



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1678-9601

Dezembro, 2008

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 34

Quantificação da Atividade Enzimática de Proteínas Relacionadas à Patogênese no Patossistema *Oryza sativa*/ *Magnaporthe oryzae*

Marcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes
Hérica Fernandes Viana
Fernanda Rosa Silva
Valácia Leme Silva Lobo
Gisele Barata da Silva
Anne Sitarama Prabhu
Marta Cristina Corsi de Filippi

Santo Antônio de Goiás, GO
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rodovia GO 462 - Km 12 - Zona Rural - Caixa Postal 179

75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO

Fone: (62) 3533 2123

Fax: (62) 3533 2100

www.cnpaf.embrapa.br

sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Luís Fernando Stone*

Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Supervisor editorial: *Camilla Souza de Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*

Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*

Capa: *Sebastião José Araújo*

Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1ª edição

1ª impressão (2008): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Arroz e Feijão

Quantificação da atividade enzimática de proteínas relacionadas à patogênese no patossistema *Oryza sativa* / *Magnaporthe grisea* / Marcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes ... [et al.]. - Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2008. 18 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9601 ; 34)

1. Arroz - Brusone. 2. Arroz - Indução - Resistência. I. Côrtes, Marcio Vinicius de Carvalho Barros. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

CDD 633.1894 (21. ed.)

© Embrapa 2008

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Objetivo	10
Metodologia	10
Material para análise	10
Coleta das amostras	11
Extração de proteínas	11
Dosagem de proteína	11
Ensaio enzimáticos	12
<i>Ensaio de atividade de β-1,3-glucanase</i>	12
<i>Ensaio de atividade de peroxidases</i>	12
Resultados e Discussão	12
Conclusão	16
Referências	16

Quantificação da Atividade Enzimática de Proteínas Relacionadas à Patogênese no Patossistema *Oryza sativa*/ *Magnaporthe oryzae*

Marcio Vinicius de Carvalho Barros Côrtes¹; Hérica Fernandes Viana²; Fernanda Rosa Silva³; Valácia Leme Silva Lobo⁴; Gisele Barata da Silva⁵; Anne Sitarama Prabhu⁶; Marta Cristina Corsi de Filippi⁷

Resumo

A estratégia de indução de resistência em plantas a fitopatógenos tem se mostrado promissora e pesquisas de mecanismos de resistência têm sido estimuladas para esclarecer os processos envolvidos na expressão da resistência. Acibenzolar-S-Metil (ASM), um derivado benzotiazólico, vem sendo aplicado em diversas espécies de plantas como indutor químico de resistência a patógenos. Sua ação na cultura de arroz ainda é inconclusiva. O objetivo deste trabalho foi adequar métodos bioquímicos para detecção e quantificação da presença de Proteínas Relacionadas à Patogênese “PRP’s” na interação arroz/*M. oryzae* durante o processo de indução de resistência exercida pela molécula ASM. O modelo de análise baseou-se no pré-tratamento da cultivar Cica-8 com ASM e posterior inoculação com o desafiante, um isolado do fungo *Magnaporthe oryzae* (Py435). O experimento foi conduzido sob condições controladas, em casa de vegetação e laboratório. Foram testadas as atividades de peroxidase e β -1,3-glucanase. A quantificação de atividades enzimáticas de

¹ Farmacêutico, Bsc., Analista, Embrapa Arroz e Feijão, Rod. GO 462, Km 12, 75375-000 Santo Antônio de Goiás-GO, marciiov@cnpaf.embrapa.br

² Bolsista Embrapa/UFLA, Lavras, MG, herica_viana@hotmail.com.br

³ Bolsista Pibic/CNPq, Uni-ANHANGÜERA, Goiânia, GO

⁴ Engenheira Agrônoma, Dra. em Fitopatologia, Pesquisadora, Embrapa Arroz e Feijão, valacia@cnpaf.embrapa.br

⁵ Engenheira Agrônoma, Dra. em Fitopatologia, UFRA, Belém-PA, gisele.barata@ufra.edu.br

⁶ Biólogo, Ph.D. em Fitopatologia, Pesquisador, Embrapa Arroz e Feijão, prabhu@cnpaf.embrapa.br

⁷ Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Fitopatologia, Pesquisadora, Embrapa Arroz e Feijão, cristina@cnpaf.embrapa.br

PRP's foi bem sucedida e fiel aos resultados referentes à quantificação de severidade da brusone das folhas obtidos nos ensaios conduzidos em casa de vegetação.

