

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE DUAS IMPORTANTES PROTEÍNAS RELACIONADAS À PATOGÊNESE EM PLANTAS DE ARROZ SUBMETIDAS À INDUÇÃO BIÓTICA DE RESISTÊNCIA CONTRA O FUNGO *Magnaporthe oryzae*

Marcio Vinicius de C. Barros Côrtes¹, Valácia L. da Silva - Lobo², Anne Sitarama Prabhu², Marta Cristina C. de Filippi²

Palavras chave: indução, resistência, brusone.

INTRODUÇÃO

A brusone do arroz, causada pelo ascomiceto *Magnaporthe oryzae*, é conhecida como a doença mais destrutiva dos arrozais em todas as regiões produtoras deste cereal. Para uma agricultura sustentável e ecologicamente correta, seu controle deve ser feito através do manejo, integrando resistência genética, práticas culturais e controle químico.

As plantas possuem aparato estrutural e bioquímico que compõem seu mecanismo de defesa contra a ação de agentes bióticos, abióticos e físicos. Os mecanismos de defesa podem ser pré-formados e/ou serem ativados em resposta ao estímulo do agente agressor (AGRIOS, 2004).

A resistência induzida é definida como a defesa das plantas contra injúrias pela ativação prévia das vias de defesa geneticamente programadas das células vegetais. A ativação de algumas vias metabólicas relacionadas à defesa da planta pode ocorrer por meio de isolados avirulentos, bem como por indutores químicos, resultando no aumento da expressão de determinadas proteínas, denominadas proteínas relacionadas à patogênese (PRPs). Essas moléculas podem agir direta ou indiretamente contra o patógeno. Em condições de homeostase celular sua presença é verificada em níveis basais. As enzimas peroxidase (EC 1.11.1.7) e β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.39) são reconhecidas como PRPs (AGRIOS, 2004). As peroxidases possuem diversas funções na defesa celular das plantas, como da lignificação e metabolismo de parede celular. Macromoléculas polimerizadas pelas peroxidases também são depositadas na superfície extracelular, fortalecendo a parede celular, dificultando a invasão por patógenos e a expansão celular (BOWLES, 1990; LÉON, 1995; HIRAGA et al., 2001; KAWANO & MUTO, 2000). A β -1,3-glucanase exibe uma ação direta sobre o patógeno agressor. Sua ação antifúngica reside no fato de catalisar a reação de degradação do polímero de glicose formado por ligações do tipo β -1,3 presentes na estrutura da parede celular do microrganismo (CUTT & KLESSING, 1992; CORNELISSEN & MELCHERS, 1993).

A estratégia de indução de resistência em plantas tem se mostrado promissora e a pesquisa dos mecanismos de resistência tem sido estimulada para esclarecer cada vez mais os processos envolvidos na expressão da resistência. Em trabalho desenvolvido por Filippi et al. (2007) foi demonstrado, através de avaliação foliar, que um isolado avirulento de *Magnaporthe oryzae* é capaz de induzir resistência em arroz contra isolado patogênico da mesma espécie.

Neste trabalho, foram determinadas as atividades enzimáticas das enzimas relacionadas à patogênese: β -1,3-glucanase e peroxidase em plantas de arroz submetidas a tratamento prévio com isolado de *Magnaporthe oryzae* avirulento ao cultivar de arroz Cica-8, na tentativa de explicar molecularmente, os resultados obtidos com o mesmo tratamento através de avaliação foliar.

MATERIAL E MÉTODOS

O modelo de análise baseou-se no pré-tratamento (indução) da cultivar de arroz Cica-8 por um isolado avirulento do fungo *Magnaporthe oryzae* (Py 1049) e posterior inoculação com o desafiante / agressor, um isolado do fungo *Magnaporthe oryzae* (Py 435), patogênico à cultivar escolhida para o estudo. Esses isolados foram selecionados em estudos anteriores. O experimento foi conduzido sob

¹ MSc. Bioquímica – Embrapa Arroz e Feijão – Rodovia GO 462 km 12 CEP: 75375-000 Sto. Antônio de Goiás – GO
marciiov@cnpaf.embrapa.br;

