47. Retrieved from <http://journal.cotton.org/journal/1997-01/1/upload/jcs01-038.pdf>
- Cánovas, F. M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H.-P. & Rossignol, M. (2004). Plant proteome analysis. *Proteomics*, 4(2), 285–98. doi:10.1002/pmic.200300602
- Chitwood, D. J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 221–249. doi:10.1146/annurev.phyto.40.032602.130045

- Dias, C. R., Schwan, A. V., Ezequiel, D. P., Sarmiento, M. C. & Ferraz, S. (2000). Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira*, 24(2), 203–210.
- Escobar, C., Brown, S. & Mitchum, M. G. (2011). Transcriptomic and proteomic analysis of the plant response to nematode infection. In J. Jones, G. Gheysen, & C. Fenoll (Eds.), *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions* (pp. 157–173). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-007-0434-3
- Ferraz, S. & Freitas, L. G. de. (2004). Use of antagonistic plants and natural products. In Z. Chen, S. Chen, & D. W. Dickson (Eds.), *Nematology-Advances and Perspectives Volume II: Nematode Management and Utilization* (p. 1234). CABI Publishing.
- Ferraz, S., Freitas, L. G. de, Lopes, E. A. & Dias-Arieira, C. R. (2010). *Manejo Sustentável de Fitonematoides* (1st ed., p. 306). Viçosa: Editora UFV.
- Ferraz, S. & Vale, L. A. C. (1997). *Controle de fitonematoides por plantas antagonicas* (p. 73). Viçosa: Editora UFV.
- Guarrera, P. M. (1999). Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 68(1-3), 183–92. doi:0.1016/S0378-8741(99)00089-6
- Hammond-Kosack, K. E., Atkinson, H. J. & Bowlest, D. J. (1990). Changes in abundance of translatable mRNA species in potato roots and leaves following root invasion by cyst-nematode *G. rostochiensis* pathotypes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 37(5), 339–354. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com.ez35.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/088557659090117G>
- Liu, D., Chen, L. & Duan, Y. (2011). Differential proteomic analysis of the resistant soybean infected by soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* race 3. *Journal of Agricultural Science*, 3(4), 160–167. doi:10.5539/jas.v3n4p160
- Lopes, E. A., Ferraz, S., Ferreira, P. A., Freitas, L. G., Gardiano, C. G., Dhingra, O. D. & Dallemole-Giaretta, R. (2008). Efeito da incorporação da parte aérea de quatro espécies vegetais sobre *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, 32(1), 76–80. Retrieved from http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol_321/76-80_co.pdf

- Lukhoba, C. W., Simmonds, M. S. J. & Paton, A. J. (2006). *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 1–24. doi:10.1016/j.jep.2005.09.011
- Mehta, A., Brasileiro, A. C. M., Souza, D. S. L., Romano, E., Campos, M. A., Grossi-de-Sá, M. F., Silva, M. S., Franco, O. L., Frago, R. R., Bevitore, R. & Rocha, T. L. (2008). Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us? *The FEBS Journal*, 275(15), 3731–46. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06528.x
- Oka, Y. (2010). Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments—A review. *Applied Soil Ecology*, 44(2), 101–115. doi:10.1016/j.apsoil.2009.11.003
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z. & Spiegel, Y. (2000). Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology*, 90(7), 710–5. doi:10.1094/PHYTO.2000.90.7.710
- Pandey, R. & Kalra, A. (2010). Inhibitory effects of vermicompost produced from agro-waste of medicinal and aromatic plants on egg hatching in *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. *Current Science*, 98(6), 833–835. Retrieved from http://www.currentscience.ac.in/Downloads/article_id_098_06_0833_0835_0.pdf
- Rodríguez-Kábana, R. (1986). Organic and inorganic nitrogen amendments to soil as nematode suppressants. *Journal of Nematology*, 18(2), 129–34. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2618534&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sharma, R. & Trivedi, P. C. (1992). Reduction of root-knot disease of brinjal using dry root powder amendment. *Current Nematology*, 3, 133–138.
- Thoden, T. C. & Boppré, M. (2010). Plants producing pyrrolizidine alkaloids: sustainable tools for nematode management? *Nematology*, 12(1), 1–24. doi:10.1163/138855409X12549869072248
- Walker, J. T. & Melin, J. B. (1996). *Mentha x piperita*, *Mentha spicata* and effects of their essential oils on *Meloidogyne* in soil. *Supplement to Journal of Nematology*, 28(4), 629–635. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619730/pdf/629.pdf>
- Wang, K.-H., McSorley, R., Marshall, A. J. & Gallaher, R. N. (2004). Nematode community changes associated with decomposition of

Crotalaria juncea amendment in litterbags. *Applied Soil Ecology*, 27(1), 31–45. doi:10.1016/j.apsoil.2004.03.006

- Wang, K.-H., Sipes, B. S. & Schmitt, D. P. (2002). *Crotalaria* as a cover crop for nematode management : A review. *Nematropica*, 32, 35–57. Retrieved from <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/69643/67303>
- Wilkins, M. R., Sanchez, J.-C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F. & Williams, K. L. (1996). Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1), 19–50. doi:10.1080/02648725.1996.10647923
- Yassin, M. Y. & Ismail, A. E. (1994). Effect of *Zinnia elegans* as a mix-crop along with tomato against *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*. *Anzeiger Für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz*, 67(3), 41–43. doi:10.1007/BF01906425

**CAPÍTULO I - REAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS E
ORNAMENTAIS À INOCULAÇÃO COM *MELOIDOGYNE JAVANICA***

RESUMO

AMORA, Deisy Xavier, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Reação de plantas medicinais e ornamentais à inoculação com *Meloidogyne javanica*.** Orientador: Silamar Ferraz. Coorientadores: Everaldo Antônio Lopes e Leandro Grassi de Freitas.

A reprodução e o desenvolvimento de *M. javanica* foram avaliados em raízes de espécies de plantas ornamentais e medicinais em dois experimentos realizados em casa de vegetação. Plântulas de falso-boldo (*Plectranthus barbatus*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), zínia (*Zinnia elegans*) e losna (*Artemisia absinthium*) foram inoculadas com 5.000 ovos do nematoide. Tomateiro (*Solanum lycopersicum*) foi utilizado como controle suscetível e crotalária (*Crotalaria spectabilis*) como planta não hospedeira. Sessenta dias após a inoculação, raízes de cinco plantas foram retiradas para a contagem de galhas e outras cinco foram incorporadas ao solo do vaso. Uma plântula de tomateiro foi utilizada para estimar a população remanescente de *M. javanica* nos vasos contendo ou não raízes das plantas antagonistas incorporadas. Foi avaliado também o desenvolvimento dos juvenis aos 15 e 30 dias após a inoculação das plantas. A produção de ovos do nematoide nas raízes de todas as plantas antagonistas testadas foi, em média, 90,3% menor que em tomateiro e, na avaliação da população remanescente do nematoide foi observado que a incorporação do sistema radicular não implicou em maior população de *M. javanica* para a cultura seguinte. Não foram visualizados nematoides nas raízes de hortelã-pimenta e falso boldo e, em losna, poucas galhas e fêmeas adultas. Nas raízes de zínia e crotalária foram encontrados nematoides pouco desenvolvidos, alguns em formato salsichoide, mas raramente fêmeas totalmente desenvolvidas, mesmo após 30 dias da inoculação. Das plantas antagonistas testadas, as mais eficientes para o controle de *M. javanica* são hortelã-pimenta, zínia e crotalária.

Palavras chave: *Artemisia absinthium*, *Crotalaria spectabilis*, *Mentha piperita*, nematoide das galhas, *Plectranthus barbatus*, *Zinnia elegans*

ABSTRACT

AMORA, Deisy Xavier, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Reaction of medicinals and ornamentals plants to *Meloidogyne javanica* inoculation.** Adviser: Silamar Ferraz. Co-advisers: Everaldo Antônio Lopes and Leandro Grassi de Freitas.

Reproduction and development of *Meloidogyne javanica* were evaluated into the roots of ornamental and medicinal plants in two experiments conducted under greenhouse conditions. Seedlings of *Plectranthus barbatus*, *Mentha piperita*, *Zinnia elegans* and *Artemisia absinthium* were inoculated with 5,000 eggs of *M. javanica*. *Solanum lycopersicum* was used as susceptible crop and *Crotalaria spectabilis* as non-host model. Sixty days after inoculation, five roots system of each treatment were removed for evaluation of the number of galls and other five were incorporated into the soil of the pot. A seedling of tomato was used to estimate the remaining population of *M. javanica* in pots containing, or not, the roots of antagonists plants, that have been incorporated. The development of juveniles at 15 and 30 days after inoculation of the antagonists plants was also evaluated. Lower egg production by the nematode in the roots of all antagonists plants tested was observed, and on the evaluation of the remaining population of the nematode it was observed that the incorporation of the root system did not result in greater population of *M. javanica* for the next crop. No galls or nematodes were observed within roots of *M. piperita* and *P. barbatus* and, on *A. absinthium* few galls and adult females were observed. Nematodes were underdeveloped within roots of *Z. elegans* and *C. spectabilis*, some in salsichoide format were found but, rarely females fully developed even after 30 days of inoculation. Among the antagonists plants tested, the most effective in controlling *M. javanica* were *M. piperita*, *Z. elegans* and *C. spectabilis*.

Keywords: *Artemisia absinthium*, *Crotalaria spectabilis*, *Mentha piperita*, *Plectranthus barbatus*, root-knot nematode, *Zinnia elegans*.

INTRODUÇÃO

Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) são patógenos amplamente difundidos nas áreas de plantio ao redor do mundo e são responsáveis por consideráveis perdas econômicas. As formas de manejo mais utilizadas são as práticas culturais, a utilização de variedades resistentes e os nematicidas químicos. No entanto, os nematicidas além de não fornecerem supressão em longo prazo, são caros, nocivos ao meio ambiente e à saúde humana.

A rotação de culturas é uma das práticas mais eficientes para o manejo de fitonematoides, podendo ser feita com variedades resistentes ou com plantas antagonistas. Apesar de vários genes de resistência a nematoides já terem sido identificados, as variedades resistentes disponíveis ainda são escassas e seu uso é bastante limitado (FULLER et al., 2008). Por sua vez, algumas plantas podem reduzir a população dos fitonematoides ao atuarem como planta não hospedeira, como planta armadilha ou produzirem compostos tóxicos, podendo esses mecanismos ocorrerem isoladamente ou em combinação (FERRAZ & FREITAS, 2004; LIMA et al., 2009; HOOKS et al., 2010).

Além da redução da população dos nematoides no solo, as plantas antagonistas trazem vários benefícios à cultura principal. Algumas delas são capazes de fixar nitrogênio da atmosfera e fornecerem expressivos volumes de matéria orgânica, aumentando a atividade de microrganismos antagonistas e melhorando as características gerais do solo (FERRAZ & FREITAS, 2004). Quando usadas em sistemas de rotação elas diminuem a pressão de seleção sobre os genes de resistência dos cultivares tradicionalmente utilizados e ainda auxiliam no manejo de outros patógenos de solo e de plantas daninhas.

Plantas do gênero *Crotalaria* são conhecidas pela capacidade em reduzir populações de fitonematoides (WANG et al., 2002), fixar

nitrogênio atmosférico e aumentar a ação da microbiota do solo (HINDS et al., 2013; WANG et al., 2004). As folhas de *Crotalaria* possuem monocrotalina, que é altamente tóxica aos nematoides e, nas raízes, de alguma forma os juvenis de *Meloidogyne* não ultrapassam o segundo estágio de desenvolvimento (SILVA, 1989).

Considerando que *Meloidogyne* é um gênero polífago, torna-se difícil encontrar opções de culturas agronômicas não hospedeiras para o seu manejo através da rotação de culturas. Assim, a busca por plantas a serem usadas em sistemas de rotação para o manejo de nematoides ainda é relevante. Plantas medicinais e ornamentais poderiam representar alternativas técnicas para o manejo do patógeno e opções de fornecimento de renda aos produtores. Assim, neste trabalho avaliou-se o efeito da planta ornamental zínia (*Zinnia elegans*) e das plantas medicinais losna (*Artemisia absinthium*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e falso-boldo (*Plectranthus barbatus*) no controle de *Meloidogyne javanica*. Para tal, avaliou-se o desenvolvimento de *M. javanica* nas raízes destas plantas antagonistas e a população do nematoide que remanesce no solo após o sistema radicular ser ou não incorporado após o cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

O inóculo de *M. javanica* foi obtido a partir de raízes de tomateiros da variedade ‘Santa Clara’ mantidos em casa de vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, MG. Os ovos do nematoide foram extraídos das raízes de tomateiro pela técnica de Hussey & Barker (1973) modificada por Boneti & Ferraz (1981).

Losna, hortelã-pimenta, falso-boldo e zínia foram avaliadas como opções para o manejo de *M. javanica*. Crotalária foi utilizada como planta antagonista modelo e tomateiro foi usado como controle suscetível. As plântulas foram produzidas em bandejas de isopor contendo substrato organomineral. Tomateiro, crotalária e zínia foram propagadas por sementes, falso boldo foi propagado por estaca e todas foram

transplantadas com 25 dias de idade. Losna e hortelã-pimenta foram propagadas por sementes e transplantadas com aproximadamente 40 dias de idade.

As plântulas foram transplantadas para vasos com 2,0 l de capacidade contendo mistura de solo de barranco e areia (1:1) previamente esterilizada com brometo de metila na dose de 80 cm³/m³ de solo. O sistema radicular de cada planta foi infestado com 5.000 ovos de *M. javanica* em 3,0 ml de suspensão aquosa. Sessenta dias após a inoculação, as plantas foram cortadas ao nível do solo e as raízes referentes ao tratamento sem incorporação foram retiradas dos vasos, lavadas e pesadas para posterior extração e contagem de ovos. As raízes referentes ao tratamento com incorporação foram fragmentadas e incorporadas novamente ao solo do vaso. Depois de retirar ou incorporar as raízes das plantas antagonistas, o solo foi devolvido a cada vaso, onde uma plântula de tomateiro foi plantada para estimar a população remanescente do nematoide. Após 30 dias, o número de galhas de cada sistema radicular foi contabilizado.