Termos para indexação: indução de resistência, brusone, arroz, β -1,3-glucanase, peroxidase.

Quantification of enzymatic activity of proteins related to pathogenesis *Oryza sativa*/*Magnaporthe oryzae* pathosystem

Abstract

The strategy of induced resistance in plants to pathogens has shown promising results in relation to the resistance mechanisms with special reference to elucidation of processes involved in the expression of resistance. Acibenzolar-S-methyl (BTH), benzothiazol derivative, is being applied in different plant species as chemical inducer to resistance against pathogens. However, its efficiency on rice is still inconclusive. The objective of this investigation was to adopt biochemical methods for detection and quantification of pathogen related proteins "PRP's" expressed in the rice/M. oryzae blast interaction during the resistance induction process by ASM molecule. The model for analysis was based on pre-treatment of cultivar Cica-8 with ASM followed by inoculation with an isolate of challenging fungus Magnaporthe oryzae (Py435). The experiment was conducted under controlled greenhouse and laboratory conditions. The activity of peroxides and β -1,3-glucanase was tested. The quantification of enzymatic activity of PRP's was highly successful corresponding to the results relating to the leaf blast severity quantification measured in greenhouse experiments.

Index terms: resistance induction, rice blast, β -1,3-glucanase, peroxidase.

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 integrado da resistência genética, das práticas culturais e do 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, 2005).

A resistência induzida é definida como a defesa das plantas contra injúrias, sejam elas bióticas ou abióticas, pela ativação prévia das vias de defesa geneticamente programadas das células vegetais.

A interação específica entre uma planta hospedeira carregando um gene de resistência "R" e um patógeno invasor carregando um gene de avirulência "Avr" frequentemente leva a uma reação de hipersensibilidade "HR", reconhecida fenotipicamente como uma reação de resistência. A nível celular, essa reação é caracterizada pela ocorrência de apoptose nas células infectadas das plantas, observando-se inicialmente um intenso estresse oxidativo. Estas alterações bioquímicas intracelulares visam delimitar a região infectada, evitando a disseminação da doença na planta. Em sequência à expressão de "HR", ocorre o disparo de uma reação em cadeia nas células ativadas, resultando em várias respostas contra o patógeno, como o reforço da parede celular, a produção de fitoalexinas e a ativação de Proteínas Relacionadas a Patogênese "PRP's" (DAUGROIS et al., 1990; HWANG et al., 1997). Este efeito cascata é reconhecido como a resistência sistêmica adquirida "SAR", preparando a planta como um todo contra o processo de invasão e colonização (RESENDE et al., 2007).

As "PRPs" são um conjunto diversificado de moléculas, que podem agir direta ou indiretamente contra o patógeno. Em condições de homeostase celular sua presença é verificada em níveis basais. Entretanto, a ativação de algumas vias metabólicas relacionadas a defesa da planta podem ocorrer por meio de isolados avirulentos, bem como por indutores químicos, resultando no aumento da expressão destas proteínas. As enzimas peroxidase (EC 1.11.1.7) e β -1,3-glucanase (EC 3.2.1.39) são reconhecidas como "PRP's" (AGRIOS, 2005).

As peroxidases possuem diversas funções na defesa celular das plantas, como 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 et al., 1995; KAWANO; MUTO, 2000; HIRAGA et al., 2001).

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 as pesquisas de mecanismos de resistência têm sido estimuladas para esclarecer cada vez mais os processos envolvidos na expressão da resistência.

Diversos compostos químicos vêm sendo utilizados e testados como indutores de resistência. O composto Acibenzolar-S-Metil (ASM), um derivado benzotiazólico, vem sendo aplicado em diversas espécies de plantas como indutor químico de resistência a patógenos, inclusive em arrozais de outros países. No Brasil, não se tem informações quanto à eficiência de ASM no controle de brusone do arroz, tanto em casa de vegetação como em campo.

