

Avaliação funcional de proteínas candidatas a efetores de *Phakopsora pachyrhizi* por meio da análise de espécies reativas a oxigênio (ROS) e deposição de calose

UTIYAMA, A. S.¹; ABE, V. Y.²; DARBEN, L. M.²; CARVALHO, K.²; CARVALHO, M. C. C. G. de³; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.⁴

¹Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, asutiyama@hotmail.com; ²Estagiário, Embrapa Soja, Laboratório de Biotecnologia Vegetal; ³Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, PR; ⁴Pesquisadora, Embrapa Soja.

Introdução

A ferrugem-asiática da soja (FAS) é uma doença causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi*. Ela destaca-se como a principal ameaça para a produção da cultura da soja no Brasil, pois em casos severos da doença, a perda da produção pode atingir até 90%. Além disso, os esporos de *P. pachyrhizi* são disseminados pelo vento, podendo atingir todas as regiões produtoras rapidamente, causando enormes prejuízos para a cultura e economia do país (Reis et al., 2006; Pioneer Sementes, 2016).

Para evitar que a ferrugem-asiática da soja atinja elevados níveis de severidade, vários métodos de controle podem ser utilizados pelo produtor, sendo o controle químico o mais utilizado. No entanto, a elevada variabilidade genética do patógeno, associada à forte pressão seletiva pelo elevado uso de fungicidas, tem proporcionado a rápida seleção de indivíduos resistentes, dificultando desta forma o manejo por parte dos agricultores. Por isso a associação de outras estratégias, como o vazio sanitário, a implantação de cultivares precoces, a semeadura no período indicado para cada região e o monitoramento frequente da lavoura são importantes para o controle. Adicionalmente, a utilização de cultivares de soja resistentes ou tolerantes à FAS, contendo os genes de resistência a *P. pachyrhizi* dominantes *Rpp* (*Rpp1*, *Rpp2*, *Rpp3*, *Rpp4*, *Rpp5*, *Rpp6* e *Rpp7*) (Bromfield; Hartwig, 1980; Hartwig, 1986; Garcia et al., 2008; Silva et al., 2008; Hyten et al., 2009; Li et al., 2012, Childs et al., 2018), constitui importante alternativa, auxiliando no manejo da cultura e redução nos custos de produção e no impacto ambiental devido ao uso indiscriminado de fungicidas (Pioneer Sementes, 2016).

Com o objetivo de encontrar soluções mais sustentáveis e duráveis para o controle da FAS, pesquisas sobre a interação planta-patógeno têm sido realizadas com o intuito de desvendar os mecanismos de ataque do patógeno e de defesa do hospedeiro a nível molecular. Dentre estes, destaca-se a predição do secretoma e proteínas efetoras de *P. pachyrhizi* (Carvalho et al., 2017). As plantas possuem um sistema de defesa baseado no sistema imune inato, ativado após reconhecimento de sinais da presença do patógeno. Esses sinais, denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), são moléculas carregadas pela maioria dos microrganismos e são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), localizados na parede celular da planta. Deste modo, é ativada a imunidade desencadeada por PAMPs (PTI), também chamada de defesa basal. Dentre as respostas associadas a essa defesa estão a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o acúmulo de calose. Alguns patógenos são capazes de suplantam essa defesa basal (PTI) pela produção de moléculas efetoras que contribuem para sua virulência, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS) (Abe, 2012; Jones; Dangl, 2006).

Os efetores podem atuar tanto nos mecanismos de virulência como de avirulência. Neste último caso, são codificados por genes dominantes de avirulência (*Avr*) e, uma vez identificado o gene candidato em bancos de dados por meio da bioinformática, por exemplo, a validação desses genes pode ser conduzida por meio de ensaios funcionais, como a expressão transiente em plantas e a consequente ativação ou supressão das respostas de defesa, como a produção de ROS e deposição de calose (Kamoun, 2006; Abe, 2012; Maia, 2013; Möller, 2014). O sistema EDV (*Effector Detector Vector*), baseado no Sistema de Secreção Tipo III (SST3) de fitobactérias, é um método de análise que se mostrou promissor para fungos biotróficos. Por meio do SST3 são translocadas proteínas codificadas por genes *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity genes*), sendo esses genes necessários para a patogenicidade em plantas hospedeiras e reações de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras. Após o contato do complexo SST3 com a célula vegetal há a ativação da translocação das proteínas efetoras da bactéria para o citoplasma vegetal (Bittel; Robatzek, 2007).