Para avaliação dos estádios de desenvolvimento do nematoide no interior das raízes, amostras contendo 0,5 g de raiz foram coletadas das plantas antagonistas antes da extração de ovos. Os nematoides foram corados no interior das raízes, seguindo a metodologia de Byrd et al (1983). Para isso, as raízes foram lavadas sob água corrente para a retirada do solo, cortadas em segmentos de 1 cm e clarificadas em solução de hipoclorito de sódio (1,5%) durante quatro minutos, com ocasional agitação. Para a retirada do excesso de hipoclorito, as raízes foram lavadas em água corrente e submersas em água por 15 minutos. Logo após esse período, as raízes foram transferidas para um béquer contendo 30 ml de água e 1 ml de solução corante (3,5 g de fucsina ácida, 250 ml de ácido acético glacial e 750 ml de água destilada). Esta solução foi aquecida e mantida sob fervura por 30 segundos. Após atingirem temperatura

ambiente, as raízes foram lavadas e colocadas em glicerina acidificada com algumas gotas de ácido clorídrico 5N e fervidas novamente. Ao término do processo, os nematoides foram observados com a utilização de microscópio óptico.

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x5 (raiz incorporada e raiz não incorporada x cinco plantas), com cinco repetições. O experimento foi conduzido no período de 11/2011 à 02/2012 (T_{\max} 27,1°C e T_{\min} 18,0°C) e repetido de 10/2012 à 01/2013 (T_{\max} 28,8 °C e T_{\min} 18,2°C). Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS

A produção de ovos de *M. javanica* foi, em média, 90,3% menor em todas as plantas medicinais e ornamentais em ambos os experimentos (Figura 1). A maior quantidade de ovos nas raízes dessas plantas foi produzida em losna, no primeiro experimento, mas ainda 30,8% menor que nas raízes de tomateiro. Por sua vez, as menores taxas de reprodução do nematoide foram observadas em falso-boldo (10,9%), hortelã-pimenta (0,1%) e zínia (3,9%), sendo igual à quantidade de ovos produzida nas raízes de crotalária (0,5%) (Figura 1).

Não foram observados nematoides dentro das raízes de hortelã-pimenta e falso-boldo quando estas foram coradas com fucsina ácida. Algumas fêmeas adultas foram visualizadas em losna. Nas raízes de zínia e crotalária foram encontrados nematoides pouco desenvolvidos, alguns em formato salsichoide, mas raramente fêmeas totalmente desenvolvidas, mesmo após 30 dias da inoculação (Figura 2).

Na avaliação da população viável de nematoide deixada no solo pelas plantas antagonistas, foi observado que não houve diferença entre

incorporar ou não o sistema radicular das plantas ao solo. Ou seja, a incorporação do sistema radicular não implicou em maior população de *M. javanica* para a cultura seguinte. Apesar da baixa reprodução de *M. javanica* nas raízes de losna e falso boldo, a população do nematoide deixada no solo foi capaz de causar elevado número de galhas nas raízes do tomateiro cultivado em sucessão. Estes valores foram iguais à quantidade de galhas produzidas na sucessão tomateiro-tomateiro. No experimento I, tomateiros cultivados após falso-boldo e tomateiro definharam e morreram, não sendo possível a contagem de galhas (Tabela 1).

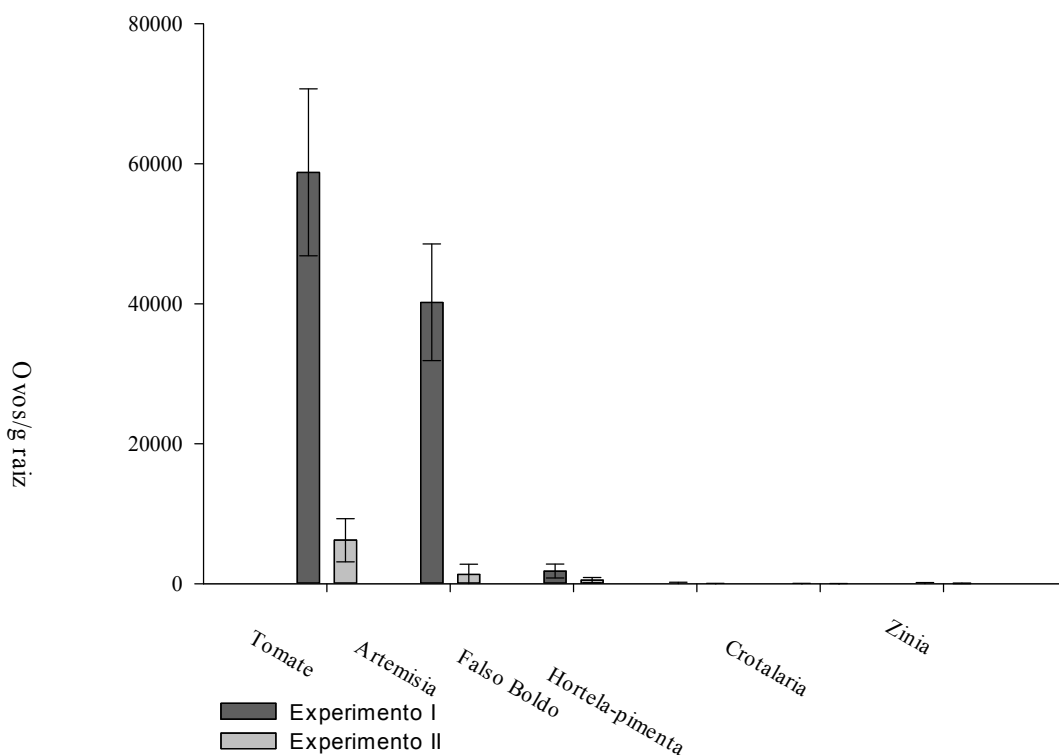


FIGURA 1: Reprodução de *Meloidogyne javanica* em falso boldo (*Plectranthus barbatus*), losna (*Artemisia absinthium*), hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), zínia (*Zinnia elegans*), crotalária (*Crotalaria spectabilis*) e tomateiro (*Solanum lycopersicum*) em dois experimentos realizados em casa de vegetação. As colunas são a média do número de ovos/g de raiz e as barras representam o intervalo de confiança a 95%.

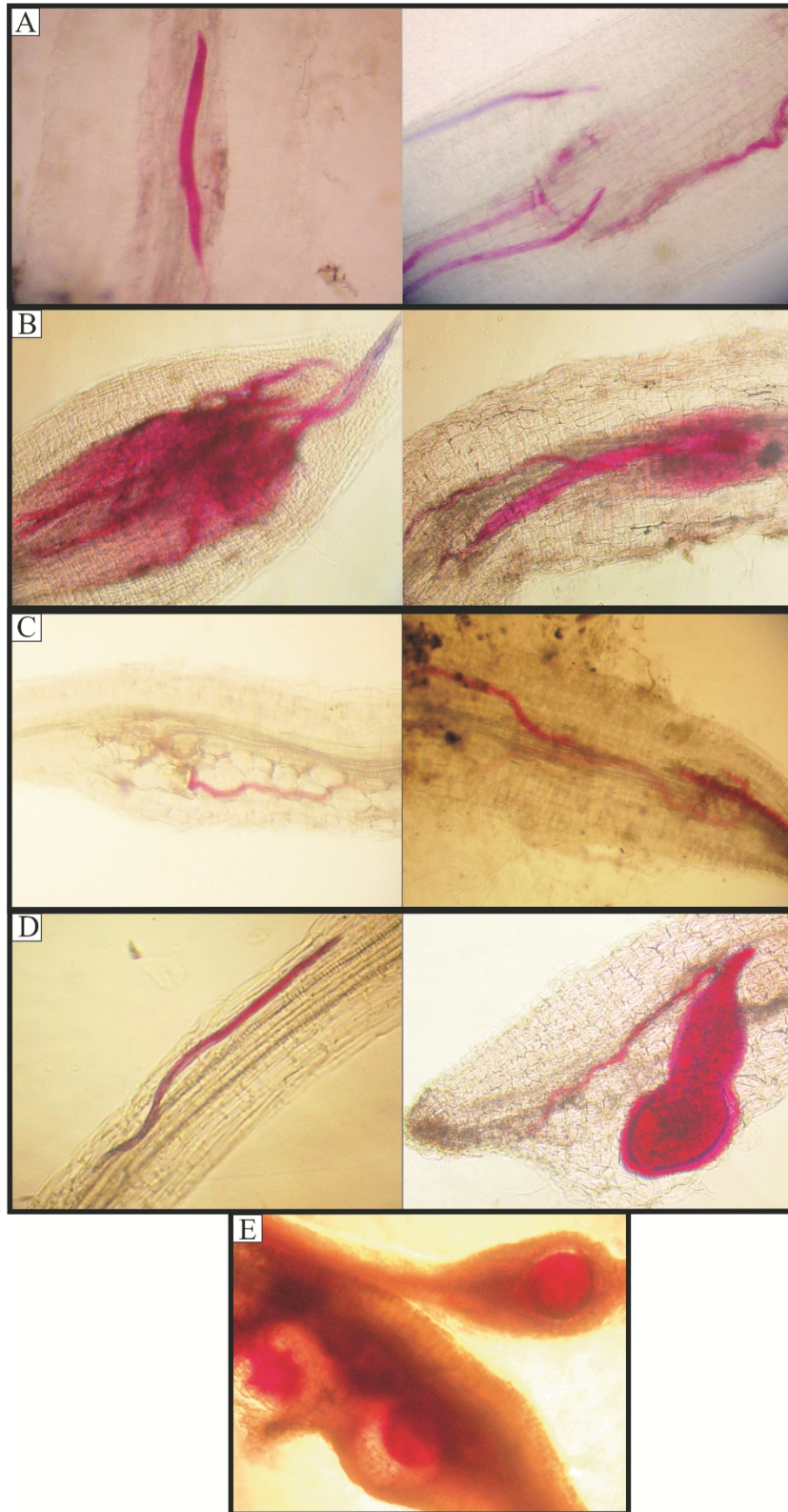


Figura 2: Desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* em raízes de plantas antagonistas e de tomateiro. A e B – raízes de crotalária aos 15 e 30 dias, respectivamente, após a inoculação. C e D - raízes de zínia aos 15 e 30 dias, respectivamente, após a inoculação. E - raízes de tomateiro aos 30 dias após a inoculação.

Tabela 1: Número de galhas (galhas/g de raiz) produzidas por *Meloidogyne javanica* em raiz de tomateiro cultivado em sucessão a plantas antagonistas em dois experimentos realizados em casa de vegetação.

Experimento I					
Plantas antecedentes ao tomateiro	Solo com raiz Incorporada	Solo sem raiz Incorporada	Média Geral	CV (%)	
Falso-Boldo	*	*	*	*	
Hortelã-pimenta	0,0	1,4	0,6 c	195,1	
Crotalária	1,5	1,4	1,5 c	145,1	
Tomateiro	*	*	*	*	
Zínia	47,7	57,6	52,7 b	50,7	
Losna	150,2	77,9	106,9 a	38,1	
Média	32,2 ^{ns}	31,5			
CV (%)	160,7	115,5			

Experimento II					
Plantas antecedentes ao tomateiro	Solo com raiz Incorporada	Solo sem raiz Incorporada	Média Geral	CV (%)	
Falso-Boldo	107,1	152,3	129,7 a	28,0	
Hortelã-pimenta	3,6	17,6	10,6 b	110,8	
Crotalária	0,0	0,2	0,1 b	212,1	
Tomateiro	178,1	105,5	141,6 a	39,8	
Zínia	54,6	11,5	33,0 b	155,9	
Losna	138,1	100,8	119,4 a	32,9	
Média	80,3 ^{ns}	64,6			
CV (%)	97,4	95,3			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns=não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade; *=plantas mortas.

DISCUSSÃO

Devido à baixa reprodução de *M. javanica* nas raízes de hortelã-pimenta, zínia e crotalária, estas podem ser usadas em rotação de cultura para reduzir a população do nematoide no solo. Como observado em outros estudos, o sistema radicular destas plantas pode conter substâncias que inibem a eclosão, o desenvolvimento ou causam a mortalidade de juvenis de nematoides (FERRIS & ZHENG, 1999; DOUDA et al., 2010).

As substâncias presentes ou liberadas pelo sistema radicular de hortelã-pimenta podem ter matado ou impedido a penetração dos juvenis de *M. javanica* em suas raízes. Sem a penetração e o desenvolvimento do nematoide ocorreu a redução da população de *M. javanica* no solo, constatado pela ausência de nematoides nas raízes do tomateiro plantado em sucessão. Extratos e óleos essenciais de hortelã-pimenta são altamente nocivos aos nematoides do gênero *Meloidogyne* e, também não foram produzidas galhas nas raízes destas plantas quando inoculadas com *M. arenaria* e *M. incognita* (WALKER & MELIN, 1996).

O desenvolvimento de *Meloidogyne* nas raízes de zínia foi semelhante ao que é usualmente observado em cravo de defunto (*Tagetes* sp.) e também em crotalária, onde os juvenis penetram, mas não passam do segundo estágio de desenvolvimento. Por pertencer à família botânica Asteraceae, zínia pode possuir mecanismo de defesa semelhante ao apresentados por cravo de defunto, que libera no solo o composto alfa-tertienil, tóxico a muitos nematoides (STEINER, 1941). Esse fenômeno pode ser de grande valor agrônômico por essas plantas poderem ser usadas como plantas produtoras de compostos tóxicos. Em crotalária, o desenvolvimento do nematoide é paralisado provavelmente por nessas plantas ocorrer a má formação das células gigantes (SILVA et al., 1990), que são essenciais para a nutrição do patógeno durante seu ciclo de vida.

Os compostos nematicidas de losna devem estar presentes na parte aérea das plantas e não no sistema radicular, pois *Meloidogyne* foi capaz de penetrar e se desenvolver e a incorporação do sistema radicular não reduziu a população do nematoide. A presença de compostos nematotóxicos na parte aérea de losna já foi constatada pela aplicação de extratos aquosos das folhas frescas (DIAS et al., 2000).

O falso-boldo, usado na medicina popular como anti-helmíntico (ABDEL-MOGIB et al., 2002), pode ter liberado compostos nematostáticos na rizosfera, impedindo a eclosão de *Meloidogyne*. No entanto, o efeito de tais substâncias permitiu que os ovos de *M. javanica*

eclodisse e penetrasse as raízes do tomateiro cultivado em sucessão. *Meloidogyne* apresenta alguns mecanismos de sobrevivência, como a fase *tardicult* dos ovos, onde o desenvolvimento embrionário dos juvenis acontece lentamente sob condições adversas, retomando o desenvolvimento normal quando as condições ambientais são favoráveis à sobrevivência do nematoide (CURTIS et al., 2009).

Muitas espécies de plantas antagonistas já foram testadas para o controle de fitonematoides. No entanto, a maioria das pesquisas destinou-se à extração de compostos nematicidas e à incorporação das partes aéreas das plantas antagonistas (CHITWOOD, 2002; HINDS, et al., 2013). O presente trabalho teve como finalidade escolher plantas, principalmente ornamentais e medicinais, que inviabilizassem o desenvolvimento de *M. javanica* em suas raízes. Das plantas testadas conclui-se que hortelã-pimenta e zínia, assim como crotalária, podem ser usadas em rotação de cultura para reduzir a população de *M. javanica* no solo.