² Embrapa Arroz e Feijão.

condições controladas, em casa de vegetação, delineamento inteiramente casualizado, em três repetições. Em laboratório, os isolados, desafiante / agressor e indutor foram multiplicados em meio de aveia acrescidos de cloridrato de tetraciclina com concentração final de 1,0 µg/ml. Após dez dias, estimulou-se a produção de conídios removendo os micélios com o auxílio de um bastão de vidro. A concentração da suspensão de conídios utilizada foi de $3,0 \times 10^5$ conídios.ml⁻¹. A indução foi realizada após 18 dias da germinação e 48 horas antes da inoculação desafiante.

Foram coletadas plantas de arroz 72 horas após a agressão. As proteínas solúveis das amostras de plantas de arroz submetidas ao tratamento, e de seus controles, foram extraídas em tampão Tris-HCl. A dosagem de proteínas foi executada segundo metodologia de BRADFORD (1976). A dosagem da atividade da enzima β-1,3-glucanase foi efetuada em meio reacional com volume final de 500 µL, pH 5,5 e 35°C, utilizando laminarina 1% como substrato. A dosagem da atividade da enzima peroxidase foi efetuada em meio reacional com volume final de 2250 µL, pH 5,5 e 30°C utilizando peróxido de hidrogênio 0,5% como substrato. Trabalhou-se em condições de velocidade inicial de reação enzimática. As técnicas utilizadas basearam-se em métodos colorimétricos. Os experimentos foram executados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 é observado o aumento na atividade glucanásica ao se comparar os controles positivos (agredido ou induzido) e o tratamento (induzido e agredido), com relação ao controle negativo (planta somente pulverizada com água). Este dado é importante, pois demonstra a capacidade do sistema de defesa da planta reagir à interação entre sua superfície e os isolados avirulentos e virulentos, decorrido o tempo de 72 horas após a agressão.

Na Figura 2 também é observado o aumento na atividade peroxidásica, comparando-se os controles positivos e o tratamento com relação ao controle negativo, corroborando com os resultados obtidos no experimento representado pela Figura 1.

Em ambas as figuras é observado que a agressão, por si só eleva a expressão das proteínas relacionadas à patogênese estudada. Este resultado é esperado, porque o sistema de defesa da planta reage naturalmente à agressão. Um dado interessante é verificado quando observamos que a indução, por si só desencadeia a expressão dessas enzimas, fato esse interessante, do ponto de vista que com essa informação podemos afirmar que um isolado avirulento, nesse sistema, é capaz de preparar a planta para uma possível agressão.

Finalmente, na Figura 1 ao se comparar o tratamento onde a planta foi induzida / agredida com o tratamento onde a planta foi somente agredida verificou-se que a expressão da enzima β-1,3-glucanase aumentou cerca de 80%. O tratamento de indução intensificou a atividade enzimática em questão, preparando a planta para receber qualquer tipo de agressão, aqui representado pela inoculação com o isolado agressor. Neste caso, a intensa expressão dessas proteínas fica mais evidente, pois nesse sistema a agressão também ocorre. A possível explicação para esse fenômeno parece residir no fato em que as PRPs podem ser expressas na sua forma ativa e também na sua forma inativa quando a planta é submetida ao contato com o isolado indutor, porém para uma expressão plena de sua atividade a proteína sintetizada na sua forma inativa precisa ser ativada, processo esse que se desencadeia somente quando a planta entra em contato com o isolado virulento do patógeno. Na Figura 2 o aumento da expressão da enzima peroxidase é de cerca de 40%, também corroborando com os dados apresentados na Figura 1.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo explicam em parte os resultados referentes à quantificação de severidade da brusone das folhas do arroz obtidos nos ensaios conduzidos em casa de vegetação para este sistema, descritos por Filippi (2007).

A intensa atividade enzimática obtida no processo de indução de resistência sugere que o indutor biótico deve ser mais bem estudado como uma opção de estratégia para manejo integrado da brusone.

