

# MODIFICAÇÕES FISIOLÓGICAS E MOLECULARES EM PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) ALTAMENTE INFESTADAS POR ÁCAROS FITÓFAGOS *Schizotetranychus oryzae* ROSSI DE SIMONS (ACARI: TETRANYCHIDAE)

Édina A. R. Blasi<sup>1</sup>; Giseli Buffon<sup>2</sup>; Markus Berger<sup>3</sup>; Mathieu Lavallée-Adam<sup>4</sup>; John R. Yates III<sup>4</sup>; Joséli Schwambach<sup>5</sup>; Mara C. B. Lopes<sup>6</sup>; Lucélia Santi<sup>7</sup>; Walter O. Beys da Silva<sup>7</sup>; Raul A. Sperotto<sup>7</sup>.

Palavras-chave: histoquímica *in situ*, MudPIT, proteínas expressas.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o nono maior produtor mundial de arroz (*Oryza sativa* L.), um dos cereais mais consumidos no mundo (FAO, 2016). A produção nacional em 2016 foi de aproximadamente 11 milhões de toneladas, sendo que o Rio Grande do Sul (RS) se destaca neste cenário, sendo responsável por mais de 71% desta produção (IBGE, 2017).

Com relação às perdas nas lavouras, estima-se que cerca de 25% ocorra devido ao ataque de fitófagos em geral (Oerke, 2006). Uma das principais razões para as perdas na produtividade do arroz é a infestação de ácaros fitófagos (Blasi et al., 2014; Buffon et al., 2015), que podem danificar as plantas de arroz durante todo o desenvolvimento, dependendo da espécie de ácaro e do nível de infestação. Uma prova disto é que o ácaro filófago *Schizotetranychus oryzae* Rossi de Simons entrou no ano de 2016 para a lista de pragas do arroz da Embrapa (EMBRAPA, 2016).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi elucidar as modificações fisiológicas e moleculares envolvidas na resposta de plantas de arroz a altos níveis de infestação de *S. oryzae*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado na safra 2012/2013. As plantas de arroz da cultivar IRGA 424 foram mantidas em casa de vegetação. Plantas controle foram colocadas isoladas para evitar a infestação de *S. oryzae*. Para todas as análises foram coletadas folhas de plantas controle (*control*) e de plantas altamente infestadas ou com infestação tardia (LI, *late-infested*), as quais continham aproximadamente 180 ácaros por folha.

Para observar os danos fisiológicos causados pelos ácaros nas folhas de arroz, realizamos técnicas histoquímicas *in situ*, onde para verificar a formação de espécies reativas de oxigênio ( $O_2^-$  e  $H_2O_2$ ), fragmentos de folhas foram corados com *nitro blue tetrazolium* (NBT) e *diaminobenzidine* (DAB), respectivamente, conforme descrito por Shi et al. (2010). Para detectar perda de integridade da membrana plasmática ou morte celular, as folhas foram coradas com o reagente *Evans blue*, de acordo com Romero-Puertas et al. (2004). Realizamos ainda a quantificação dos níveis de clorofila total, a qual foi extraída com acetona 85%, seguindo o método de Ross (1974).

Para as análises de proteômica, amostras de folhas controle e altamente infestadas foram submetidas à extração de proteínas através do kit *Total Plant Protein Extraction*, Sigma. A quantificação das mesmas foi feita pelo método BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL). A análise de MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*) foi

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES, eblasi@univates.br

<sup>2</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES.

<sup>3</sup> Dr. Biologia Celular e Molecular (UFRGS), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

<sup>4</sup> Drs. Department de Chemical Physiology, The Scripps Research Institute, USA.

<sup>5</sup> Dra. Biologia Celular e Molecular (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.

<sup>6</sup> Ma. Fitotecnia (UFRGS), Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA).

<sup>7</sup> Drs. Biologia Celular e Molecular (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES.

realizada conforme Beys da Silva et al. (2014), e as proteínas foram identificadas com base no banco de dados do NCBI, *Reference Sequence Database* (RefSeq).

Para validar os dados gerados pela proteômica, realizamos PCR em Tempo Real (RT-qPCR) e ensaios enzimáticos. O RNA total das amostras de folhas de arroz foi extraído utilizando o kit *NucleoSpin RNA Plant* (Macherey-Nagel) e a síntese da primeira fita de cDNA foi realizada com o Kit *SMART PCR cDNA Synthesis*. Os níveis de expressão dos genes de interesse foram avaliados em relação ao gene controle *Ubiquitina 5 (OsUBQ5)* (JAIN et al., 2006) e os dados foram analisados através do método  $2^{-\Delta CT}$  modificado (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Os ensaios enzimáticos foram realizados com kits específicos para cada enzima, de acordo com as instruções do fabricante. As leituras foram feitas em microplacas no aparelho Spectramax (Molecular Devices, USA). A análise estatística foi realizada através do teste *t de Student* ( $p \leq 0,05, 0,01$  e  $0,001$ ) utilizando o software SPSS 21.0 para Windows (SPSS Inc., EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos dados mostraram que as folhas altamente infestadas pelo ácaro (Figura 1) apresentam altos níveis de espécies reativas de oxigênio ( $O_2^-$  e  $H_2O_2$ ) e também de morte celular, o que é indicativo de estresse oxidativo bem estabelecido, como mostrado nas Figuras 2 e 3.