LITERATURA CITADA

- Abdel-Mogib, M., Albar, H. A. & Batterjee, S. M. (2002). Chemistry of the genus *Plectranthus*. *Molecules*, 7(2), 271–301. doi:10.3390/70200271
- Barker, K. R., Hussey, R. S., Krusberg, L. R., Bird, G. W., Dunn, R. A., Ferris, H., Ferris, V. R., Freckman, D. W., Gabriel, C. J., Grewal, P. S., Macguidwin, A. E., Riddle, D. L., Roberts, P. A. & Schmitt, D. P. (1994). Plant and soil nematodes: societal impact and focus for the future. *Journal of Nematology*, 26(2), 127–37. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2619488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Boneti, J. I. da S. & Ferraz, S. (1981). Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6, 553.
- Byrd, D. W., Kirkpatrick, T. & Barker, K. R. (1983). An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15(1), 142–143. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2618249&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Chitwood, D. J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 221–249. doi:10.1146/annurev.phyto.40.032602.130045
- Curtis, R. H. ., Robinson, A. F. & Perry, R. N. (2009). *Root-knot Nematodes*. (R. N. Perry, M. Moens, & J. L. Starr, Eds.) *Root-Knot Nematodes* (p. 530). Wallingford: CABI. doi:10.1079/9781845934927.0000
- Dias, C. R., Schwan, A. V., Ezequiel, D. P., Sarmiento, M. C. & Ferraz, S. (2000). Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira*, 24(2), 203–210.
- Douda, O., Zouhar, M., Mazáková, J., Nováková, E. & Pavela, R. (2010). Using plant essences as alternative mean for northern root-knot nematode (*Meloidogyne hapla*) management. *Journal of Pest Science*, 83, 217–221. doi:10.1007/s10340-010-0287-4
- Ferraz, S. & Freitas, L. G. de. (2004). Use of antagonistic plants and natural products. In Z. Chen, S. Chen, & D. W. Dickson (Eds.), *Nematology-Advances and Perspectives Volume II: Nematode Management and Utilization* (p. 1234). CABI Publishing.
- Ferris, H. & Zheng, L. (1999). Plant sources of chinese herbal remedies : Effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, 31(3), 241–263.
- Fuller, V. L., Lilley, C. J. & Urwin, P. E. (2008). Nematode resistance. *The New Phytologist*, 180(1), 27–44. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02508.x
- Hinds, J., Koon-Hui, W., Marahatta, S. P., Meyer, S. L. F. & Hooks, C. R. R. (2013). Sunn hemp cover cropping and organic fertilizer effects on the nematode community under temperate growing conditions. *Journal of Nematology*, 45(4), 265–271.
- Hooks, C. R. R., Wang, K.-H., Ploeg, A. & McSorley, R. (2010). Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology*, 46(3), 307–320. doi:10.1016/j.apsoil.2010.09.005
- Hussey, R. S. & Barker, K. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57, 1025–1028.
- Lima, E. A., Mattos, J. K., Moita, A. W., Carneiro, R. G., Carneiro, R. M. D. G., Agronomia, D. De, Brasília, U. De & Hortaliças, E. (2009).

Host status of different crops for *Meloidogyne ethiopica* control, 34(June), 152–157.

Silva, G. S., Ferraz, S., & Santos, J. M. dos. (1989). Atração, penetração e desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* em raízes de *Crotalaria* spp.. *Nematologia Brasileira*, 13, 151–163.

Silva, G. S., Ferraz, S., & Santos, J. M. dos. (1990). Histopatologia de raízes de Crotalária parasitadas por *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, 15(1), 46–48.

Steiner, G. (1941). Nematodes parasitic on and associated with roots of marigolds (*Tagetes hybrids*). *Proceedings of The Biological Society of Washington*, 54, 31–34. Retrieved from <http://biostor.org/reference/74090>

Walker, J. T. & Melin, J. B. (1996). *Mentha x piperita*, *Mentha spicata* and effects of their essential oils on *Meloidogyne* in soil. *Supplement to Journal of Nematology*, 28(4), 629–635. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2619730/pdf/629.pdf>

Wang, K.-H., McSorley, R., Marshall, A. J. & Gallaher, R. N. (2004). Nematode community changes associated with decomposition of *Crotalaria juncea* amendment in litterbags. *Applied Soil Ecology*, 27(1), 31–45. doi:10.1016/j.apsoil.2004.03.006

Wang, K.-H., Sipes, B. S. & Schmitt, D. P. (2002). *Crotalaria* as a cover crop for nematode management : A review. *Nematropica*, 32, 35–57. Retrieved from <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/69643/67303>

**CAPÍTULO II - ANÁLISE PROTEÔMICA DE RAÍZES DE
CROTALARIA SPECTABILIS EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM
*MELOIDOGYNE JAVANICA***

RESUMO

AMORA, Deisy Xavier, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Análise proteômica de raízes de *Crotalaria spectabilis* em resposta à inoculação com *Meloidogyne javanica*.** Orientador: Silamar Ferraz. Coorientadores: Everaldo Antônio Lopes e Leandro Grassi de Freitas.

Crotalária é uma das plantas antagonistas mais estudadas para o controle de fitonematoides, por conter substâncias nematicidas liberadas durante a decomposição da matéria orgânica e pelo desenvolvimento do nematoide ser suprimido em suas raízes. No entanto, ainda não são conhecidos os mecanismos envolvidos na resposta de defesa desta planta à infecção pelos fitonematoides. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi identificar proteínas diferencialmente expressas por crotalária em resposta à inoculação com *Meloidogyne javanica* nos estádios iniciais de infecção. Foram avaliadas amostras de raízes de crotalária coletadas às 24 e 48 horas após a inoculação com *M. javanica*, tendo como controle raízes de plantas não inoculadas. As proteínas foram extraídas pelo método fenol-SDS e separadas por eletroforese bidimensional. Por meio da análise comparativa dos géis foram detectadas proteínas diferencialmente expressas, que foram posteriormente identificadas por espectrometria de massa. Foram identificadas quatro proteínas às 24 horas após a inoculação com *M. javanica*: V-type proton ATPase subunit B 1-like, ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e Heat Shock Protein. Estas proteínas estão relacionadas com a resposta de defesa das plantas à diferentes formas de estresse.

Palavras chave: eletroforese bidimensional, nematoide das galhas, plantas antagonistas

ABSTRACT

AMORA, Deisy Xavier, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Proteomic analysis of *Crotalaria spectabilis* roots in response to inoculation with *Meloidogyne javanica*.** Adviser: Silamar Ferraz. Co-advisers: Everaldo Antônio Lopes and Leandro Grassi de Freitas.

Crotalaria spectabilis, one of the most studied antagonistic plants for controlling parasitic nematodes, produces nematicidal substances released during the decomposition of its decayed matter and the development of nematode is also deleted in its roots. However, the mechanisms involved in plant defense response to infection by parasitic nematodes are, so far, unknown. Thus, the aim of this study was to identify proteins differentially expressed by *C. spectabilis* in response to inoculation with *M. javanica* in the early stages of infection. *Crotalaria spectabilis* root samples were collected at 24 and 48 hours after inoculation with *M. javanica*, and as a control, roots of non-inoculated plants were evaluated. The proteins were extracted by phenol-SDS method and separated by two-dimensional electrophoresis. Through the comparative analysis of gels, differentially expressed proteins were detected, and were subsequently identified by mass spectrometry. Four proteins produced at 24 hours after inoculation with *M. javanica*, and, in general, are considered to be associated with processes of cell signaling in response to cellular stress.

Key words: antagonistic plants, root-knot nematode, two dimensional electrophoresis

INTRODUÇÃO

O uso de plantas antagonistas em esquemas de rotação ou plantio consorciado é alternativa eficiente para o manejo de fitonematoides. Além de controlar o patógeno, algumas destas plantas são capazes de fixar nitrogênio da atmosfera e fornecerem expressivos volumes de matéria orgânica, que ao ser incorporada aumenta a atividade de fungos antagonistas e melhora as características gerais do solo (FERRAZ & FREITAS, 2004). Várias substâncias químicas com efeito nematicida já foram identificadas em plantas antagonistas, como α -terthienyl em *Tagetes*, isotiocianatos e glucosinolatos em brássicas, glicosídeos cianogênicos em *Sorghum*, dentre outros (CHITWOOD, 2002).

Dentre as plantas antagonistas, o gênero *Crotalaria* figura entre os mais estudados. A incorporação da matéria orgânica de *Crotalaria* ao solo suprime a população de *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Rotylenchulus reniformis*, *Radopholus similis*, *Belonolaimus longicaudatus* e *Heterodera glycines* (WANG et al., 2002; AMBROSANO et al., 2011). Além disso, aumenta a população de nematoides bacteriófagos e onívoros, otimizando a decomposição da matéria orgânica e mantendo o enriquecimento da cadeia alimentar do solo (WANG et al., 2004; AMBROSANO et al., 2011). As folhas e raízes de *Crotalaria* contêm monocrotalina, substância tóxica aos nematoides, e em suas raízes não há bom desenvolvimento dos fitonematoides (STEINER, 1941).

Os juvenis dos nematoides eclodem na presença das raízes de crotalária em níveis semelhantes aos ocorridos na presença de uma planta hospedeira. Embora seja capaz de penetrar as raízes da planta antagonista, a maioria dos juvenis de *Meloidogyne* e *Heterodera* não passa do segundo estágio de desenvolvimento e os que chegam à fase adulta tem a produção de ovos reduzida (SILVA et al., 1989; KUSHIDA et al., 2003).

O desenvolvimento e a reprodução do nematoide dependem do pleno estabelecimento do sítio de alimentação nas raízes das plantas, o que parece não ocorrer em *Crotalaria*. Em estudos histopatológicos realizados em raízes de *C. spectabilis* e *C. juncea* parasitadas por *M. javanica*, foi observado que o nematoide incita a formação de células-gigantes em ambos os hospedeiros (SILVA et al., 1990). Os autores notaram diferenças entre as células-gigantes formadas nas plantas antagonistas e no hospedeiro suscetível. Nas crotalárias, as células-gigantes apresentaram citoplasma mais denso, de aspecto granuloso, com menor número de núcleos e, em muitas delas, ausência de grandes vacúolos. Além disso, as células gigantes ainda foram menores em número e tamanho na planta antagonista do que nas raízes de tomateiro.

Além dos compostos nematicidas presentes em *Crotalaria* e da supressão do desenvolvimento de *Meloidogyne* em suas raízes ser fato há muito conhecido, ainda não se sabe quais mecanismos estão envolvidos na resposta de defesa da planta. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi identificar proteínas diferencialmente expressas por crotalária em resposta à inoculação com *M. javanica* nos estádios iniciais de infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos gerais

Os ensaios foram conduzidos no laboratório e casas de vegetação pertencentes ao Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIOAGRO-UFV) e no Núcleo de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa (NUBIOMOL), em Viçosa, MG.

Obtenção e preparo do inóculo

O inóculo de *M. javanica* foi obtido a partir de tomateiros mantidos em casa de vegetação e os ovos utilizados nos ensaios foram extraídos

destas plantas pela técnica de Hussey & Barker (1973) modificada por Boneti & Ferraz (1981).

Preparo das plântulas de *Crotalaria spectabilis*

Uma semente de *C. spectabilis* foi semeada por vaso de 0,5 l de capacidade e 30 dias após a germinação cada plântula foi inoculada com suspensão aquosa contendo 5000 ovos e juvenis de *M. javanica*, em mistura. As raízes foram coletadas 24 e 48 horas após a inoculação. Para o controle, foram coletadas raízes de plantas não inoculadas nos dois intervalos de tempos mencionados. Cada tratamento foi repetido três vezes e cada repetição foi constituída de raízes de cinco plantas. No momento da coleta, as raízes foram lavadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, depois foram armazenadas a -80° C até o momento da extração das proteínas.

Análises proteômicas

Extração de proteínas

A extração das proteínas foi realizada conforme metodologia descrita por Wang et al. (2003) com algumas modificações. Aproximadamente 10 g de raiz foram trituradas em nitrogênio líquido e transferidas para tubos de centrífuga de 50 ml. O material foi ressuspenso em 20 ml de solução contendo PVPP 1% (m/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v) e PMSF 1 mM em acetona gelada e homogeneizado em Polytron por 30 segundos, com os tubos sempre mantidos no gelo. Depois de homogeneizados, os tubos foram centrifugados a 6.000 g a 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado passou então por uma sequência de lavagens e, entre cada uma delas, o pellet foi desfeito sob agitação em vortex por 30 segundos e em seguida, foram centrifugados a 6.000 g a 4 °C por 15

minutos: 10 ml de acetona gelada (duas vezes), 10 ml de TCA 10% em acetona gelada (três vezes), 10% TCA em água (duas vezes), acetona 80% (duas vezes) e etanol 80% (uma vez). O pellet foi então seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 10 ml de tampão SDS denso (sacarose 0,85M, SDS 2% (m/v), Tris-HCl pH 8,0 0,1 M, PMSF 1 mM, β -mercaptoetanol 2% (v/v)). Após agitação em vortex, foram adicionados 5 ml de fenol tamponado (pH 8,0) e o material foi mantido em gelo por 10 minutos sendo, agitado em vortex a cada 2 minutos para maximizar o contato entre a solução aquosa e o fenol. Posteriormente, a amostra foi transferida para tubos de 15 ml e centrifugada a 6000 g a 4 °C por 15 minutos e a fração fenólica (superior) foi coletada e transferida para um novo tubo de 50 ml. As proteínas da fase fenólica foram precipitadas adicionando-se 20 ml acetato de amônio 0,1 M em metanol e incubadas por 12 horas a -20° C. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 6.000 g a 4 °C por 15 minutos. O precipitado recuperado foi lavado duas vezes em acetato de amônio 0,1 M em metanol, duas vezes em acetona 80%, uma vez em etanol 80% e uma vez em etanol 70% - 10 ml de cada solução. Ao pellet final foi adicionado 1 ml de etanol 70% para facilitar a transferência das alíquotas para tubos eppendorfs de 1,5 ml, que foram então centrifugados e secos à temperatura ambiente. Depois de seco, o pellet foi solubilizado em 300 μ l de tampão de solubilização (ureia 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% em água ultrapura). As proteínas presentes nas amostras foram solubilizadas com auxílio de aparelho ultrassom.