Objetivo

Adequação de métodos bioquímicos para detecção e quantificação de "PRP's" na interação arroz/*Magnaporthe oryzae* durante o processo de indução de resistência à brusone exercida pela molécula ASM.

Metodologia

Material para análise

O modelo de análise baseou-se no pré-tratamento da cultivar Cica-8 com acibenzolar-S-metil e posterior inoculação com o desafiante, um isolado do fungo *Magnaporthe oryzae* (Py 435), patogênico à cultivar escolhida para estudo. O experimento foi conduzido sob condições controladas, em casa de vegetação,

delineamento inteiramente casualizado, em três repetições. As plantas de arroz foram cultivadas em bandejas. Em laboratório, o isolado desafiante foi cultivado em placas de Petri, em meio BDA, em presença de luz. Após o seu crescimento, o fungo foi repicado para meio de aveia acrescido de cloridrato de tetraciclina com concentração final de 1,0 mg/ml. Após sete dias, estimulou-se a produção de esporos. A suspensão de esporos do isolado desafiante foi obtida através da lavagem das placas com água destilada e pincéis previamente esterilizados. Os tratamentos estudados foram: tratamento de sementes com 10 g ASM.100 Kg⁻¹ sementes e tratamento da planta por pulverização com 3 mg de ASM/bandeja, sete dias antes da inoculação. Também foram cultivadas plantas para o controle positivo (plantas apenas agredidas com o isolado Py 435) e negativo (tratamentos induzidos, porém não agredidos). A suspensão de inóculo foi produzida em laboratório seguindo a metodologia de Filippi et al. (2007). A concentração da suspensão de inóculo utilizada foi de 3×10^5 confídios.ml⁻¹. Os ensaios enzimáticos foram realizados 120 horas após a inoculação.

Coleta das amostras

Foram coletadas algumas amostras, cada uma delas composta por cerca de cinco a dez folhas das plantas de arroz. O material coletado foi mantido em recipiente contendo água previamente esterilizada. As amostras permaneceram sob refrigeração ou banho de gelo até o momento da extração de proteínas.

Extração de proteínas

Foram cortadas cinco folhas de aproximadamente 2,5 cm, acondicionadas em grau e maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de pistilo até a formar um pó finamente dividido. A amostra foi recolhida e processada em microtubo (1,5 ml), no qual foi adicionada solução tampão de extração na relação 1:4 (v/v). A solução tampão extrativa é composta de Tris-HCl 10 mM; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM; DTT 2 mM; PMSF 1 mM; Leptina 10 mg.ml⁻¹ e Apotina 10 mg.ml⁻¹. A suspensão formada foi agitada por cinco minutos e centrifugada sob refrigeração por 30 minutos a 13000 x g. O sobrenadante foi retirado para dosagem de proteínas e ensaios enzimáticos.

Dosagem de proteína

A dosagem de proteínas foi executada segundo metodologia de Bradford (1976). Preparou-se uma curva padrão de proteína com albumina de soro bovino

nas concentrações entre 0–1 mg/mL. As leituras foram efetuadas em espectrofotômetro FENTO 600 Plus em comprimento de onda $\lambda = 595$ nm.

Ensaio enzimáticos

Ensaio de atividade de β -1,3-glucanase

A dosagem da atividade da enzima β -1,3-glucanase foi efetuada em meio reacional, com volume final de 500 mL e pH 5,5, composto de 125 mL de extrato bruto das folhas da planta e laminarina 1% em tampão acetato de sódio 1,0 M, a qual foi incubada a 35 °C. Trabalhou-se em condições de velocidade inicial de reação. A quantificação do produto da reação deu-se através do método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) 1%, efetuando-se as leituras com auxílio de espectrofotômetro FENTO 600 Plus em comprimento de onda $\lambda = 500$ nm. Uma curva padrão de glicose foi elaborada com concentração entre 0 – 100 mg.mL⁻¹. A atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de glicose em mg produzida em meio reacional por tempo em minutos e por miligrama de proteína (mg de glicose.min⁻¹.mg⁻¹). O experimento foi feito em triplicata.