Para o presente trabalho, as proteínas candidatas a efetores utilizadas foram anteriormente identificadas previamente pela equipe do projeto por meio

da combinação de métodos de microdissecção de captura a laser (LCM), sequenciamento de RNA e análises de bioinformática. Estas apresentaram características de candidato a efetor, como tamanho reduzido (<250 aminoácidos), riqueza de resíduos de cisteína (>3%) e forte expressão *in planta*, sendo então suas sequências agrupadas em famílias por comparação e similaridade (Carvalho et al., 2017).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar funcionalmente as proteínas candidatas a efetores de *P. pachyrhizi*, por meio da avaliação de sua capacidade de suprimirem as respostas de defesa basal quando expressas transientemente em folhas de *Nicotiana benthamiana* pela medição dos níveis de ROS e deposição de calose.

Material e Métodos

Nicotiana benthamiana é considerada uma planta modelo para estudos de sinalização de defesa proveniente da interação planta-patógeno devido à sua susceptibilidade a uma grande gama de variedades de agentes fitopatogênicos, como bactérias, oomicetos, fungos, etc. Além disso, pode ser geneticamente transformada e regenerada de modo eficiente, sendo passível de metodologias simples para expressão transiente de proteínas. Por isso, a *N. benthamiana* foi a planta utilizada para a presente pesquisa. Elas foram cultivadas em vasos de plástico de 500 mL preenchidos com solo tratado e peneirado, e mantidas em câmara de crescimento de plantas sob condições ideais de 50-55% de umidade, 24°C de temperatura e 12h/12h (luz/escuro) por, aproximadamente, cinco semanas.

A bactéria EtHAn (*Effector-to-Host Analyzer*) utilizada consiste em *Pseudomonas fluorescens Pf0-1*, uma bactéria de solo, não patogênica, que contém uma mutação no gene *hrp* e um SST3, permitindo a translocação do efetor para a planta. Essas colônias são armazenadas em ultrafreezer à -80°C e, cerca de 48h antes da infiltração, elas foram estriadas em placas de Petri com meio King-B (KB) e deixadas em estufa de crescimento em condições ideais de temperatura de 28°C. Após 48h, as placas contendo as bactérias foram lavadas com H₂O milliQ e suas soluções foram submetidas à centrifugação a 5000 rpm por 15 min. Após esse processo, o conteúdo líquido foi descartado e o pellet de bactérias foi ressuscitado em 2,0 mL de solução

Tampão (MgCl_2 10mM). A concentração das bactérias foi ajustada para uma $\text{OD}_{600}=0,5$.

Os tratamentos, que consistem em controle negativo (solução Tampão 10mM MgCl_2), controle positivo (EtHAN), e EtHAN contendo as diferentes proteínas candidatas a efetoras clonadas (de_novo_5849, de_novo_2238, de_novo_7164, de_novo_5381, de_novo_1784, e de_novo_3939), foram infiltrados na face abaxial das folhas de *N. benthamiana* com auxílio de uma seringa sem agulha, até formar uma circunferência de, aproximadamente, 1,5 cm. Na face adaxial, a circunferência foi demarcada com caneta permanente para, posteriormente, ter ciência da área infiltrada no momento de coleta dos discos foliares. Por fim, as plantas tratadas permaneceram na câmara climática para crescimento de plantas sob as mesmas condições já descritas.

Deteção da formação de espécies reativas à oxigênio (ROS) por meio do corante DAB

Decorrendo as 24h após a infiltração, os discos foliares foram coletados com auxílio de um perfurador de folha, buscando sempre manter a região da “picada” no centro do disco, e alocados na placa. Na capela de exaustão, fora adicionado à solução do corante DAB (seguindo as especificações do fabricante Invitrogen™), que realiza a pigmentação de ROS. Por fim, a placa foi coberta com alumínio, devido à foto sensibilidade do corante DAB, e deixada sob leve agitação por um período “overnight”.

Após esse período, os discos foliares foram lavados com água destilada e despigmentados, a fim de facilitar a visualização da pigmentação de ROS. Esse processo consiste na submissão dos discos foliares em uma solução 3:1:1 de Etanol:Glicerol:Ácido Acético à temperatura alta por 15 min, dentro da capela de exaustão. Por fim, foram preparadas lâminas com os discos foliares em glicerol 50%, e estas visualizadas em microscópio com a objetiva de 10x. A captura da imagem foi feita por meio do software Motic® Images Plus 2.0, de modo a demonstrar parte da região da “picada” em um dos quatro cantos da imagem.