Quantificação de proteínas

A concentração proteica das amostras foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) e foi utilizada a albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão. Foi utilizado o reagente de Bradford pronto para uso (Sigma-Aldrich) de acordo as instruções do fabricante.

Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Focalização isoelétrica (IEF)

Para a realização da focalização isoelétrica, primeira dimensão da eletroforese, foram utilizadas tiras de 24 cm com intervalo linear de pH 3,0 a 10,0 (Immobiline DryStrip®). Em aparato de reidratação IPGBOX (GE Healthcare), foram aplicados a cada tira 450 µl de solução contendo 800 µg de proteínas, tampão IPG 2,5% e solução Destreak (GE Healthcare). As tiras foram reidratadas por 15 h a temperatura ambiente. Posteriormente, foram transferidas para o equipamento IPGphor III (GE Healthcare) para a focalização isoelétrica. A focalização foi realizada sob temperatura controlada de 20°C de acordo com as seguintes etapas: 1) 200 V x h em passo único por 1 hora; 2) 500 V x h em passo único de 500 volts; 3) 800 V x h em gradiente até 1000 volts; 4) 16500 V x h em gradiente até 10000 volts; 5) 27500 V x h em passo único de 10.000 volts. A amperagem máxima foi de 50 µA/ tira.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após a IEF, as tiras passaram por duas etapas de equilíbrio, sendo a primeira para redução e a segunda para alquilação das proteínas presentes nas tiras. Para tal, as tiras foram mantidas por 20 minutos, sob agitação constante, em 15 ml de solução de equilíbrio (Tris 75 mM pH 8,8, Ureia 6M, Glicerol 30%, SDS 2% e Azul de bromofenol 0,002%) com 1% de DTT e depois em 15ml de solução de equilíbrio com 2% de iodoacetamida. A segunda dimensão da eletroforese foi efetuada em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970), em gel de separação na concentração de 12,5% de poliacrilamida. As tiras equilibradas foram colocadas no topo do gel de poliacrilamida na presença de SDS e seladas com solução de

agarose. Como marcadores de massa molecular foram utilizadas as proteínas: fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidras carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). As condições de corrida foram: pré-corrida a 10 mA/gel por 60 minutos e corrida a 40 mA/gel até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. Foi utilizado cuba DaltSix (GE Healthcare) e a temperatura foi mantida a 8°C por meio de refrigeração com circulador termostático. Terminada a corrida, os géis foram colocados em solução de fixação contendo ácido acético a 10% (v/v) e etanol a 40% (v/v) de um dia para o outro. Em seguida, foram corados por 48 horas com solução contendo sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v), Coomassie blue G-250 0,08% (v/v) e etanol 20% (v/v). Após essa etapa, os géis foram lavados com solução de ácido acético 1% (v/v) até a eliminação do corante excedente.

Captura das imagens e análise da expressão

As imagens dos géis foram digitalizadas usando o Image Scanner III (GE Healthcare) no modo de escaneamento transparente, resolução de 300 dpi e filtro de cor vermelho. As imagens foram calibradas com o software Labscan (GE Healthcare). As análises comparativas das imagens digitais foram efetuadas utilizando o software ImageMaster 2D Platinum (GE-Healthcare). Através desse software foi realizada a detecção automática dos pontos proteicos (*spots*), seguida de correções manuais quando necessário. Foi estimado o número total de *spots*, os pontos isoelétricos e as massas moleculares. A comparação foi feita entre o controle não inoculado e o inoculado para cada tempo de inoculação, considerando três repetições biológicas para cada tratamento. Nas análises, foram considerados diferencialmente expressos *spots* que apresentaram uma variação de sobreposição de medidas (*Ratio*) acima de 1,0 e

ANOVA com $p < 0,05$. Dentro de cada tratamento e para cada um dos *spots* diferencialmente expresso, foi calculado o valor médio da porcentagem de volume (% Vol) para o inoculado e para o não inoculado. A comparação destes valores indica a diferença de expressão (nível de expressão) destas proteínas entre o inoculado e seu controle não inoculado, no seu determinado tempo.

Tripsinização da amostra proteica

A tripsinização foi realizada segundo o protocolo de Shevchenko et al. (2006) com algumas modificações. Os *spots* correspondentes às proteínas diferencialmente expressas foram retirados dos géis com auxílio de ponteiros estéreis e colocados em micro tubos de 1,5 mL. Para remoção da coloração, fez-se duas lavagens com 200 µL de solução de descoloração (metanol 50% (v/v) e ácido acético 5% (v/v)), sendo a primeira por quatro horas e a segunda de um dia para o outro, ambas à temperatura ambiente e sob agitação em Thermomixer digital Comfort (Eppendorf) a 300 rpm. A solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com 200 µL de acetonitrila por 10 min e depois secos em microcentrífuga à vácuo por 15 min. As proteínas foram então, reduzidas com 50 µL de DTT 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min. Após esta etapa, as proteínas foram alquiladas com 50 µL de iodoacetamida 100 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min, à temperatura ambiente, na ausência de luz. Sequencialmente, os pedaços de gel foram desidratados em 200 µL de acetonitrila por 10 min a temperatura ambiente e depois reidratados em 200 µL de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de acetonitrila por 10 min e os géis foram secos em microcentrífuga à vácuo por 15 min.

Para a etapa de digestão enzimática, os pedaços de géis foram reidratados por 10 minutos, no gelo, com 30 μl de solução contendo tripsina (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$) e bicarbonato de amônio 50 mM. Depois deste tempo, 10 μl de bicabornato de amônio 50 mM foram adicionados às amostras, homogeneizados em vortex e centrifugados por 30 segundos. As amostras foram incubadas a 37 °C de um dia para o outro.

No dia seguinte, 40 μl de bicabornato de amônio 50 mM foram adicionados e as amostras foram incubadas por 10 minutos, homogeneizando em vortex ocasionalmente. Os tubos foram centrifugados por 30 segundos, e o sobrenadante foi transferido para um micro tubo de 0,5 mL. Foram adicionados 30 μl de tampão de extração (acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 5% (v/v)) aos tubos contendo os pedaços de géis, que foram incubados por mais 10 minutos, homogeneizados em vortex ocasionalmente, centrifugados por 30 seg. e o sobrenadante adicionado ao sobrenadante coletado anteriormente. Essa etapa foi repetida por mais duas vezes. As amostras foram secas em microcentrífuga à vácuo e armazenadas em -80 °C até o momento da análise. Para análise, 20 μl TFA 1% (v/v) foram adicionados às amostras para ressuspensão.

Espectrometria de massa

A identificação de proteínas foi realizada utilizando espectrômetro de massa disponibilizado pelo Núcleo de Biomoléculas (Nubiomol-UFV). Alíquota de 0,5 μl de cada amostra contendo os peptídeos foram aplicadas sobre uma placa de aço, juntamente com 0,5 μl da matriz DHB (2,5- ácido di-hidroxibenzoico). Após a cristalização foi iniciada a análise no espectrômetro. Os peptídeos foram ionizados pela técnica de MALDI.

Identificação de proteínas por espectrometria de massa

A identificação das proteínas foi realizada por meio dos dados de MS1 por PMF (Peptide Mass Fingerprint) confrontando-os com sequências obtidas das proteínas presentes nos bancos de dados NCBI/Viridiplantae, com auxílio do software Mascot versão 2.2.07 (Matrix Science, 2012). As pesquisas foram realizadas nos bancos de dados públicos do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

RESULTADOS

Os perfis proteômicos das raízes de *C. spectabilis* inoculadas e não inoculadas com *M. javanica*, nos dois tempos estudados, estão apresentados nas Figuras 1 e 2. Após 24 da inoculação com *M. javanica*, a média de *spots* detectados foi 840 nos géis das plantas inoculadas e 818 nos das não inoculadas (Figura 1). Por sua vez, após 48 horas, as médias foram de 495 e 413, respectivamente nos géis referentes à plantas inoculadas e não inoculadas (Figura 2).

Ao todo, foram detectados 50 *spots* diferencialmente expressos nos dois tempos avaliados (Figura 3). Às 24 horas após a inoculação foram detectados 24 *spots* diferenciais, destes, 15 *spots* com aumento de volume de expressão e nove *spots* presentes somente nos géis referentes à inoculação com o nematoide. Às 48 horas após a inoculação foram detectados 26 *spots* diferencialmente expressos, sendo 19 presentes somente nos géis inoculados e sete correspondentes ao aumento de expressão nas plantas inoculadas.

A identificação das proteínas foi realizada pelo auxílio do software Mascot que apresentou valores de escores significativamente acima do limite mínimo de confiabilidade (dados não mostrados). Os detalhes das proteínas identificadas, com o seu

respectivo match ID (número de identificação da proteína disponibilizado pelo software ImageMaster III), tempo de inoculação, médias da % de volume de *spots* de e os níveis de expressão de cada proteína estão apresentados nas Tabelas 1 e 2 e na Figura 4.

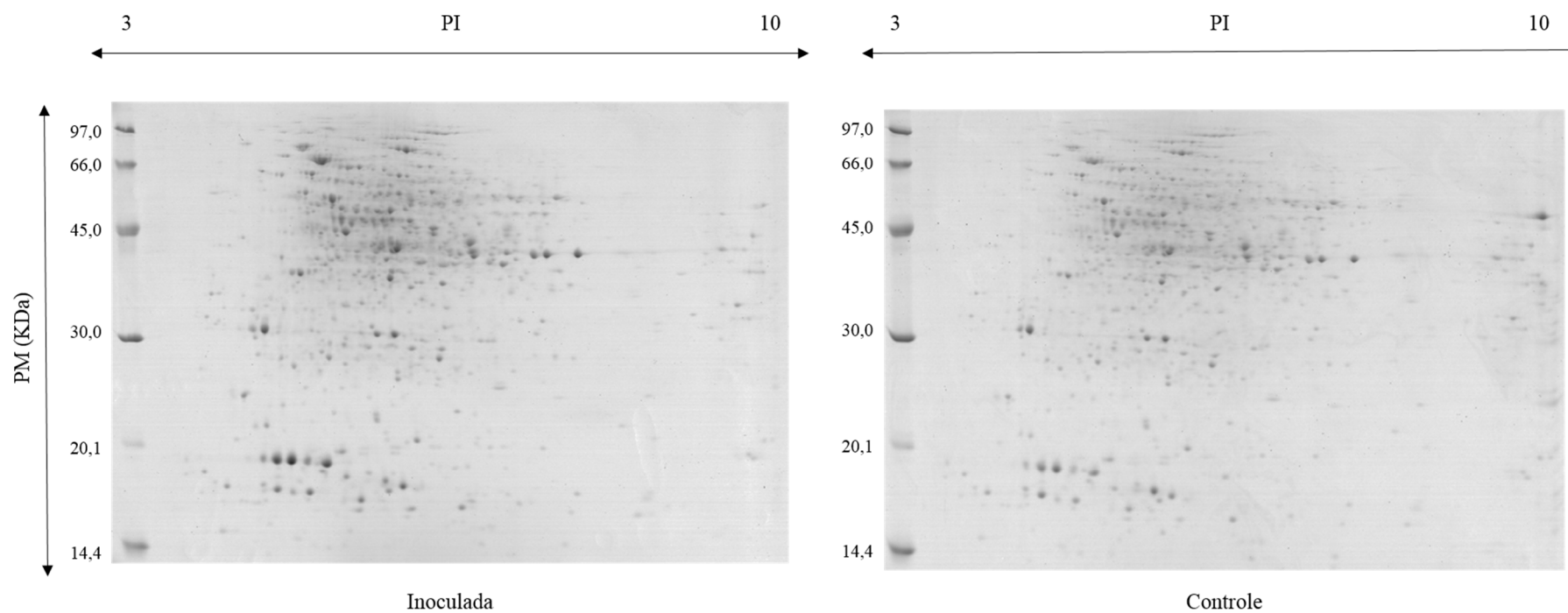


FIGURA 1: Perfil proteômico de raízes de *Crotalaria spectabilis* inoculadas (inoculada) e não inoculadas (controle) com *Meloidogyne javanica*, 24 horas após a inoculação. Cerca de 800 μ g de proteínas foram carregados nas tiras IPG de 24 cm (pH 3-10) para análise bidimensional. Os géis foram visualizados com Coomassie brilliant blue. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

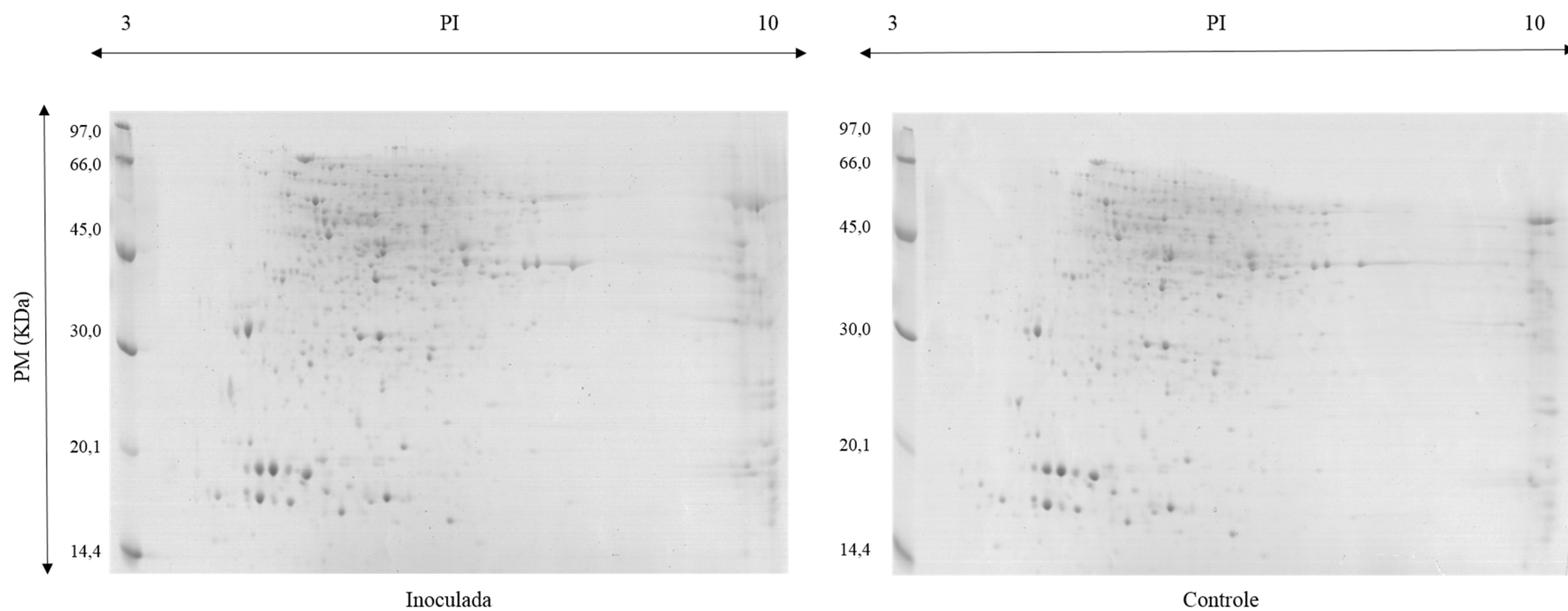


FIGURA 2: Perfil proteômico de raízes de *Crotalaria spectabilis* inoculadas (inoculada) e não inoculadas (controle) com *Meloidogyne javanica*, 48 horas após a inoculação. Cerca de 800 µg de proteínas foram carregados nas tiras IPG de 24 cm (pH 3-10) para análise bidimensional. Os géis foram visualizados com Coomassie brilliant blue. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