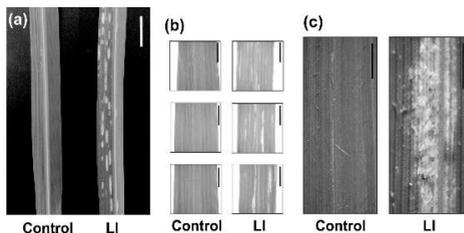


Figura 1. Características visuais de folhas de arroz controle (*control*) e altamente infestadas (LI, *late-infested*) com o ácaro *S. oryzae*.

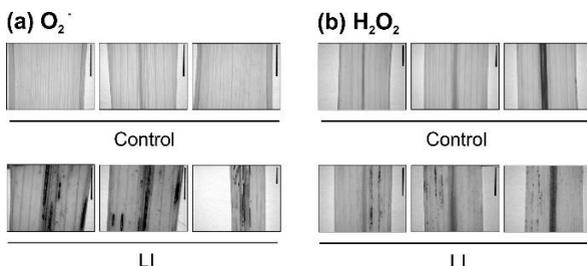


Figura 2. Coloração histoquímica de  $O_2^-$  (a) e  $H_2O_2$  (b) por *nitro blue tetrazolium* (NBT) e *diaminobenzidine* (DAB) em folhas de arroz controle e altamente infestadas.

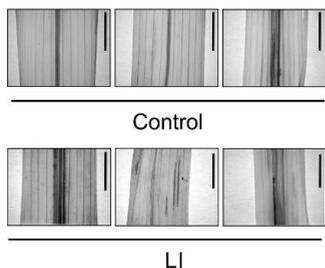


Figura 3. Perda da integridade da membrana plasmática em folhas de arroz controle e altamente infestadas, detectada por coloração histoquímica utilizando o reagente Evans Blue.

As folhas de arroz altamente infestadas também mostraram redução na quantidade de clorofila, indicando um processo de senescência bem estabelecido, o que foi confirmado pela alta expressão do gene *OsSGR* (marcador de senescência) (Figura 4).

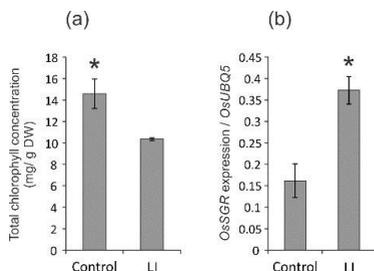


Figura 4. Concentração total de clorofila (a) e expressão do gene *OsSGR* (b) em folhas de arroz controle e altamente infestadas ( $p \leq 0,05$ ).

A análise por MudPIT levou à identificação de 184 proteínas diferencialmente expressas, sendo 83 exclusivas e 11 mais expressas nas folhas controle, além de 89 exclusivas e 1 mais expressa nas folhas altamente infestadas (com aproximadamente 180 ácaros por folha). Os dados de proteômica foram validados através de PCR em Tempo Real (RT-qPCR) e ensaios enzimáticos (dados não mostrados).

## CONCLUSÃO

Este é o primeiro trabalho avaliando a resposta de plantas de arroz à alta infestação de ácaros fitófagos *Schizotetranychus oryzae* utilizando uma abordagem proteômica. Os processos mostrados e a identificação de proteínas diferencialmente expressas são úteis para revelar os mecanismos moleculares envolvidos na resposta do arroz a altos níveis de infestação de ácaros. Além disso, produzem um conjunto de alvos potenciais interessantes para futuros estudos com o objetivo de promover a resistência aos ácaros fitófagos nas plantas de arroz, ou, pelo menos, para evitar o aumento da população destes ácaros.

## AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Centro Universitário UNIVATES.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEYS DA SILVA, W. O. et al. **Secretome of the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae* induced by the cuticle of the cotton pest *Dysdercus peruvianus* reveals new insights into infection.** Journal of Proteome Research, 2014.

BLASI, E. A. R. et al. **Alterations in rice, corn and wheat plants infested by phytophagous mite.** International Journal of Acarology, 2014.

BUFFON, G. et al. **Physiological and Molecular Alterations Promoted by *Schizotetranychus oryzae* Mite Infestation in Rice Leaves.** Journal of Proteome Research, 2015.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fuye4xq602wyiv80166sqf4qsy51i.html>>. Acesso em: 04 mai. 2017.

FAO, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Disponível em: <[http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Rice/Imagens/RMM/RMM\\_APR16.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Rice/Imagens/RMM/RMM_APR16.pdf)>. Acesso em: 03 mai. 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/defaulttab.shtm>>. Acesso em: 05 mai. 2017.

JAIN, M.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. **Molecular characterization and differential expression of cytokinin-responsive type-A response regulators in rice (*Oryza sativa*).** BMC Plant Biology, 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method.** Methods, 2001.

OERKE, E. C. **Crop losses to pests.** The Journal of Agricultural Science, 2006.

ROMERO-PUERTAS, M .C. et al. **Cadmium-induced subcellular accumulation of O<sup>2</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves.** Plant, Cell and Environment, 2004.

ROSS, C. W. **Plant Physiology Laboratory Manual.** Wadsworth Publishing Company, 1974.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. **Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method.** Nature Protocols, 2008.

SHI, J. et. al. **Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response.** Tree Physiology, 2010.