Detecção do acúmulo de calose por meio do corante azul de anilina

Decorrendo as 72h após a infiltração, os discos foliares foram coletados da mesma maneira descrita anteriormente. Diferente do processo anterior, o procedimento de despigmentação da clorofila ocorre antes da pigmentação com o corante azul de anilina. A despigmentação consiste na imersão dos discos foliares em 2,0 mL de Etanol 95% sob leve agitação à 37°C por pelo menos 6h. Posteriormente, foi realizado etapas de reidratação dos discos foliares com soluções menos concentradas de Etanol (70%, 30% e água destilada) sob leve agitação. Ao final, foi adicionado aos discos foliares a solução corante azul de anilina (que cora estruturas de calose provenientes da infecção de patógenos no tecido foliar) + Tween® 20, cobriu-se a placa com alumínio e deixou-a sob leve agitação por 2h. Posteriormente, foram preparadas as lâminas com os discos foliares em glicerol 50%, e estas foram analisadas por meio de microscopia de fluorescência, utilizando o filtro DAPI, onde as partes pigmentadas com o azul de anilina são excitadas por meio da luz U.V. do microscópio. As imagens foram documentadas por meio do software Zeiss AxioVision 3.0, com visualização na objetiva de 5x.

Resultados e Discussão

A produção de ROS e a deposição de calose são consideradas respostas de defesa basal associadas à PTI. A produção de ROS é proveniente de injúrias no tecido vegetal e elicitores fúngicos e bacterianos, resultando em sucessiva adição de elétrons ao oxigênio molecular (O_2) e gerando moléculas como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que está associado à sinalização de indução de defesa na planta. Já a calose (polímero 1,3- β -glucano), juntamente com a lignina, fortificam a parede celular e atuam como uma matriz antimicrobiana (Bunchanan et al., 2015). A *Pseudomonas fluorescens Pf0-1*, quando infiltrada no tecido apoplástico de *N. benthamiana*, promove essas respostas de defesa. Já os efetores fúngicos possuem um importante efeito funcional, sendo a supressão dessas respostas associadas à PTI.

Por meio das imagens de pigmentação de ROS por DAB (Figura 1A) e de deposição de calose por azul de anilina (Figura 1B), observou-se que o controle negativo (solução Tampão 10mM $MgCl_2$), por ter ausência do patógeno, não há a indução de resposta de defesa. Consequentemente, não foram obser-

vados ROS e estruturas de calose corados. No controle positivo (EtHAn), por ocorrer o reconhecimento da bactéria, observa-se a pigmentação de ROS e estruturas de calose, evidenciando a resposta de defesa associada à PTI. Já os tratamentos de EtHAn contendo as diferentes proteínas candidatas a efetoras clonadas demonstraram mínima pigmentação de ROS e estruturas de calose.

Observa-se que a coloração das imagens dos tratamentos com as proteínas candidatas assemelha-se com as imagens do controle negativo, demonstrando que as proteínas candidatas a efetoras foram capazes de suprimir a PTI em diferentes níveis, indicando uma atividade efetora.

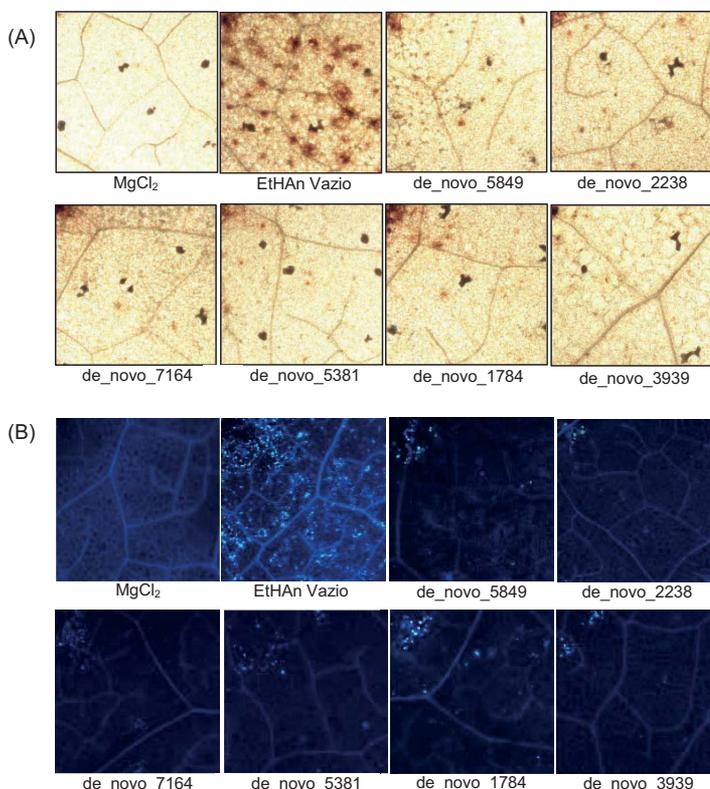


Figura 1. Folhas de *N. benthamiana* infiltradas com o controle negativo (MgCl₂), controle positivo (EtHAn Vazio) e os tratamentos de EtHAn contendo as proteínas candidatas a efetoras (de_novo_5849, de_novo_2238, de_novo_7164, de_novo_5381, de_novo_1784, e de_novo_3939); pigmentadas com corante (A) DAB para observação de ROS e (B) azul de anilina para observação de estruturas de calose para avaliação de resposta de defesa associada à PTI.