Ensaio de atividade de peroxidases

A dosagem da atividade da enzima peroxidase foi efetuada em meio reacional, com volume final de 2250 mL e pH 5,5 e composto de 50 mL de extrato bruto das folhas da planta, peróxido de hidrogênio 0,5% e ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic) (ABTS) 1,0 mM em tampão acetato de sódio 1,0 M, a qual foi incubada a 25 °C. Trabalhou-se em condições de velocidade inicial de reação. A quantificação do produto reacional foi efetuada em espectrofotômetro Spectrum SP-2000UV em comprimento de onda $\lambda = 405$ nm. As concentrações do produto da reação foram estimadas pela utilização do coeficiente de extinção molar do produto ($3,6 \times 10^4$ mol⁻¹.cm⁻¹). A atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de produto em mmol produzida em meio reacional por tempo em segundos e por miligrama de proteína (mmol de ABTS*.s⁻¹.mg⁻¹). O experimento foi feito em triplicata.

Resultados e Discussão

O composto ASM induziu resistência na cultivar Cica-8 e as atividades enzimáticas de β -1,3-glucanase e peroxidase responderam positivamente à indução abiótica.

Os tratamentos e controles estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de tratamentos submetidos à análise da atividade enzimática e respectivos controles.

Código do Tratamento	Identificação do Tratamento da cultivar Cica-8
T1	Pulverização foliar com água
T2	Tratamento de sementes com ASM
T3	Pulverização foliar com ASM
T4	Agressão por isolado Py 435
T5	Tratamento de sementes com ASM + agressão por Py 435
T6	Pulverização foliar com ASM + agressão por Py 435

As atividades da enzima β -1,3-glucanase encontram-se relacionadas na Fig. 1 e peroxidase na Fig. 2. A título de comparação foi estabelecido que a atividade enzimática da testemunha Cica-8 (T1) seria 100%.

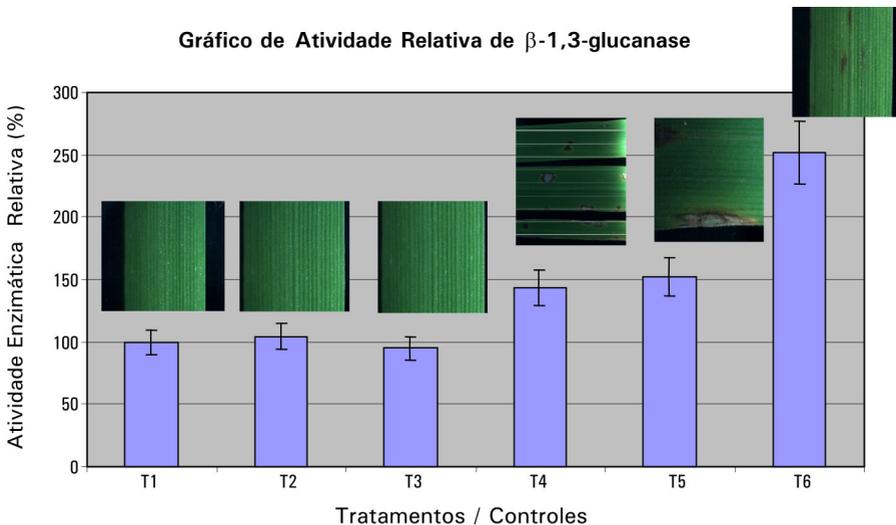


Fig. 1. Atividade relativa de β -1,3-glucanase . Cada barra representa o erro padrão (+/-) de cada experimento realizado em triplicata.

Nas Fig. 1 e 2 são apresentados os resultados obtidos. A partir destes, pôde-se fazer as seguintes observações:

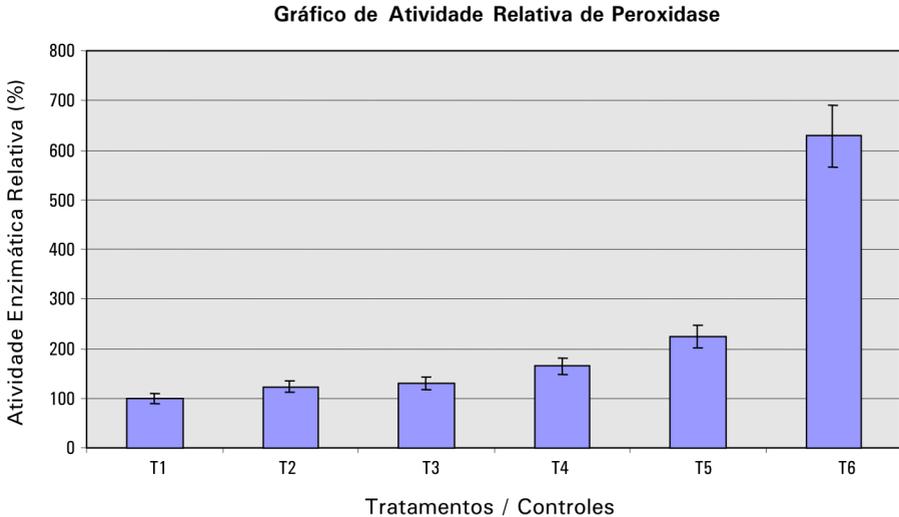


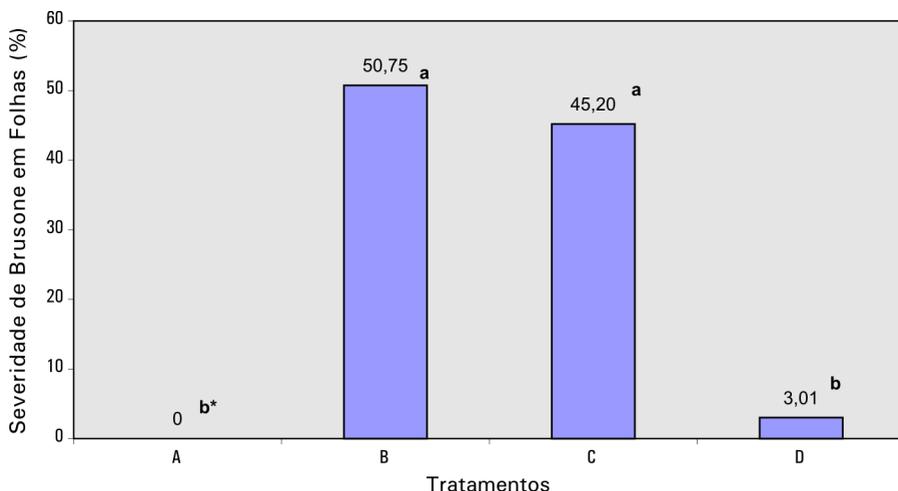
Fig. 2. Atividade relativa de peroxidase. Cada barra representa o erro padrão (+/-) de cada experimento realizado em triplicata.

Ao se comparar o tratamento **T4** com o tratamento **T6**, verificou-se um aumento significativo da atividade da enzima β -1,3-glucanase (66%) no tratamento induzido. Este resultado é corroborado pelo aumento da atividade peroxidásica (280%). Isso mostra que a pulverização da planta com o composto ASM, sete dias antes na inoculação com o isolado desafiante, nas condições citadas, induz a planta a um grande aumento na atividade das proteínas de defesa estudadas, caracterizando-se como muito eficiente.

Comparando-se o tratamento **T4** com o tratamento **T5**, observou-se que não houve aumento significativo das atividades das enzimas β -1,3-glucanase e peroxidase. Sendo assim, verifica-se que o tratamento de sementes não influencia no processo de proteção da planta contra o patógeno. Isso indica que o grande espaço de tempo decorrido entre o tratamento da semente e a inoculação com o isolado desafiante (21 dias após o plantio) leve a este resultado. Sendo assim, o longo período entre a indução e a inoculação com o isolado desafiante parece interferir na intensidade da resposta da planta. Dois fatores devem explicar esta questão. O primeiro seria a instabilidade da molécula de ASM em meio aquoso, exposto ao ambiente. O segundo seria o efeito fisiológico da planta de não despende energia na produção de proteínas na ausência de estímulo pelo agressor.

Na comparação dos tratamentos **T1**, **T2** e **T3** observou-se que não houve diferença significativa entre as atividades das enzimas estudadas. Esses dados indicam que o tratamento com ASM, por si só, não leva ao aumento efetivo da atividade das enzimas estudadas, pois este comportamento foi observado somente após a inoculação do isolado desafiante, sugerindo que o composto em estudo somente prepara a planta para a defesa contra a infecção. Desta forma, o contato com o agressor (patógeno) é que parece elicitar a atividade e a expressão das proteínas de defesa ou mesmo levar à sua ativação, uma vez que já estejam pré-formadas. Em suma, esses dados nos sugerem que a interação da planta com o patógeno é fundamental para a expressão e/ou ativação das proteínas de defesa.