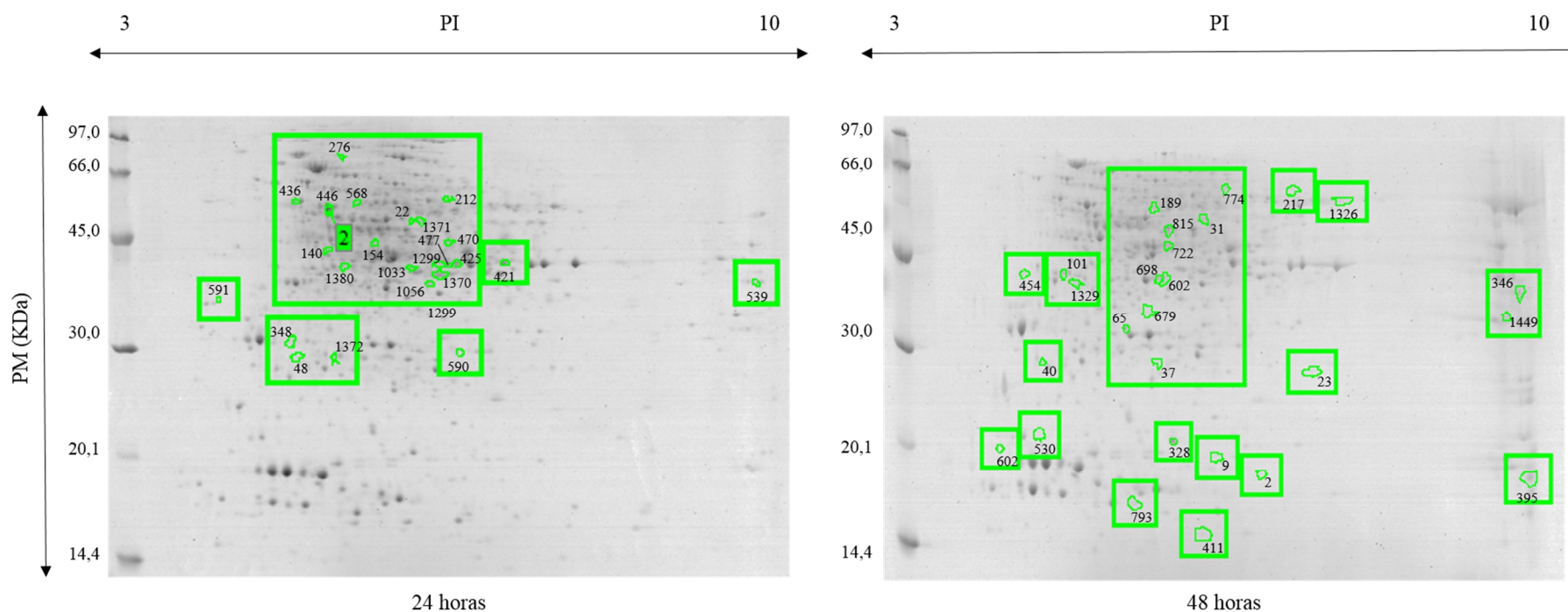


FIGURA 3: Evidenciação dos *spots* diferencialmente expressos em raízes de *Crotalaria spectabilis* às 24 e 48 horas após a inoculação com *Meloidogyne javanica*. Cerca de 800 μ g de proteínas foram carregados nas tiras IPG de 24 cm (pH 3-10) para análise bidimensional. Os géis foram visualizados com Coomassie brilliant blue. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

TABELA 1: Proteínas diferencialmente expressas em raízes de *Crotalaria spectabilis* em resposta à inoculação com *Meloidogyne javanica* identificadas por espectrometria de massas.

Proteína	Match ID	Espécie	Acesso (GI)*	PI	MW
V-type proton ATPase subunit B 1-like	436	<i>Brachypodium distachyon</i>	357140354	4,7	56277
ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like	446	<i>Glycine max</i>	356536246	5,1	53523
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	539	<i>Dianthus caryophyllus</i>	462137	9,7	37891
Heat Shock Protein	591	<i>Medicago truncatula</i>	357464138	3,9	36192

* GenInfo Identifier (GI) - número de acesso ao GenBank – NCBI; PI= Ponto isoelétrico; MW= Peso Molecular

TABELA 2: Nível de expressão relativa das proteínas baseado na média da % de volume dos *spots* das plantas inoculadas e não inoculadas.

Proteína	Match ID	Tempo	% Volume		Nível de expressão
			Inoculado	Não Inoculado	
V-type proton ATPase subunit B 1-like	436	24 h	0,0882	0,0749	1,17 (+)
ATP synthase, beta subunit	446	24 h	1,0741	0,7718	1,39(+)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	539	24 h	0,0701	0,0447	4,71(+)
Heat Shock Protein	591	24 h	0,0425	ND	NA

O sinal (+) indica aumento na expressão da proteína em resposta à inoculação com *Meloidogyne javanica*.

ND = não detectado, NA = não aplicável.

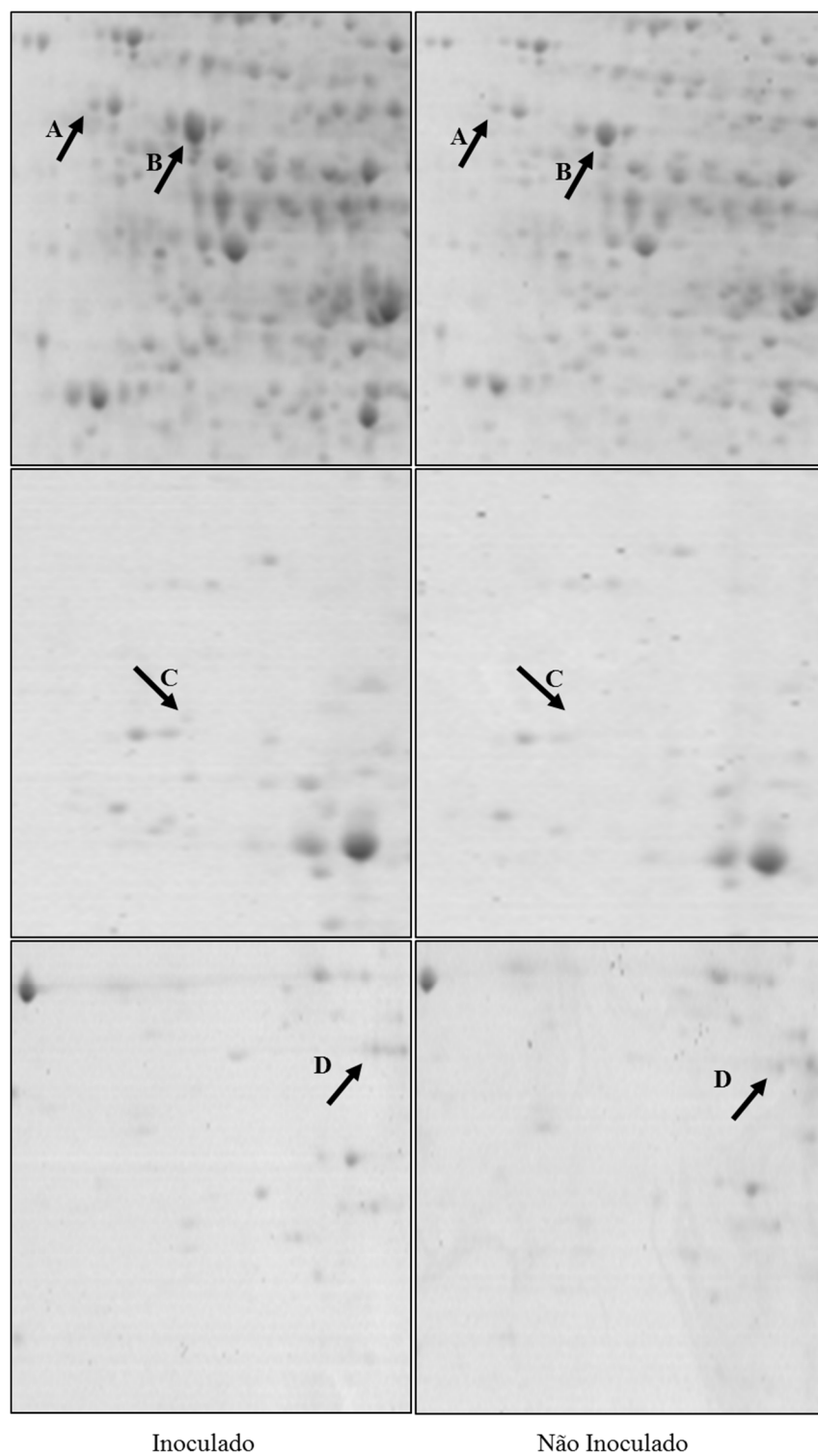


FIGURA 4: Spots correspondentes a proteínas diferencialmente expressas em *Crotalaria spectabilis*, 24 horas após a inoculação com *Meloidogyne javanica*. A= V-type proton ATPase subunit B 1-like; B= ATP synthase, beta subunit, C= Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e D= Heat Shock Protein

DISCUSSÃO

Uma das características mais marcantes no antagonismo de espécies de *Crotalaria* a *Meloidogyne* spp. é a não formação das células-gigantes normais. Nas raízes de crotalárias, as células gigantes são menores que o normal (SILVA et al., 1990) e aparentemente são ineficientes na nutrição do patógeno, que não se desenvolve. As proteínas diferencialmente expressas nas raízes de *C. spectabilis* em resposta à inoculação com *M. javanica* identificadas neste trabalho estão, de forma geral, relacionadas com os mecanismos de resposta de defesa desencadeados pelas plantas.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase citoplasmática (GAPDH) é uma enzima conservada em todos os organismos superiores. A GAPDH é uma enzima da via glicolítica responsável pela conversão do gliceraldeído 3-fosfato em D glicerato 1,3,-bisfosfato. É essencial para a manutenção dos níveis de ATP celular e para o metabolismo de carboidratos. Além da sua função principal na glicólise, GAPDH executa diferentes funções na célula. Em *C. spectabilis* essa proteína pode ter papel fundamental na má formação das células gigantes, uma vez que existem evidências de sua participação na apoptose e da sua superexpressão em resposta a várias formas de estresse celular. De particular importância, GAPDH parece ser monitora e componente de sinalização da morte celular induzida pelo estresse oxidativo. Em *Arabidopsis thaliana*, GAPDH interagiu com a fosfolipase D, proteína associada à membrana plasmática, para a transdução do sinal de espécies reativas de oxigênio, que são importantes mediadores de resposta a estresse em plantas (GUO et al., 2012).

Proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins - HSPs) /chaperonas são responsáveis pelo enovelamento, montagem, translocação e degradação de proteínas em muitos processos celulares normais, mas

também podem desempenhar papel crucial na proteção de plantas contra o estresse, restabelecendo a conformação normal da proteína e a homeostase celular. As chaperonas são expressas em plantas não só sob altas temperaturas, mas também em resposta a vasta gama de outros estímulos ambientais, como salinidade, frio e estresse oxidativo (WANG et al., 2004). Em trabalho realizado com *A. thaliana* foi visto que a funcionalidade de RPM1, proteína que confere resistência a *Pseudomonas syringae*, depende de sua interação com HSP90, que por sua vez, atua como receptor de sinal de efetores do patógeno (HUBERT et al., 2003). Análises proteômicas de secreções esofagianas dos nematoides das galhas sugerem que pelo menos 60 proteínas diferentes podem ser secretadas pelo estilete do nematoide durante o parasitismo e a chaperona identificada nesse trabalho pode estar ligada ao reconhecimento ou à degradação desses efetores (CAILLAUD et al., 2008).

Os nematoides secretam enzimas degradadoras de parede celular e efetores que manipulam diretamente o metabolismo da planta, reprogramando as células para formarem as células-gigantes, e suprimindo a resposta de defesa hospedeiro (GHEYSEN & MITCHUM, 2011). O reconhecimento desses efetores por *C. spectabilis* pode desencadear aumento na síntese de proteínas que atuarão na manutenção do metabolismo normal dos tecidos vegetais. O aumento no metabolismo da célula pode aumentar a demanda por energia, requerendo maior disponibilidade de ATP, e também exigir condições ótimas para o pleno funcionamento das organelas, como o estabelecimento do pH citosólico.

Duas formas de proteínas ligadas à produção de ATP foram encontradas nesse trabalho. A ATP sintase, responsável pela produção de ATP e a V-type H⁺ATPases, também conhecidas como H⁺V-ATPases e VATPases. As VATPases são uma família de bombas de prótons, dependentes de ATP, responsáveis pela acidificação de compartimentos intracelulares em células eucarióticas. Essa acidificação desempenha

papel importante em vários processos celulares, em particular os processos de transporte pela membrana (FORGAC, 1999). A VATPase está virtualmente presente em todas as células eucarióticas e sua integridade da VATPase é necessária para o funcionamento do complexo de Golgi, retículo endoplasmático e vacúolos. Nos vacúolos, pH próximo a 5 é necessário para o metabolismo das macromoléculas, como proteases, glicosidases, lipases, nucleases e fosfatases. Uma outra função do vacúolo auxiliado pela ATPase é a regulação do pH citosólico e a absorção de cátions, como Na^+ , Ca^{2+} e Cd^{2++} . (BEYENBACH & WIECZOREK, 2006).

O estudo do perfil proteômico das raízes de *C. spectabilis* inoculadas com *M. javanica* começa a elucidar a forma de defesa desta planta antagonista à infecção por fitonematoides. Como esperado, a resposta de defesa de *Crotalaria* depende da interação entre proteínas que estão envolvidas em vários processos que podem funcionar de forma cooperativa para restabelecer a homeostase sob condições de estresse biótico. As proteínas diferencialmente expressas em resposta à inoculação de *C. spectabilis* com *M. javanica* identificadas nesse trabalho, de forma geral, estão relacionadas com a resposta de defesa das plantas à diferentes formas de estresse.

