

ANÁLISE DE PROTEÍNAS E DA ATIVIDADE FOSFOHIDROLÍTICA EM GALHA ENTOMÓGENA DE UMA ESPÉCIE DE LEGUMINOSAE

Michelle de Lima Detoni¹; Geraldo Luiz Gonçalves Soares², Naiara Miranda Rust³; Priscila de Faria Pinto P⁴, Rosy dos Santos Isaias⁵; Eveline Gomes Vasconcelos⁶

¹ Mestranda em Ciências Biológicas/Genética e Biotecnologia/ICB, UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil – michelledetoni@yahoo.com.br

² Doutorado em Ciências/Química de Produtos Naturais, NPPN/UFRJ; Depto de Botânica/IB, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil – geraldo.soares@ufrgs.br

³ Graduada em Ciências Biológicas, Depto de Bioquímica/ICB, UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil – naiaramrust@yahoo.com.br

⁴ Mestre em Biologia Celular e Molecular – priscila@cpqrr.fiocruz.br

⁵ Doutorado em Botânica, IB/USP; Depto de Botânica/ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil – rosy@icb.ufmg.br

⁶ Doutorado em Bioquímica, Depto de Bioquímica/ICB, UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil – eveline.vasconcelos@ufff.edu.br

Abstract: PROTEINS AND PHOSPHOHYDROLASE ACTIVITY ANALYSIS IN ENTOMOGENOUS GALLS OF A LEGUME SPECIES. A typical gall on *Calliandra brevipes* stem surface is a small protuberance of approximately 15 mm that grows in response to infestation of the tree by insects, representing an important type of plant-insect interaction. The fully formed gall contains several tissues types that are organized in layers. A layer of nutritive cells lining the central chamber provides a rich source of nutritive metabolites essentials to the development of the insects. The amount of proteins was quantified in preparations of both normal stem and gall tissues from *C. brevipes*. The amount of proteins in gall tissues was approximately 4 fold higher than that found in normal stem. The phosphohydrolase activities were also analyzed and compared. The two preparations degraded different substrates, but the enzymatic activities from gall tissues were significantly higher when compared to those observed in normal stem. ATPase activity from gall preparation was approximately 25% inhibited by addition of sodium orthovanadate, suggesting the involvement of P-type ATPases. In addition, ATPase activity from gall tissue was 31% and 75% inhibited by EDTA and EGTA, respectively, revealing that this hydrolytic activity was dependent of calcium. We hypothesize that the exacerbation of amount of proteins in gall tissues from *C. brevipes*, and particularly the elevation of phosphohydrolase activities, increase the mechanisms of protection and participate in metabolic processes that allow the survival of the insect.

Keywords: Leguminosae, stem, gall, protein, P-type ATPase.

Resumo: Uma galha caulinar típica de *Calliandra brevipes* é caracterizada por uma estrutura globosa de aproximadamente 15 mm que se desenvolve em resposta a infestação por pequenas vespas, representando uma interação planta-inseto. A galha totalmente formada contém vários tipos de tecidos que são organizados em camadas. Uma camada de células nutritivas delinea a câmara central provendo uma rica origem de metabólitos essenciais ao desenvolvimento dos insetos. A quantidade de proteínas foi quantificada em preparações de tecidos de caule normal e galhado de *C. brevipes*. A quantidade de proteínas no tecido galhado foi aproximadamente 4 vezes maior do que aquela encontrada em caule normal. As atividades fosfohidrolíticas foram também analisadas e comparadas. As duas preparações degradaram diferentes substratos, mas

as atividades enzimáticas de tecido galhado foram significativamente maiores quando comparadas àquelas observadas em caule normal. Atividade ATPásica da preparação de galha foi aproximadamente 25% inibida pela adição de ortovanadato de sódio, sugerindo o envolvimento de ATPases do tipo P. Adicionalmente, a atividade ATPásica de tecido galhado foi 31% e 75% inibida por EDTA e EGTA, respectivamente, revelando que esta atividade hidrolítica foi dependente de cálcio. Nós hipotetizamos que a exacerbação da quantidade de proteínas em tecido galhado de *C. brevipes*, e particularmente a elevação de atividades fosfohidrolíticas, aumentam os mecanismos de proteção e participam em processos metabólicos que permitem a sobrevivência do inseto.

Palavras-chave: *Leguminosae*, caule, galha, proteína, ATPase do tipo P.