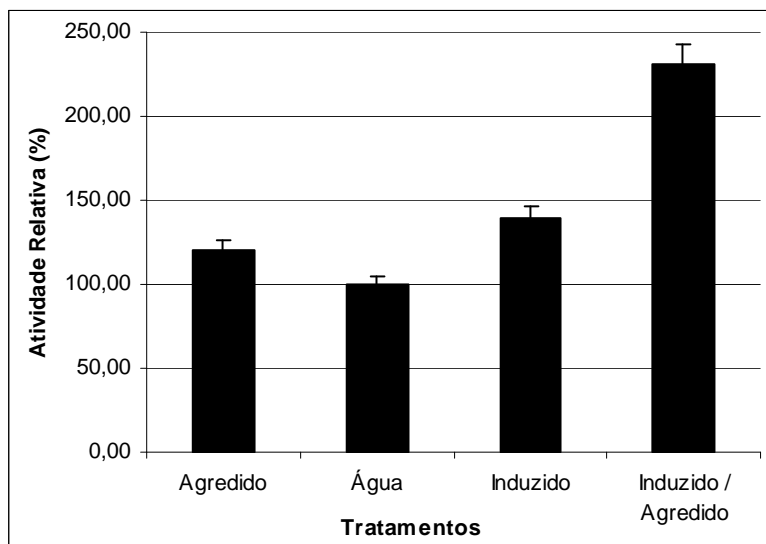


Figura 1. Atividade relativa de β -1,3-glucanase. Ensaio executado em triplicata. As barras verticais são relativas ao desvio padrão.

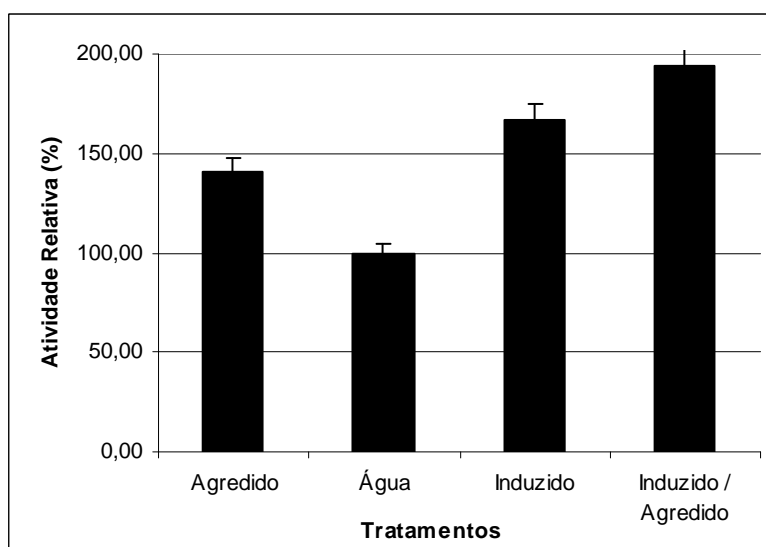


Figura 2. Atividade relativa de peroxidase. Ensaio executado em triplicata. As barras verticais são relativas ao desvio padrão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**, 5th ed San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.
- BOWLES, D.J. Defense-related proteins in higher plants. **Anual Review of Biochemistry**, v.59: p.837-907, 1990.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72: p.248 – 254, 1976.
- CORNELISSEN, B.J.C.; MELCHERS, L.S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, v.101: p.709-712, 1993.
- CUTT, J.R.; KLESSING, D.F. Pathogenesis-related proteins. In: BOLLER, T.; MEINS Jr., **Plant Gene Research: Genes involved in plant defense**, Wien: Springer-Verlag, p.209-243, 1992.
- FILIPPI, M.C.C., SILVA, G.B & PRABHU, A.S. Indução de resistência à brusone em folhas de arroz por isolado avirulento de *Magnaporthe oryzae*. **Fitopatologia Brasileira** v.32: p.387-392. 2007.
- HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H.; A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v.42: p.462-468, 2001.
- KAWANO, T. MUTO, S. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and na increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. **Journal of Experimental Botany**, v.143: p.685-693, 2000.
- LÉON, J.; LAWTON, M.A.; RASKIN, I. Hidrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, v.108: p.1673-1678, 1995.