LITERATURA CITADA

- Ambrosano, E. J., Cantarella, H., Ambrosano, G. M. B., Schammas, E. A., Dias, F. L. F., Rossi, F., Trivelin, P.C.O., Muraoka, T., Sachs, R. C. C., Azcón, R. (2011). Produtividade da cana-de-açúcar após o cultivo de leguminosas. *Bragantia*, 70(4), 810–818. doi:10.1590/S0006-87052011000400012
- Beyenbach, K. W., & Wiczorek, H. (2006). The V-type H^+ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *The Journal of Experimental Biology*, 209(4), 577–89. doi:10.1242/jeb.02014

- Boneti, J. I. da S., & Ferraz, S. (1981). Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6, 553.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Caillaud, M.-C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., de Almeida Engler, J., Favery, B. (2008). Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology*, 165(1), 104–13. doi:10.1016/j.jplph.2007.05.007
- Chitwood, D. J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 221–249. doi:10.1146/annurev.phyto.40.032602.130045
- Ferraz, S., & Freitas, L. G. de. (2004). Use of antagonistic plants and natural products. In Z. Chen, S. Chen, & D. W. Dickson (Eds.), *Nematology-Advances and Perspectives Volume II: Nematode Management and Utilization* (p. 1234). CABI Publishing.
- Forgac, M. (1999). Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 12951–12954. doi:10.1074/jbc.274.19.12951
- Gheysen, G., & Mitchum, M. G. (2011). How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 415–21. doi:10.1016/j.pbi.2011.03.012
- Guo, L., Devaiah, S. P., Narasimhan, R., Pan, X., Zhang, Y., Zhang, W., & Wang, X. (2012). Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase D δ to transduce hydrogen peroxide signals in the Arabidopsis response to stress. *The Plant Cell*, 24(5), 2200–12. doi:10.1105/tpc.111.094946
- Hubert, D. A., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K., & Dangl, J. L. (2003). Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *The EMBO Journal*, 22(21), 5679–5689. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592967>
- Hussey, R. S., & Barker, K. . (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57, 1025–1028.

- Kushida, A., Suwa, N., Ueda, Y., & Momota, Y. (2003). Effects of *Crotalaria juncea* and *C. spectabilis* on hatching and population density of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* (Tylenchida: Heteroderidae). *Applied Entomology and Zoology*, 38(3), 393–399. doi:10.1303/aez.2003.393
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. doi:10.1038/227680a0
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1(6), 2856–60. doi:10.1038/nprot.2006.468
- Silva, G. S., Ferraz, S., & Santos, J. M. dos. (1989). Atração, penetração e desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* em raízes de *Crotalaria* spp. *Nematologia Brasileira*, 13, 151–163. Retrieved from <http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol13u/151-163pb.pdf>
- Silva, G. S., Ferraz, S., & Santos, J. M. dos. (1990). Histopatologia de raízes de *Crotalaria* parasitadas por *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, 15(1), 46–48.
- Steiner, G. (1941). Nematodes parasitic on and associated with roots of marigolds (*Tagetes* hybrids). *Proceedings of The Biological Society of Washington*, 54, 31–34. Retrieved from <http://biostor.org/reference/74090>
- Wang, K.-H., McSorley, R., Marshall, A. J., & Gallaher, R. N. (2004). Nematode community changes associated with decomposition of *Crotalaria juncea* amendment in litterbags. *Applied Soil Ecology*, 27(1), 31–45. doi:10.1016/j.apsoil.2004.03.006
- Wang, K.-H., Sipes, B. S., & Schmitt, D. P. (2002). *Crotalaria* as a cover crop for nematode management: A review. *Nematropica*, 32, 35–57. Retrieved from <http://journals.fcla.edu/nematropica/article/view/69643/67303>
- Wang, W., Scali, M., Vignani, R., Spadafora, A., Sensi, E., Mazzuca, S., & Cresti, M. (2003). Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis*, 24(14), 2369–75. doi:10.1002/elps.200305500
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress

response. *Trends in Plant Science*, 9(5), 13–15.
doi:10.1016/j.tplants.2004.03.006

CAPÍTULO III – AUMENTO NA EXPRESSÃO DE S-ADENOSIL-L-METIONINA EM *ZINNIA ELEGANS* INOCULADA COM *MELOIDOGYNE JAVANICA*

RESUMO

AMORA, Deisy Xavier, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Aumento na expressão de S-adenosil-L-metionina em *Zinnia elegans* inoculada com *Meloidogyne javanica*.** Orientador: Silamar Ferraz. Coorientadores: Everaldo Antônio Lopes e Leandro Grassi de Freitas.

Meloidogyne javanica é uma das principais espécies de fitonematoides em todo o mundo, e pode ser controlado por meio de rotação de culturas. Apesar do cultivo de zínia (*Zinnia elegans*) em áreas infestadas reduzir o número de nematoides no solo, o mecanismo pelo qual ocorre essa redução ainda é desconhecido. Assim, para compreender os mecanismos envolvidos no antagonismo de zínia a *M. javanica*, as mudanças no proteoma de raízes inoculadas e não inoculadas foram analisadas pela combinação de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. As proteínas do sistema radicular foram resolvidas por 2-DE, com IEF no intervalo de pH de 3-10 e por SDS-PAGE em géis de 12%. Géis corados com coomassie blue revelaram a existência de diferenças entre as plantas inoculadas e não inoculadas. A inoculação com o nematoide induziu a expressão de S-adenosil-L-metionina, e é possível que a resistência de zínia a *M. javanica* possa estar envolvida com compostos como o etileno e as poliaminas.

Palavras chave: eletroforese bidimensional, nematoide das galhas, plantas antagonista

ABSTRACT

AMORA, Deisy Xavier, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Overexpression of S-adenosyl-L-methionine synthetase in *Zinnia elegans* inoculated with *Meloidogyne javanica*.** Adviser: Silamar Ferraz. Co-advisers: Everaldo Antônio Lopes and Leandro Grassi de Freitas.

Meloidogyne javanica is among the most economically destructive plant-parasitic nematodes, with a wide host range and geographical distribution. Despite of it, *M. javanica* can sometimes be controlled by crop rotation. Although growing *Zinnia elegans* can reduce nematode numbers in soil, the mechanism of the reduction is unknown. So, as a global approach to gain a better understanding of the mechanisms involved in the antagonism of *Z. elegans* to *M. javanica*, changes in the root proteome of inoculated and non-inoculated seedlings of *Z. elegans* were analyzed by a combination of two-dimensional electrophoresis mass spectrometry. Root proteins from non-inoculated and inoculated plants were resolved by 2-DE, with IEF in the 3-10 pH range and SDS-PAGE on 12% gels. Coomassie blue stained gels revealed the existence of differences between inoculated and non-inoculated plants. Nematode inoculation strongly induced the expression of S-adenosyl-L-methionine and the results are discussed in terms of induced elements involved in *Z. elegans* resistance against *Meloidogyne javanica*, such as ethylene and polyamines.

Key words: antagonistic plants, root-knot nematode, two dimensional electrophoresis.

INTRODUÇÃO

Os nematoides das galhas são considerados fatores limitantes à produção agrícola em muitas partes do mundo. O uso de nematicidas para o manejo do patógeno vem sendo desencorajado por causa de seus efeitos poluentes e danosos a saúde de humanos e animais. Além disso, a utilização excessiva de nematicidas provoca degradação do meio ambiente e pode levar ao desenvolvimento de resistência nas espécies alvo. Uma medida de controle alternativo pode ser obtida com o uso de plantas antagonistas.

Zinnia elegans é uma planta ornamental comercialmente cultivada como flor de corte, e é capaz de reduzir a população de algumas espécies de fitonematoides no solo (YASSIN & ISMAIL, 1994; CARTER et al., 2010), o que a torna uma possível alternativa para o manejo do patógeno, principalmente em ambiente de cultivo protegido. Juvenis de *Meloidogyne incognita*, por exemplo, não se multiplicam nas raízes de *Z. elegans* e não conseguem penetrar as raízes de uma planta hospedeira quando nas proximidades são cultivadas plantas de zínia (YASSIN & ISMAIL, 1994). Nas raízes de Asteraceae, família botânica de *Z. elegans*, são encontradas substâncias nematicidas, como o α -terthienyl, que apresentam grande atividade quando as raízes estão em pleno crescimento (OKA, 2010).

O entendimento de muitos aspectos da resposta de defesa de plantas a fitonematoides é baseado na similaridade entre os mecanismos pertencentes às respostas de defesa a outros patógenos de plantas, que são na maioria das vezes mais bem caracterizados (TOMCZAK et al., 2009). Como ainda são escassos os estudos de interação entre nematoides e plantas antagonistas é necessário investigar as formas de defesa apresentadas por estas plantas e a proteômica tem sido usada com sucesso para o estudo de interações em diferentes patossistemas. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar mudanças no perfil de proteínas das raízes de zínia induzidas pela inoculação com *M. javanica*.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos gerais

Os ensaios foram conduzidos no laboratório e casas de vegetação pertencentes ao Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides (BIOAGRO-UFV) e no Núcleo de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa (NUBIOMOL), em Viçosa, MG.

Obtenção e preparo do inóculo

O inóculo de *M. javanica* foi obtido a partir de tomateiros mantidos em casa de vegetação e os ovos utilizados nos ensaios foram extraídos destas plantas pela técnica de Hussey & Barker (1973) modificada por Boneti & Ferraz (1981).

Preparo das plântulas de *Crotalaria spectabilis*

Uma semente de *C. spectabilis* foi semeada por vaso de 0,5 l de capacidade e 30 dias após a germinação cada plântula foi inoculada com suspensão aquosa contendo 5000 ovos e juvenis de *M. javanica*, em mistura. As raízes foram coletadas 24 e 48 horas após a inoculação. Para o controle, foram coletadas raízes de plantas não inoculadas nos dois intervalos de tempos mencionados. Cada tratamento foi repetido três vezes e cada repetição foi constituída de raízes de cinco plantas. No momento da coleta, as raízes foram lavadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, depois foram armazenadas a -80° C até o momento da extração das proteínas.

Análises proteômicas

Extração de proteínas

A extração das proteínas foi realizada conforme metodologia descrita por Wang et al. (2003) com algumas modificações. Aproximadamente 10 g de raiz foram trituradas em nitrogênio líquido e transferidas para tubos de centrífuga de 50 mL. O material foi ressuscitado em 20 mL de solução contendo PVPP 1% (m/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v) e PMSF 1 mM em acetona gelada e homogeneizado em Polytron por 30 segundos, com os tubos sempre mantidos no gelo. Depois de homogeneizados, os tubos foram centrifugados a 6.000 g a 4 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado passou então por uma sequência de lavagens e, entre cada uma delas, o pellet foi desfeito sob agitação em vortex por 30 segundos e em seguida, foram centrifugados a 6.000 g a 4 °C por 15 minutos: 10 mL de acetona gelada (duas vezes), 10 mL de TCA 10% em acetona gelada (três vezes), 10% TCA em água (duas vezes), acetona 80% (duas vezes) e etanol 80% (uma vez). O pellet foi então seco à temperatura ambiente e ressuscitado em 10 mL de tampão SDS denso (sacarose 0,85M, SDS 2% (m/v), Tris-HCl pH 8,0 0,1 M, PMSF 1 mM, β -mercaptoetanol 2% (v/v)). Após agitação em vortex, foram adicionados 5 mL de fenol tamponado (pH 8,0) e o material foi mantido em gelo por 10 minutos sendo, agitado em vortex a cada 2 minutos para maximizar o contato entre a solução aquosa e o fenol. Posteriormente, a amostra foi transferida para tubos de 15 mL e centrifugada a 6000 g a 4 °C por 15 minutos e a fração fenólica (superior) foi coletada e transferida para um novo tubo de 50 mL. As proteínas da fase fenólica foram precipitadas adicionando-se 20 mL acetato de amônio 0,1 M em metanol e incubadas por 12 horas a -20° C. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 6.000 g a 4 °C por 15 minutos. O precipitado recuperado foi lavado duas vezes em acetato de amônio 0,1 M em metanol, duas vezes em acetona 80%, uma vez em etanol 80% e uma vez em etanol 70% - 10 mL de cada solução. Ao pellet final foi adicionado 1 mL de etanol 70% para facilitar a transferência das alíquotas para tubos eppendorfs de 1,5 mL, que foram então

centrifugados e secos à temperatura ambiente. Depois de seco, o pellet foi solubilizado em 300 µl de tampão de solubilização (ureia 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% em água ultrapura). As proteínas presentes nas amostras foram solubilizadas com auxílio de aparelho ultrassom.

Quantificação de proteínas

A concentração proteica das amostras foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976) e foi utilizada a albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão. Foi utilizado o reagente de Bradford pronto para uso (Sigma-Aldrich) de acordo as instruções do fabricante.

Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

Focalização isoeétrica (IEF)

Para a realização da focalização isoeétrica, primeira dimensão da eletroforese, foram utilizadas tiras de 24 cm com intervalo linear de pH 3,0 a 10,0 (Immobiline DryStrip®). Em aparato de reidratação IPGBOX (GE Healthcare), foram aplicados a cada tira 450 µl de solução contendo 800 µg de proteínas, tampão IPG 2,5% e solução Destreak (GE Healthcare). As tiras foram reidratadas por 15 h a temperatura ambiente. Posteriormente, foram transferidas para o equipamento IPGphor III (GE Healthcare) para a focalização isoeétrica. A focalização foi realizada sob temperatura controlada de 20°C de acordo com as seguintes etapas: 1) 200 V x h em passo único por 1 hora; 2) 500 V x h em passo único de 500 volts; 3) 800 V x h em gradiente até 1000 volts; 4) 16500 V x h em gradiente até 10000 volts; 5) 27500 V x h em passo único de 10.000 volts. A amperagem máxima foi de 50 µA/ tira.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após a IEF, as tiras passaram por duas etapas de equilíbrio, sendo a primeira para redução e a segunda para alquilação das proteínas presentes nas tiras. Para tal, as tiras foram mantidas por 20 minutos, sob agitação constante, em 15 ml de solução de equilíbrio (Tris 75 mM pH 8,8, Ureia 6M, Glicerol 30%, SDS 2% e Azul de bromofenol 0,002%) com 1% de DTT e depois em 15ml de solução de equilíbrio com 2% de iodoacetamida. A segunda dimensão da eletroforese foi efetuada em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970), em gel de separação na concentração de 12,5% de poliacrilamida. As tiras equilibradas foram colocadas no topo do gel de poliacrilamida na presença de SDS e seladas com solução de agarose. Como marcadores de massa molecular foram utilizadas as proteínas: fosforilase b (97 kDa), soroalbumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidras carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). As condições de corrida foram: pré-corrída a 10 mA/gel por 60 minutos e corrida a 40 mA/gel até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel. Foi utilizado cuba DaltSix (GE Healthcare) e a temperatura foi mantida a 8°C por meio de refrigeração com circulador termostático. Terminada a corrida, os géis foram colocados em solução de fixação contendo ácido acético a 10% (v/v) e etanol a 40% (v/v) de um dia para o outro. Em seguida, foram corados por 48 horas com solução contendo sulfato de amônio 8% (m/v), ácido fosfórico 0,8% (v/v), Coomassie blue G-250 0,08% (v/v) e etanol 20% (v/v). Após essa etapa, os géis foram lavados com solução de ácido acético 1% (v/v) até a eliminação do corante excedente.

