

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE INIBIDORES DE POLIGALACTURONASES (PGIPS) EM RESPOSTA AOS ESTRESSES BIÓTICO E ABIÓTICO EM PLANTAS DE FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)

MARÍLIA BARROS OLIVEIRA¹, MURILLO LOBO JUNIOR², SILVANA PETROFEZA¹

INTRODUÇÃO: O mofo branco, causado pelo ascomiceto *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary é um dos principais responsáveis por perdas na cultura de feijão brasileira. Este patógeno sobrevive no solo por vários anos na forma de escleródios e ataca mais de 400 espécies de plantas, sendo a maioria plantas de grande importância econômica (BOLAND; HALL, 1994). Durante a patogênese de *S. sclerotiorum* dois principais fatores - secreção de ácido oxálico e de enzimas hidrolíticas - agem em concerto na maceração de tecidos vegetais e geração de necrose. A degradação de componentes da parede celular da planta está ligada à produção de uma ampla e complexa variedade de enzimas hidrolíticas, como celulases, hemicelulases, poligalacturonases, pectinases e proteases que facilitam a penetração, colonização e maceração (BOLTON *et al.*, 2006). Um maior interesse é dado às poligalacturonases (PG), em especial as endopoligalacturonases (endo-PG) que são as primeiras enzimas secretadas durante o processo de infecção, elas atuam clivando as ligações $\alpha(1-4)$ entre resíduos de ácido D-galacturônico, causando a separação e maceração do tecido do hospedeiro. Para contrapor à atividade das PGs do fungo, muitas plantas produzem proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs) que são glicoproteínas localizadas na parede celular da planta. PGIPs interagem especificamente com PGs sendo proposto que a inibição da atividade de PGs pode, não somente, prolongar o acúmulo de oligogalacturonídeos e acentuar a resposta de defesa, mas também impedir a invasão do patógeno por inativação das PGs (FEDERICI *et al.*, 2006). Em *P. vulgaris*, os quatro genes que codificam para as proteínas inibidoras de poligalacturonases são agrupados em dois pares, *PvPgip1-PvPgip2* e *PvPgip3-PvPgip4*, provavelmente originados por eventos independentes de duplicação (D'OVIDIO, *et al.*, 2004). Os genes *pgip* são diferentes não somente em termos de reconhecimento específico por seus produtos, mas também porque são diferencialmente regulados (FERRARI, *et al.*, 2003). Estudos em *Brassica napus* mostraram que os genes *pgip* são diferencialmente regulados em resposta a variações de estresse biótico e abiótico (LI *et al.*, 2003). Assim, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar a expressão de genes inibidores de poligalacturonases (*PvPgip*) em plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em resposta aos estresses biótico e abiótico.

MATERIAL E MÉTODOS: Sementes de feijão (*P. vulgaris* L.) cultivar Pérola (BRS) foram semeadas em vasos com 5L de solo adubado com NPK (1g/kg de solo) sob condições de luz natural, temperatura de até 20 ± 3 °C e irrigação diária em casa de vegetação localizada na Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás, Goiás. O isolado de *S. sclerotiorum* previamente caracterizado no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos, ICB/UFG, foi crescido em meio BDA, 20 °C por 5 dias e utilizado para o inóculo de plântulas de feijão (*P. vulgaris* L.), com 30 dias após a emergência. O processo de invasão foi estabelecido nas seguintes condições: a) estresse biótico - inóculo pelo método do palito e inóculo com *plugs* de BDA colonizados com o fungo em hastes da planta; b) estresse abiótico – inóculo de palito sem fungo no caule da planta (injúria) e inóculo com *plugs* de BDA de cultura fúngica em hastes das plantas submetidas ao tratamento metil jasmonato (MeJA), indutor de resistência, nas concentrações de 10 e 50 μ M. As amostras de tecidos foram coletadas da parte necrosada de cada lesão com margem de 2 cm nos períodos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação (hpi), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para extração de RNA total e proteína intracelular. O RNA total foi extraído pelo método do TRIZOL Reagente (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) conforme instruções do fabricante. Para remover a contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) seguida de

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

²Embrapa Arroz e Feijão, GO-462 km 12, C.P. 179, 75375-000, Santo Antônio, Goiás, Brasil.