Segundo a avaliação da severidade de brusone em folhas de arroz deste mesmo experimento, o tratamento da planta com ASM, via pulverização foliar, leva a uma redução significativa da severidade da doença. Já o tratamento de sementes, não diferiu da testemunha (VIANA et al., 2008). Os dados apresentados neste parágrafo estão apresentados na Fig. 3.



* Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fig. 3. Severidade de brusone em folhas de arroz da cultivar Cica-8. Os tratamentos apresentados foram: A - Cica-8 pulverizada com água; B - Folhas de Cica-8 não tratadas com ASM e agredidas por isolado Py 435; C - Tratamento de sementes de Cica-8 com ASM; D - Cica-8 pulverizada com ASM e agredida por Py 435.

Comparando os resultados obtidos através da quantificação da atividade enzimática das PRP's e dos resultados obtidos por avaliação da severidade de brusone em folhas, foi verificada a semelhança entre os mesmos. Desta forma, pôde-se validar a metodologia proposta para a avaliação desse sistema de indução de resistência na interação patógeno/hospedeiro proposta.

Conclusão

De acordo com resultados obtidos, foi concluído que os métodos aplicados neste estudo de quantificação de atividades enzimáticas de PRP's foram bem sucedidos e fiéis aos resultados referentes à quantificação de severidade da brusone das folhas obtidos nos ensaios conduzidos em casa de vegetação para o sistema estudado.

A superioridade da atividade enzimática dos tratamentos **T5** e **T6** durante o processo de indução de resistência sugere que o indutor abiótico ASM deve ser estudado como uma opção de estratégia para manejo integrado da brusone.

Diante do sucesso da metodologia citada, encontra-se em andamento a quantificação das demais proteínas relacionadas à patogênese (fenilalanina amônio-liase, quitinase e polifenoloxidase).

Referências

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. San Diego: Elsevier, 2005. 922 p.

BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Anual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 59, p. 837-907, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

CORNELISSEN, B. J. C.; MELCHERS, L. S. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 101, n. 3, p. 709-712, Mar. 1993.

CUTT, J. R.; KLESSING, D. F. Pathogenesis-related proteins. In: BOLLER, T.; MEINS JUNIOR, F. (Ed.). **Plant gene research: genes involved in plant defense**. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 209-243.

DAUGROIS, J. H.; LAFITTE, C.; BARTHE, J. P.; TOUZE, A. Induction of b-1,3-glucanase and chitinase activity in compatible and incompatible interactions between *Colletotrichum lindemuthianum* and bean cultivars. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 130, n. 3, p. 225-234, Nov. 1990.

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**, Brasília, DF, v. 32, n. 5, p. 387-392, set./out. 2007.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 42, n. 5, p. 462-468, May 2001.

HWANG, B. K.; SUNWOO, J. Y.; KIM, B. S. Accumulation of b-1,3-glucanase and chitinase isoforms, and a salicylic acid in the DL- b- amino-n-butyrac acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, n. 5, p. 305-322, Nov. 1997.

KAWANO, T. MUTO, S. Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 345, p. 685-693, Apr. 2000.

LÉON, J.; LAWTON, M. A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 108, n. 4, p. 1673-1678, Aug. 1995.

RESENDE, M. L. V. de; BARETTI, P. B.; MEDEIROS, F. C. L. de; SILVA, D. D. da; PEREIRA, R. B.; LINS, S. R. de O.; PEREIRA, L. de M.; CAMPOS, M. de A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 15, p. 173-242, 2007.

VIANA, H. F.; OLIVEIRA, P. R. P. M.; CORTES, M. V. C. B.; SILVA, F. R.; SILVA-LOBO, V. L.; SILVA, G. B.; PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. Indução abiótica de resistência à brusone das folhas em arroz. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. S 194, ago. 2008. Suplemento. ref. FIS-015. Edição dos Resumos do XLI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belo Horizonte, MG, ago. 2008.