Captura das imagens e análise da expressão

As imagens dos géis foram digitalizadas usando o Image Scanner III (GE Healthcare) no modo de escaneamento transparente,

resolução de 300 dpi e filtro de cor vermelho. As imagens foram calibradas com o software Labscan (GE Healthcare). As análises comparativas das imagens digitais foram efetuadas utilizando o software ImageMaster 2D Platinum (GE-Healthcare). Através desse software foi realizada a detecção automática dos pontos proteicos (*spots*), seguida de correções manuais quando necessário. Foi estimado o número total de *spots*, os pontos isoelétricos e as massas moleculares. A comparação foi feita entre o controle não inoculado e o inoculado para cada tempo de inoculação, considerando três repetições biológicas para cada tratamento. Nas análises, foram considerados diferencialmente expressos *spots* que apresentaram uma variação de sobreposição de medidas (*Ratio*) acima de 1,0 e ANOVA com $p < 0,05$. Dentro de cada tratamento e para cada um dos *spots* diferencialmente expresso, foi calculado o valor médio da porcentagem de volume (% Vol) para o inoculado e para o não inoculado. A comparação destes valores indica a diferença de expressão (nível de expressão) destas proteínas entre o inoculado e seu controle não inoculado, no seu determinado tempo.

Tripsinização da amostra proteica

A tripsinização foi realizada segundo o protocolo de Shevchenko et al. (2006) com algumas modificações. Os *spots* correspondentes às proteínas diferencialmente expressas foram retirados dos géis com auxílio de ponteiras estéreis e colocados em micro tubos de 1,5 ml. Para remoção da coloração, fez-se duas lavagens com 200 μ L de solução de descoloração (metanol 50% (v/v) e ácido acético 5% (v/v)), sendo a primeira por quatro horas e a segunda de um dia para o outro, ambas à temperatura ambiente e sob agitação em Thermomixer digital Comfort (Eppendorf) a 300 rpm. A solução de descoloração foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com 200 μ L de acetonitrila por 10 min e depois

secos em microcentrífuga à vácuo por 15 min. As proteínas foram então, reduzidas com 50 μl de DTT 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min. Após esta etapa, as proteínas foram alquiladas com 50 μl de iodoacetamida 100 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min, à temperatura ambiente, na ausência de luz. Sequencialmente, os pedaços de gel foram desidratados em 200 μl de acetonitrila por 10 min a temperatura ambiente e depois reidratados em 200 μl de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 200 μl de acetonitrila por 10 min e os géis foram secos em microcentrífuga à vácuo por 15 min.

Para a etapa de digestão enzimática, os pedaços de géis foram reidratados por 10 minutos, no gelo, com 30 μl de solução contendo tripsina (20 ng/ μl) e bicarbonato de amônio 50 mM. Depois deste tempo, 10 μl de bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados às amostras, homogeneizados em vortex e centrifugados por 30 segundos. As amostras foram incubadas a 37 °C de um dia para o outro.

No dia seguinte, 40 μl de bicarbonato de amônio 50 mM foram adicionados e as amostras foram incubadas por 10 minutos, homogeneizando em vortex ocasionalmente. Os tubos foram centrifugados por 30 segundos, e o sobrenadante foi transferido para um micro tubo de 0,5 ml. Foram adicionados 30 μl de tampão de extração (acetonitrila 50% (v/v) e ácido fórmico 5% (v/v)) aos tubos contendo os pedaços de géis, que foram incubados por mais 10 minutos, homogeneizados em vortex ocasionalmente, centrifugados por 30 seg. e o sobrenadante adicionado ao sobrenadante coletado anteriormente. Essa etapa foi repetida por mais duas vezes. As amostras foram secas em microcentrífuga à vácuo e armazenadas

em -80 °C até o momento da análise. Para análise, 20 µl TFA 1% (v/v) foram adicionados às amostras para ressuspensão.

Espectrometria de massa

A identificação de proteínas foi realizada utilizando espectrômetro de massa disponibilizado pelo Núcleo de Biomoléculas (Nubiomol-UFV). Alíquota de 0,5 µl de cada amostra contendo os peptídeos foram aplicadas sobre uma placa de aço, juntamente com 0,5 µl da matriz DHB (2,5- ácido di-hidroxibenzoico). Após a cristalização foi iniciada a análise no espectrômetro. Os peptídeos foram ionizados pela técnica de MALDI.

Identificação de proteínas por espectrometria de massa

A identificação das proteínas foi realizada por meio dos dados de MS1 por PMF (Peptide Mass Fingerprint) confrontando-os com sequências obtidas das proteínas presentes nos bancos de dados NCBI/Viridiplantae, com auxílio do software Mascot versão 2.2.07 (Matrix Science, 2012). As pesquisas foram realizadas nos bancos de dado públicos do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis proteômicos das raízes de *Z. elegans* inoculadas e não inoculadas com *M. javanica*, nos dois tempos estudados, estão apresentados nas Figuras 1 e 2. Após 24 da inoculação das plantas com *M. javanica*, a média do número de *spots* detectados por gel foi de 824 e 867 nas plantas inoculadas e não inoculadas, respectivamente. Por sua vez, após 48 horas, as médias foram de 381 e 355, respectivamente nos géis referentes à plantas inoculadas e não inoculadas.

Ao todo, foram detectados 23 *spots* diferencialmente expressos nos dois tempos avaliados (Figura 3). Às 24 horas após a inoculação foram detectados sete *spots* diferenciais, destes, quatro *spots* com aumento de volume de expressão e três *spots* presentes somente nos géis referentes à inoculação com o nematoide. Às 48 horas após a inoculação foram detectados 16 *spots* diferencialmente expressos, sendo 12 presentes somente nos géis inoculados e quatro correspondentes ao aumento de expressão nas plantas inoculadas.

A identificação das proteínas foi realizada pelo auxílio do software Mascot que apresentou valores de escores significativamente acima do limite mínimo de confiabilidade (dados não mostrados). A proteína identificada, com o seu respectivo match ID (número de identificação da proteína disponibilizado pelo software ImageMaster III), tempo de inoculação, médias da % de volume de *spots* de e os níveis de expressão de cada proteína estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 4.

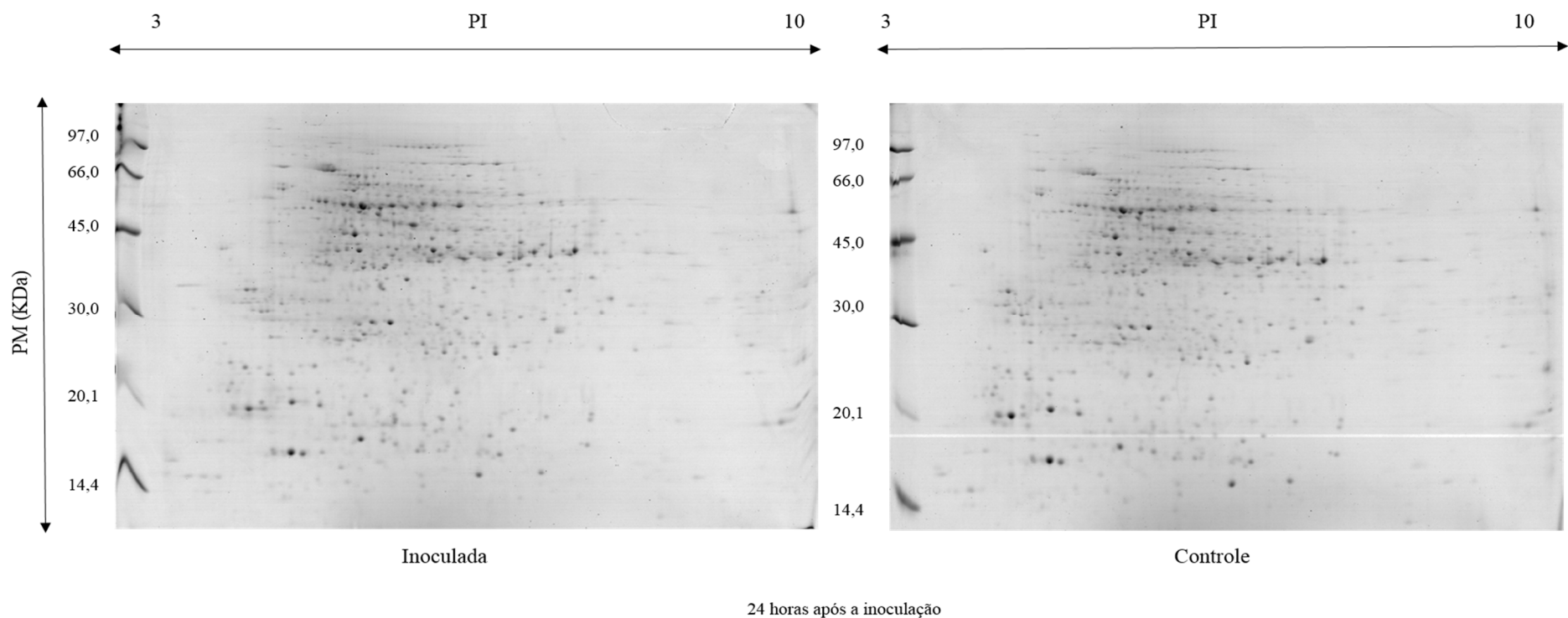
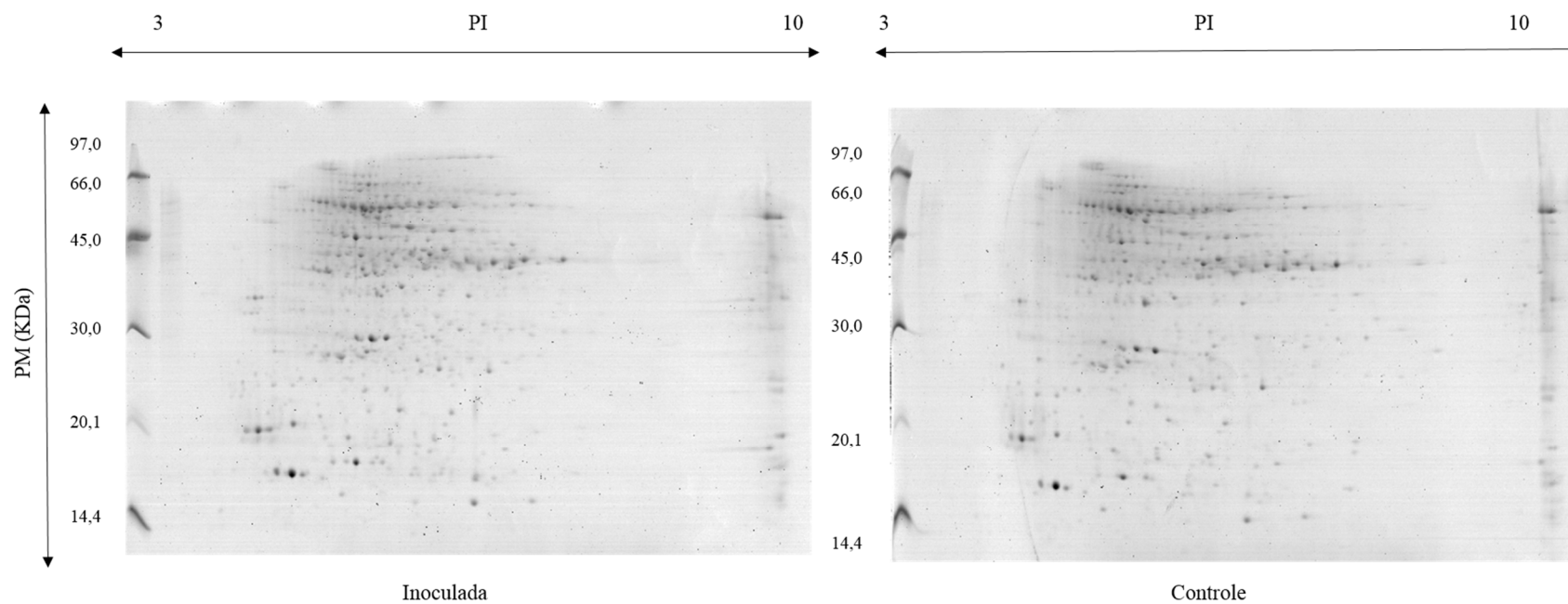


FIGURA 1: Perfil proteômico de raízes de *Zinnia elegans* inoculadas (inoculada) e não inoculadas (controle) com *Meloidogyne javanica*, 24 horas após a inoculação. Cerca de 800 µg de proteínas foram carregadas nas tiras IPG de 24 cm (pH 3-10) para análise bidimensional. Os géis foram visualizados com coomassie brilliant blue. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.