Introdução

As galhas entomógenas são crescimentos anormais caracterizados por hipertrofia e/ou hiperplasia celulares resultantes do parasitismo especializado, no qual a ação de um inseto galhador provoca alterações morfo-anatômicas e metabólicas na planta hospedeira, provendo alimento e abrigo para sua prole. Em geral, o galhador redireciona o metabolismo do vegetal em seu benefício, alterando o conteúdo de lipídios, proteínas, carboidratos, fenólicos e carotenóides, seja pelo aumento das taxas de transcrição e tradução ou pelo dreno ativo de metabólitos (SHÖNRONGGE, 2000, p.215-222; SOARES *et al.*, 2000, p.103-116). De modo geral, essas mudanças metabólicas podem estar relacionadas com alterações na atividade de enzimas fosfohidrolíticas, devido à importância fisiológica dos nucleotídeos no metabolismo energético e nos processos de sinalização (KIM *et al.*, 2006, p.984-992).

Calliandra brevipes Benth (FABACEAE: MIMOSOIDAE) (Figura 1) é um arbusto lenhoso ramificado, de até 2 metros de altura, que apresenta inflorescências capituliformes, destacando-se estames longos e coloridos (cor de rosa e brancos). Este espécime tem apresentado dois tipos de galhas entomógenas, globosa e fusiforme, induzidas pela oviposição de diferentes espécies de himenópteros (CARVALHO, 2005, p.1-65). Assim, as

galhas de *Calliandra brevipes* representam modelos úteis para a elucidação das complexas reações bioquímicas e estruturais que o tecido vegetal apresenta em decorrência de estímulo e controle biótico externos. O propósito deste trabalho foi avaliar o conteúdo protéico e a atividade fosfohidrolítica em galha entomógena e caule sadio.

2 Material e métodos

2.1- Obtenção de amostras de *Calliandra brevipes* e análise morfológica – Coletou-se amostras de tecido sadio e galhado de *Calliandra brevipes* (registrada no Herbário Professor Leopoldo Krieger, CESJ 31454), presentes no *Campus* da Universidade Federal de Juiz de Fora. Em seguida, analisou-se macroscopicamente a morfologia das galhas, fotografando-as para registro e arquivamento.

2.2- Preparação do homogeneizado de tecido vegetal caulinar saudável e de galhas – Antes de ser processado, o material coletado foi lavado com água destilada. A galha globosa foi então dissecada para a remoção das larvas, pulpas e insetos. As amostras foram pesadas, maceradas com nitrogênio líquido utilizando-se de gral e pistilo, e homogeneizadas em 5 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 8% de sacarose com leupeptina (0,5 µg/l), pepstatina (0,07 µg/l), inibidor de

tripsina (50 μ g/l) e PMSF (2 μ g/l), com subsequente centrifugação a 2.500 x g. O sobrenadante obtido foi então estocado a -20°C até o momento do uso.

2.3- Avaliação do conteúdo protéico – O conteúdo protéico foi mensurado através do método de Bradford (1976, p.248), e expressos em μ g de proteínas/g de amostra total.

2.4- Medida de atividade fosfohidrolítica – Para análise da atividade fosfohidrolítica usou-se um meio de reação padrão contendo succinato de potássio 50 mM, pH 6,5, CaCl₂ 5 mM e 0,01 mg de proteína/ml. O ensaio hidrolítico foi iniciado pela adição de 4 mM do substrato e incubado por 60 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de HCl 0,1 N e a quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Taussky & Schorr (1953, p.675). Os ensaios foram também realizados na presença de ortovanadato de sódio (100 μ M), adicionado ao meio de reação padrão. Para os ensaios em que os efeitos do EDTA ou EGTA foram avaliados, 1 mM destes compostos foram adicionados a um meio de reação contendo succinato de potássio 50 mM, pH 6,5, e 0,01 mg de proteína/ml, na ausência de adição de íons.

3- Resultados e discussão

Morfologicamente, a galha globosa de *C. brevipes* apresenta-se sobre o caule como um pequeno intumescimento de aproximadamente 15 mm de diâmetro (Fig. 1, em destaque). O eixo maior da galha apresenta-se perpendicular ou oblíquo ao eixo caulinar. Sua coloração na fase inicial é verde. Ao emergir, o inseto rompe a parede da galha, onde se observa um orifício de saída, e a galha senesce tornando-se marrom. Segundo Carvalho (2005, p.1-65), a galha globosa de *C. brevipes* é constituída de tecidos organizados em camadas, estando a câmara central delimitada por células ricas em nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento do inseto. Somente galhas maduras (Fig. 1) foram usadas neste trabalho.