inativação da enzima (EDTA 2,5 mM, 65 °C / 10 min) e precipitação com etanol. A primeira fita de cDNA foi obtida a partir de 2µg de RNA tratado com DNase utilizando a enzima Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) conforme instrução do fabricante. A análise transcricional dos genes PGIPs (*PvPgip1*, *PvPgip2*, *PvPgip3* e *PvPgip4*) da planta foi realizada por RT-qPCR em tempo real (7900HT Sequence Detection System ABI PRISM instrument - Applied Biosystems, USA). Foram utilizados *primers* dos genes constitutivos (rDNA 28S e actina) como controle do experimento. A atividade enzimática de PG foi realizada a partir da extração de proteína intracelular, e determinada através da quantificação dos grupos redutores liberados da solução de pectina, de acordo com o método do ácido dinitrosalicílico – DNS (Miller, 1959). A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo Protein Assay kit (Quant-iT –Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO: O estresse biótico causado pela infecção do fungo *S. sclerotiorum* pelo método do palito estimulou a expressão dos quatro genes *Pvpgip1-4*. *Pvpgip1* foi induzido 6 horas após a infecção e persistiu até 72 hpi. A transcrição do gene *Pvpgip2* foi detectada 6 horas após o inóculo e aumentou progressivamente atingindo um pico com 72 horas. A expressão do gene *Pvpgip3* também foi ativada com 6 horas após o inóculo e atingiu valor máximo com 48 horas. *Pvpgip4* mostrou altos níveis de transcritos nas horas iniciais (6-12 hpi) após o inóculo, e mesmo apresentado redução de expressão foi mantida até o fim do processo infectivo. Entretanto, em plantas inoculadas com *plug* de BDA com cultura de *S. sclerotiorum*, não houve expressão de *Pvpgip1*; a expressão do gene *Pvpgip2* foi detectada somente nas primeiras 6 horas de infecção; *Pvpgip3* foi expresso com 24 horas e *Pvpgip4* foi induzido nos estágios finais de infecção (48-72 hpi). Estes resultados demonstram que na infecção pelo método do palito dois fatores de estresse, injúria e infecção pelo fungo, juntos podem ser responsáveis pela maior ativação das respostas de defesa. O estresse abiótico induziu a expressão dos genes *Pvpgip*: *Pvpgip1* ocorreu nos estágios iniciais (6-12 hpi), para todas as concentrações testadas. Para os genes *Pvpgip2* e *Pvpgip3* a indução foi tardia (48-72 hpi). A indução do gene *Pvpgip4* foi observada em todo o período nas plantas tratadas com 10µM de MeJA. O padrão de expressão produzido em plantas tratadas com o indutor químico demonstrou que estes genes respondem diferente ao mesmo tratamento. Esta diferença na expressão de genes *Pvpgip* em resposta ao mesmo tratamento também foi verificada em outros trabalhos. Em *Arabidopsis* foi demonstrado que a expressão de *Atpgip1* não foi alterada por MeJA, enquanto que a de *Atpgip2* foi mediada por este composto (Ferrari et al., 2003). Em plantas que receberam injúria, altos níveis de expressão dos genes *Pvpgip1-3* foram observados com 12 horas, enquanto que o gene *Pvpgip4* mostrou altos níveis de expressão em todo o período analisado. As diferenças encontradas no padrão de expressão dos genes *Pvpgip* podem ser explicadas pela origem destes genes. Segundo Oviedo e colaboradores (2004a), a duplicação e diversificação dos genes *Pvpgip* resultou não somente na diversificação de sua função bioquímica, mas também na diversificação de sua regulação. Assim, a expressão dos genes *pgip* tem regulação diferente durante o desenvolvimento do patógeno e em resposta a diferentes estímulos de estresse. *Pvpgip3* responde a OGs, mas não a glucanos, ácido salicílico ou injúria, a expressão de *Pvpgip4* não é alterada por nenhum destes tratamentos. *Pvpgip1* responde somente a injúria, enquanto *Pvpgip2*, que codifica o mais eficiente inibidor de PGs de fungo, é up-regulado por todos estes estímulos de estresse (D’OVIDIO et al., 2004a). Similarmente, em soja (*Glicine Max*), *Gmpgip1* e *Gmpgip3* são up-regulados seguido de injúria e infecção com *S. sclerotiorum*, enquanto que *Gmpgip2* não é induzido por injúria e é somente tardiamente up-regulado seguido de ataque do mesmo patógeno. (D’OVIDIO, 2002). Esta capacidade de ativar diferentes genes, neste caso, *pgip* em resposta a diferentes sinais de estresse, parece ser uma característica comum das plantas, e pode ter significado adaptativo já que garante a ativação de pelo menos um gene em diferentes situações de estresse, evitando a ativação de outras vias de defesa. O ensaio de atividade enzimática foi realizado para determinar se há diferença na cinética enzimática de PGs entre os tratamentos. O pico de atividade ocorreu a partir de 24h para as plantas tratadas com MeJA e com 48 horas para as plantas que não receberam o tratamento. O teste de inibição foi realizado para confirmar a capacidade