Conclusão

Com base nos resultados, foi possível validar funcionalmente pelo menos seis proteínas candidatas a efetores de *P. pachyrhizi* pela sua capacidade de suprimir as respostas basais de defesa (PTI), baseado na redução dos níveis ROS e calose, ambas respostas de PTI, quando estas foram expressas transientemente em folhas de *N. benthamiana* utilizando o sistema de secreção tipo III da bactéria *P. fluorescens*. Tais dados contribuem para a melhor compreensão do sistema de interação planta-patógeno e possibilita a continuidade de experimentos futuros para confirmação e validação das proteínas candidatas a efetoras como proteínas efetoras de *P. pachyrhizi*.

Referências

- ABE, V. Y. **Expressão transiente de genes de *Phakopsora pachyrhizi* em genótipos resistentes de soja visando a identificação de genes de avirulência**. 2012. 62 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- BITTEL, P.; ROBATZEK, S. Microbe-associated molecular patterns (MAMPS) probe plant immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, n. 4, p. 335-341, 2007.
- BROMFIELD, K. R.; HARTWIG, E. E. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science**, v. 20, p. 254-255, 1980.
- CARVALHO, M. C. G. de; NASCIMENTO, L. C.; DARBEN, L. M.; POLIZEL-PODANOSQUI, A. M.; LOPES-CAITAR, V. S.; MISHENG, Q.; ROCHA, C. S.; CARAZZOLLE, M. F.; KUWAHARA, M. K.; PEREIRA, G. A. G.; ABDELNOOR, R. V.; WHITHAM, S. A.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. Prediction of the *in planta* *Phakopsora pachyrhizi* secretome and potential effector families. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 3, p. 366-377, 2017.
- CHILDS, S. P.; KING, Z. R.; WALKER, D. R.; HARRIS, D. K.; PEDLEY, K. F.; BUCK, J. W.; BOERMA, R.; LI, Z. Discovery of a seventh *Rpp* soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, n. 1, p. 27-41, 2018.
- GARCIA, A.; CALVO, E. S.; KIIHL, R. A. S.; HARADA, A.; HIROMOTO, D.; VIEIRA, L. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, p. 545-553, 2008.
- HARTWIG, E. E. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science**, v. 26, p. 1135-1136, 1986.
- HYTEN, D. L.; SMITH, J. R.; FREDERICK, R. D.; TUCKER, M. L.; SONG, Q.; CREGAN, P. B. Bulked segregant analysis using the goldengate assay to locate the *Rpp3* locus that confers resistance to soybean rust in soybean. **Crop Science**, v. 49, p. 265-271, 2009.
- JONES, J. D.; DANGL J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323-329, 2006

KAMOUN S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 41-60, 2006.

LI, S.; SMITH, J. R.; RAY, J. D.; FREDERICK, R. D. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI567102B. **Theoretical Applied Genetics**, v. 125, p. 133-142, 2012.

MAIA, T.A. **Identificação e análise funcional de efetores de *Hemileia vastatrix*, agente causal da ferrugem do cafeeiro**. 2013. 124 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MÖLLER, P.A. **Análise funcional de genes de *Phakopsora pachyrhizi* candidatos a efetores utilizando o sistema EDV**. 2014. 61 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PIONEER SEMENTES. **O comportamento da ferrugem asiática na soja ao longo dos anos, dificuldades de controle e seus custos**. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/media-center/artigos/193/o-comportamento-da-ferrugem-asiatica-na-soja-ao-longo-dos-anos-dificuldades-de-controle-e-seus-custos>>. Acesso em: 28 mai. 2018.

REIS, E. M.; BRESOLIN, A. C. R.; CARMONA, M. **Doenças da soja I: ferrugem asiática**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2006. 48p.

SILVA, D. C. G.; YAMANAKA, N.; BROGIN, R. L.; ARIAS, C. A. A.; NEPOMUCENO, A. L.; DI MAURO, A. O.; PEREIRA, S. S.; NOGUEIRA, L. M.; PASSIANOTTO, A. L. L.; ABDELNOOR, R. V. Molecular mapping of two loci that confer resistance to asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, n. 1, p. 57-63, 2008.