O conteúdo protéico das preparações de tecido caulinar saudável e galha globosa foi mensurado (Fig. 2). É interessante observar que o tecido galhado apresenta um conteúdo protéico aproximadamente 4 vezes maior do que aquele encontrado no tecido caulinar saudável (Fig. 2), sugerindo que a expressão protéica na galha é estimulada na presença do galhador. A exacerbação do conteúdo protéico em galhas globosas caulinares de *C. brevipes* corrobora com os estudos efetuados em galhas de outras espécies de plantas (SCHÖNROGGE *et al.*, 2000, p.215-222).



Figura 1 - Calliandra brevipes.

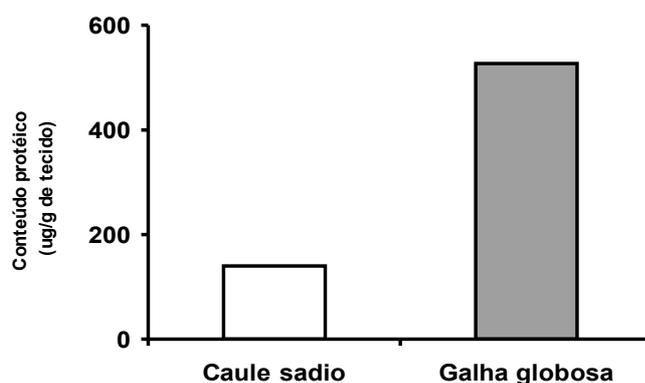


Fig. 2 – Conteúdo protéico em amostras de caule sadio e galha globosa. Os experimentos foram feitos em triplicatas, e a variação entre

Para a avaliação de atividade fosfohidrolítica nas preparações de tecido caulinar saudável (TCS) e de galha globosa (GG) foram usados os substratos ATP, ADP e AMP (Fig. 3). Como observado, as duas

preparações hidrolisam estes nucleotídeos, estando esta atividade fosfohidrolítica significativamente aumentada no tecido galhado, quando comparada ao tecido sadio (Fig. 3).

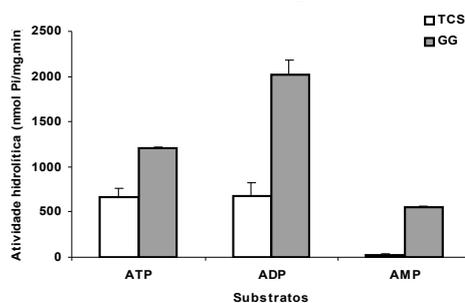


Figura 3 – Análise comparativa da atividade fosfohidrolítica de preparação de tecido caulinar
Principia

Para avaliar a contribuição de ATPases do tipo P na preparação de galha globosa os ensaios foram feitos na presença de ortovanadato de sódio (100 μ M), um clássico inibidor desta classe de proteínas em mamíferos e plantas (EVANS & WILLIAMS, 1998, p.1-25). Como pode ser observado na Figura 4, este composto foi capaz de inibir aproximadamente 25% da atividade ATPásica encontrada nesta preparação.

A atividade fosfohidrolítica de diversas enzimas é estimulada por íons bivalentes, e esta relação foi investigada pelo uso de EDTA (1 mM) e EGTA (1 mM), que

foram adicionados ao meio de reação, como descrito em Material e Métodos (Fig. 4). EDTA quelata especificamente cátions bivalentes tais como Mg^{2+} , Mn^{2+} e Ca^{2+} , tendo por este último uma menor afinidade quando comparada ao Mg^{2+} e Mn^{2+} . Por outro lado, o EGTA quelata preferencialmente Ca^{2+} , sendo útil no estudo de processos dependentes deste íon. A Figura 4 mostra que o EDTA inibiu 31% da atividade enzimática, enquanto o EGTA inibiu 73%. Esta alta inibição por EGTA sugere que a maior parte da atividade ATPásica encontrada no tecido galhado é dependente de cálcio.