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

²Embrapa Arroz e Feijão, GO-462 km 12, C.P. 179, 75375-000, Santo Antônio, Goiás, Brasil.

inibitória das PGIPs sobre as PGs. A maior percentagem de inibição foi verificada nos períodos iniciais do processo de infecção para todos os tratamentos, 50% de inibição das PGs foi encontrado em extratos de planta tratadas com 50 μ M – 6 horas após o inóculo. Estes dados sugerem que a inibição das PG inicia durante os estágios iniciais do processo de patogênese.

CONCLUSÕES: Nossos resultados demonstraram que os genes *Pvpgip* são expressos diferencialmente em resposta aos fatores bióticos como infecção por *S. sclerotiorum* e abióticos como injúria mecânica e tratamento por metil jasmonato. Isso sugere que as plantas possuem diferentes mecanismos de respostas de defesa, e que um único fator de estresse pode ativar diferentes vias, resultando em vários tipos de respostas.

AGRADECIMENTOS: CNPq, FAPEG e CAPES.

REFERÊNCIAS

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Plant Pathology**, 16 (2): 93-108. 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Mol Plant Pathol**, 1:1-6. 2006.

D'OVIDIO, R.; RAYOLA, A.; CAPODICASA, C.; DEVOTO, A.; PONTIGGIA, D.; ROBERTI, S.; GALETTI, R.; CONTI, E.; O'SULIVAN, D.; DE LORENZO, G. Characterization of the complex locus of bean encoding Polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects. **Plant Physiol**. 135:2424-2435. 2004a.

D'OVIDIO, R.; ROBERTI, S.; MELARAGNI, M.; CAPODICASA, C.; SELLA, L.; FAVARON, F. Characterization of two closely linked soybean P_{gip} genes and transcript regulation following pathogen infection and wounding. **Plant Protection Science**, 38: 480-482. 2002.

FEDERICI, L.; DI MATEU, A.; FERNANDEZ-RECIO J.; TSERNOGLOU D.; CERVONE, F. Polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity. **Trends Plant Sci**, 11:65-70.

FERRARI, S.; VAIRO, D.; AUSUBEL, F. M.; CERVONE, F.; DE LORENZO, G. Tandemly duplicated arabidopsis genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinally by different signal transduction pathways in response to fungal infection. **The Plant Cell**, 15: 93-106.2003.

KASZA, Z., VAGVOLGYI, C., FÉVRE, M., COTTON, P. (2004). Molecular characterization and in planta detection of *Sclerotinia sclerotiorum* endopolygalacturonase genes. **Current Microbiology**, 48: 208-213. 2006.

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

²Embrapa Arroz e Feijão, GO-462 km 12, C.P. 179, 75375-000, Santo Antônio, Goiás, Brasil.

LI, R.; RIMMER, R.; YU, M.; SHARPE, A. G.; SÉGUIN-SWARTZ, G.; LYDIATE, D.; HEGEDUS, D. D. Two *Brassica napus* polygalacturonase inhibitory protein genes are expressed at different levels in response to biotic and abiotic stresses. **Planta**, 217: 299-308. 2003.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31:426-428. 1956.

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

²Embrapa Arroz e Feijão, GO-462 km 12, C.P. 179, 75375-000, Santo Antônio, Goiás, Brasil.