48 horas após a inoculação

FIGURA 2: Perfil proteômico de raízes de *Zinnia elegans* inoculadas (inoculada) e não inoculadas (controle) com *Meloidogyne javanica*, 48 horas após a inoculação. Cerca de 800 μg de proteínas foram carregadas nas tiras IPG de 24 cm (pH 3-10) para análise bidimensional. Os géis foram visualizados com Coomassie brilliant blue. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

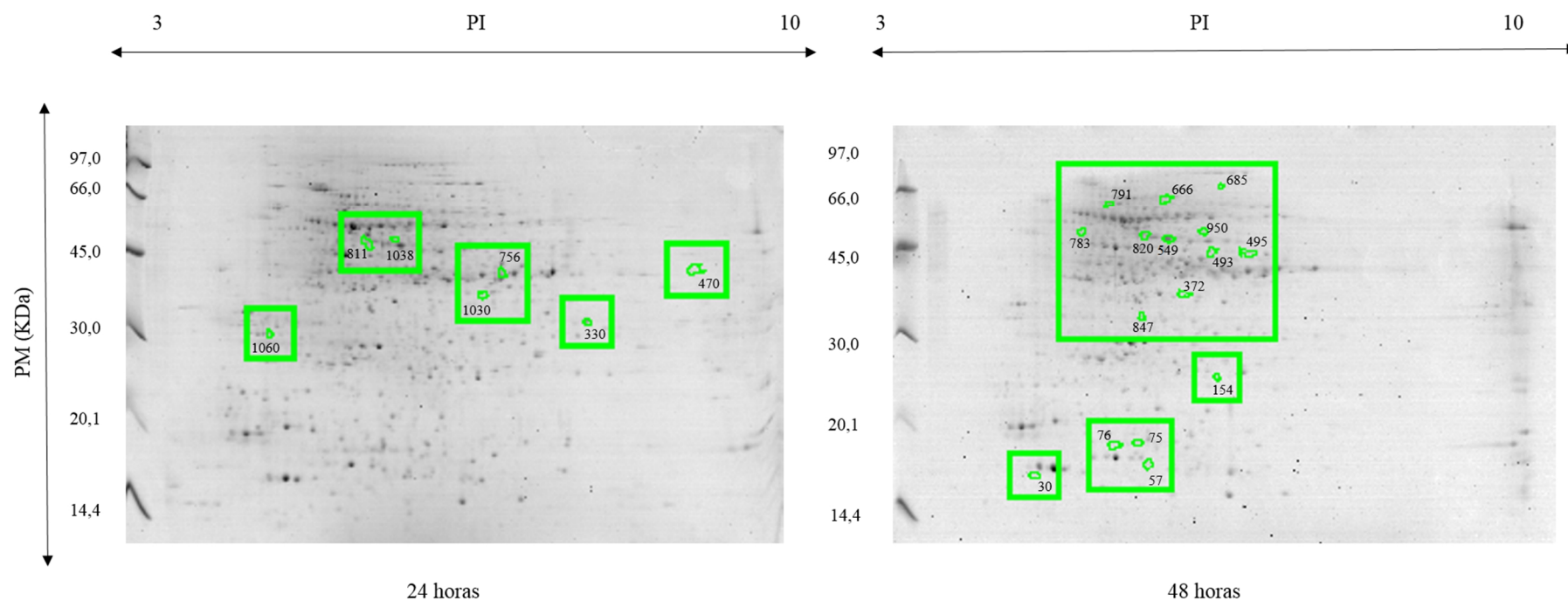


FIGURA 3: Evidenciação dos *spots* diferencialmente expressos em raízes de *Zinia elegans* às 24 e 48 horas após a inoculação com *Meloidogyne javanica*. Cerca de 800 µg de proteínas foram carregadas nas tiras IPG de 24 cm (pH 3-10) para análise bidimensional. Os géis foram visualizados com Coomassie brilliant blue. O padrão da massa molecular está indicado à esquerda dos géis.

Tabela 1: Dados sobre a proteína diferencialmente expressa em *Zinnia elegans* às 48 horas após a inoculação com *Meloidogyne javanica*.

Proteína	Metionina adenosiltransferase	
Match ID	549	
Espécie	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	
Acesso (GI)	217315773	
PI	5,8	
MW	48190	
Tempo	48 h	
% Volume	Inoculado	1,398
	Não Inoculado	0,602
Nível de expressão	+ 2,32	

* GenInfo Identifier (GI) - número de acesso ao GenBank – NCBI. O sinal (+) indica aumento na expressão da proteína em resposta à inoculação com *Meloidogyne javanica*. PI= Ponto isoelétrico; MW= Peso Molecular

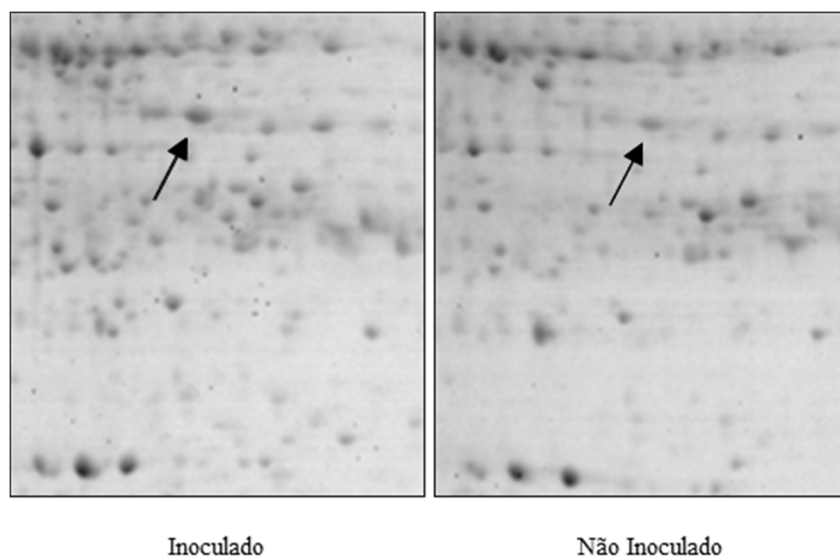


FIGURA 4: *Spot* correspondente à proteína Metionina adenosiltransferase, diferencialmente expressa às 48 horas após a inoculação de zínia com *Meloidogyne javanica*.

A enzima metionina adenosiltransferase (SAM) foi positivamente expressa às 48 horas após a inoculação de zínia com *M. javanica*. Depois do ATP, metionina adenosiltransferase é a maior provedora de energia para a célula e, em plantas, é usada como o principal doador de metil para inúmeras biomoléculas, incluindo produtos secundários, proteínas, ácidos nucleicos, açúcares e clorofila. O aumento de expressão da enzima metionina adenosiltransferase pode ser responsável pela paralização do desenvolvimento de *M. javanica* nas raízes de zínia. Acúmulo de metionina adenosiltransferase já foi observado em plantas tratadas com elicitador fúngico e inoculadas com bactéria e fungo fitopatogênicos, sugerindo que a resposta de defesa das plantas está associada com aumento de SAM e com a metilação de compostos celulares (KAWALLECK et al., 1992, EDWARDS, 1996, CURTO et al., 2006, MALDONADO-ALCONADA et al., 2011).

A metionina adenosiltransferase serve como precursor para a síntese de etileno, que é responsável pela regulação de muitos aspectos do ciclo de vida das plantas e são produzidos em níveis elevados quando a planta está sob estresse. Apesar de estar associado com a defesa de plantas contra a infecção por patógenos necrotróficos e injúrias de insetos, o etileno parece ser sinalizador de resposta de defesa também em interações com patógenos biotróficos (BARI & JONES, 2009). Assim como *M. javanica* neste estudo, *Plasmodiophora brassicae* não foi capaz de formar galhas em *A. thaliana* (KNAUST & LUDWIG-MÜLLER, 2012). Apesar de não ser o maior responsável pela defesa de *A. thaliana* contra *P. brassicae*, o etileno pode ser importante na defesa da planta, visto que vários mutantes deficientes na produção de etileno foram mais sensíveis à infecção pelo patógeno. *Plasmodiophora brassicae* induz a formação de galhas de forma semelhante à *Meloidogyne* spp., estimulando a produção de auxina e citocinina, o que resulta na hipertrofia e hiperplasia das células infectadas pelos patógenos (CAILLAUD et al., 2008; KAGEYAMA & ASANO, 2009). O etileno pode atuar de forma semelhante na resposta de defesa de *Z. elegans* à *M. javanica*, sendo que numa interação compatível genes para a biossíntese de etileno foram reprimidos nas células gigantes (BARCALA et al.,

2010). As plantas da família Asteraceae são ricas em alcalóides pirrolizidínicos, compostos secundários tóxicos a insetos herbívoros e também a nematoides, inibindo a motilidade e a eclosão de juvenis *in vitro* (THODEN & BOPPRÉ, 2010). Na rota de síntese dos alcalóides pirrolizidínicos pela SAM, estão as poliaminas, preferencialmente encontradas em tecidos em crescimento e sob condições de estresse (OBER & HARTMANN, 1999).

Algumas proteínas efetoras secretadas pelos anfídeos e glândulas esofagianas de *Meloidogyne* spp. estão envolvidas na degradação e na modificação da parede celular e são lançadas no apoplasto da planta hospedeira durante a migração intercelular e os estágios iniciais de sedentarismo (VIEIRA et al., 2011). As poliaminas vegetais, por serem fonte de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), podem participar também do restabelecimento da parede celular de zínica. Além de ser capaz de matar o patógeno diretamente, o H₂O₂ está envolvido na maturação celular e na lignificação e restabelecimento de paredes celulares danificadas durante a invasão de diversos patógenos (YODA et al., 2009; TAKAHASHI & KAKEHI, 2010; DUBREUIL et al., 2011).

Em conclusão, os resultados aqui apresentados demonstram que a metionina adenosiltransferase é predominantemente expressa no sistema radicular de *Z. elegans* nos estádios iniciais da infecção por *M. javanica*. A superexpressão da metionina adenosiltransferase pode estar envolvida na supressão do desenvolvimento de *M. javanica* nas raízes desta planta antagonista.

LITERATURA CITADA

- Barcala, M., García, A., Cabrera, J., Casson, S., Lindsey, K., Favery, B., Escobar, C. (2010). Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *The Plant Journal*. 61(4), 698–712. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04098.x
- Bari, R., & Jones, J. D. G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 473–88. doi:10.1007/s11103-008-9435-0

- Boneti, J. I. da S., & Ferraz, S. (1981). Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6, 553.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>
- Caillaud, M.-C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., de Almeida Engler, J., Favery, B. (2008). Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology*, 165(1), 104–13. doi:10.1016/j.jplph.2007.05.007
- Carter, C. T., Grieve, C. M., & Road, W. B. S. (2010). Growth and nutrition of two cultivars of *Zinnia elegans* under saline conditions. *HortScience*, 45(7), 1058–1063. Retrieved from http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/53102000/pdf_pubs/P2334.pdf
- Curto, M., Camafeita, E., Lopez, J. a, Maldonado, A. M., Rubiales, D., & Jorrín, J. V. (2006). A proteomic approach to study pea (*Pisum sativum*) responses to powdery mildew (*Erysiphe pisi*). *Proteomics*, 6 Suppl 1, S163–74. doi:10.1002/pmic.200500396
- Dubreuil, G., Deleury, E., Magliano, M., Jaouannet, M., Abad, P., & Rosso, M.-N. (2011). Peroxiredoxins from the plant parasitic root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, are required for successful development within the host. *International Journal for Parasitology*, 41(3-4), 385–96. doi:10.1016/j.ijpara.2010.10.008
- Edwards, R. (1996). S-adenosyl-l-methionine metabolism in alfalfa cell cultures following treatment with fungal elicitors. *Phytochemistry*, 43(6), 1163–1169. doi:10.1016/S0031-9422(96)00434-7
- Hussey, R. S., & Barker, K. . (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57, 1025–1028.
- Kageyama, K., & Asano, T. (2009). Life Cycle of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(3), 203–211. doi:10.1007/s00344-009-9101-z
- Kawalleck, P., Plesch, G., Hahlbrock, K., & Somssich, I. E. (1992). Induction by fungal elicitor of S-adenosyl-L-methionine synthetase and. *Plant Biology*, 89(May), 4713–4717. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC49153/>

- Knaust, A., & Ludwig-Müller, J. (2012). The ethylene signaling pathway is needed to restrict root gall growth in *Arabidopsis* after infection with the obligate biotrophic protist *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1), 9–21. doi:10.1007/s00344-012-9271-y
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. doi:10.1038/227680a0
- Maldonado-Alconada, A. M., Echevarría-Zomeño, S., Lindermayr, C., Redondo-López, I., Durner, J., & Jorrín-Novo, J. V. (2011). Proteomic analysis of *Arabidopsis* protein S-nitrosylation in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(4), 1493–1514. doi:10.1007/s11738-010-0688-2
- Ober, D., & Hartmann, T. (1999). Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 14777–82. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24724&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Oka, Y. (2010). Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments—A review. *Applied Soil Ecology*, 44(2), 101–115. doi:10.1016/j.apsoil.2009.11.003
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1(6), 2856–60. doi:10.1038/nprot.2006.468
- Silva, G. S., Ferraz, S., & Santos, J. M. dos. (1990). Histopatologia de raízes de *Crotalaria* parasitadas por *Meloidogyne javanica*. *Fitopatologia Brasileira*, 15(1), 46–48.
- Takahashi, T., & Kakehi, J.-I. (2010). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of Botany*, 105(1), 1–6. doi:10.1093/aob/mcp259
- Thoden, T., & Boppré, M. (2010). Plants producing pyrrolizidine alkaloids: sustainable tools for nematode management? *Nematology*, 12(1), 1–24. doi:10.1163/138855409X12549869072248
- Tomczak, A., Koropacka, K., Smant, G., Goverse, A., & Bakker, E. (n.d.). Resistant Plant Responses. doi:10.1007/7089
- Vieira, P., Danchin, E. G. J., Neveu, C., Crozat, C., Jaubert, S., Hussey, R. S., Rosso, M.-N. (2011). The plant apoplasm is an important recipient

compartment for nematode secreted proteins. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 1241–53. doi:10.1093/jxb/erq352

Yassin, M. Y., & Ismail, A. E. (1994). Effect of *Zinnia elegans* as a mix-crop along with tomato against *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*. *Anzeiger Für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz*, 67(3), 41–43. doi:10.1007/BF01906425

Yoda, H., Fujimura, K., Takahashi, H., Munemura, I., Uchimiya, H., & Sano, H. (2009). Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host- and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. *Plant Molecular Biology*, 70(1-2), 103–12. doi:10.1007/s11103-009-9459-0

CONCLUSÕES GERAIS

- O uso de hortelã-pimenta, zínia e crotalária na rotação de culturas é eficiente para reduzir a população de *Meloidogyne javanica* no solo;
- O desenvolvimento de *M. javanica* é paralisado no segundo estágio dentro das raízes de crotalária e zínia;
- As técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas utilizadas são eficazes para a resolução e identificação das proteínas diferencialmente expressas nas raízes de crotalária e zínia;
- A resposta de defesa de crotalária à *M. javanica* resulta em aumento de expressão de quatro proteínas identificadas: V-type ATPase, ATP synthase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase e uma Heat Shock Protein. Estas proteínas estão relacionadas com o restabelecimento da homeostase sob condições de estresse biótico;
- A inoculação de zínia com *M. javanica* aumenta a expressão da proteína S-adenosil-L-metionina, que pode estar ligada a resposta de defesa da planta através da síntese de etileno, peróxido de hidrogênio e alcaloides pirrolizidínicos.