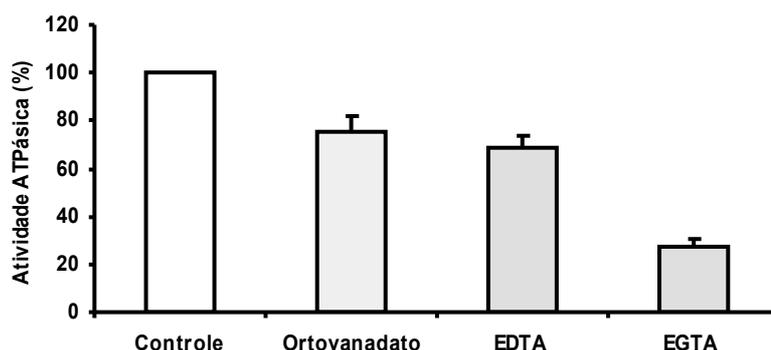


Figura 4 – Efeitos do ortovanadato de sódio (100 μ M), EDTA (1 mM) ou EGTA (1 mM) sobre a atividade fosfohidrolítica da preparação de galha globosa.

Os ensaios de inibição com o ortovanadato de sódio e os de depleção de íons bivalentes sugerem que ATPases do tipo P, dependentes de cálcio, podem estar contribuindo para a atividade fosfohidrolítica encontrada no tecido galhado, uma família de proteínas que já foi descrita em outros tecidos vegetais (EVANS & WILLIAMS,

1998, p.1-25). Outras enzimas, tais como ATPase vacuolar, fosfatase, nucleotidase, pirofosfatase, também já detectadas em tecidos vegetais saudáveis, podem estar presentes em galha globosa de *C. brevipes* contribuindo para a exacerbação da atividade fosfohidrolítica observada.

4- Conclusões

Neste trabalho foram demonstrados o conteúdo protéico e atividade fosfohidrolítica dependente de cálcio em

galha globosa caulinar, que se mostraram significativamente maiores quando comparados aos encontrados em caule sadio

de *C. brevipes*. É possível que a exacerbação destes constituintes metabólicos contribua para o mecanismo de formação de galhas em resposta ao ataque de insetos e/ou para o suprimento de nutrientes para as larvas do inseto galhador, corroborando com a hipótese nutritiva para a natureza adaptativa

da galha (PRICE *et al.*, 1987, p.15-24; BRONNER, 1992. p.118-140). Assim, o estudo qualitativo de proteínas em galhas, particularmente das fosfohidrolases, poderá ser uma ferramenta importante no entendimento da relação planta-inseto.

5- Referências

- BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72, p.248-254. 1976.
- BRONNER, R. (1992) The role of nutritive cells in the nutrition of cynipids and cecidomyiidae. In *Biology of Insect Induced Galls* (eds. J.D. Shorthouse & O. Rohfritsch), p. 118-140. Oxford University Press, New York.
- EVANS, E.D. & WILLIAMS, L.E. P-type calcium ATPases in higher plants – biochemical, molecular and functional properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376, p. 1-25, 1998.
- KIM S.Y.; SIVAGURU, M.; STACEY, G. Extracellular ATP in Plants. Visualization, Localization, and Analysis of Physiological Significance in Growth and Signaling. *Plant Physiology*, 142, p.984-992, 2006.
- CARVALHO, F.M. Galhas de Hymenoptera (tanaostigmatide, *Tanaostgmodes* sp.) em *Calliandra brevipes* Benth (Fabaceae: Mimosoidae). 2005. 65F. Dissertação (Mestrado em Comportamento Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2005.
- PRICE, P.W.; FERNANDES, G.W. & WARING, G.L. Adaptative nature of insect galls. *Environmental Entomology*, 16, p.15-24, 1987.
- SCHÖNRUDGE K., HARPER L.J. & LICHTENSTEIN C.P. The protein content of tissues in cynipid galls (Hymenoptera: Cynipidae): similarities between cynipid galls and seeds. *Plant, Cell and Environment*, 23, p.215-222, 2000.
- SOARES, G.L.G.; ISAIAS, R.M.S.; GONÇALVES, S.J.M.R. & CHRISTIANO, J.C.S. Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea, Brachyscelidae) em folhas de *Rollinia laurifolia* (Annonaceae). *Revista Brasileira de Zoociências*, 2, p.103-116, 2000.
- TAUSSKY, H.M., SHORR, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 202, p.675-685, 1953.