

AValiação DO EFEITO DA LECTINA DE *Bauhinia variegata* SOBRE O CRESCIMENTO MICELIAL E ESPORULAÇÃO DE *Bipolaris oryzae*.

GUILHERME CARDOSO¹; ARTHUR SIQUIERA BRAHM²; CÂNDIDA JACOBSEN DE FARIAS³; LUCIANO DA SILVA PINTO⁴

¹ Doutorando em Biotecnologia- CDTec – UFPel- guilescardoso@gmail.com

² Graduando em Biotecnologia- CDTec – UFPel- arthurdsb@gmail.com

³ Professora Adjunta Faculdade Eliseu Maciel- FAEM, UFPel – crjacobsen@bol.com.br

⁴ Professor Adjunto Centro de Biotecnologia- CDTec – UFPel lspinto@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O fungo *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem [teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi)], agente etiológico da mancha-parda, causa os maiores danos nas lavouras gaúchas de arroz irrigado durante a germinação das sementes, causando a morte das plântulas e consequentemente redução no estande (RIBEIRO, 1988; BEDENDO, 1997; BALARDIN, 2003; FUNCK; KEMPF, 2008).

Os sintomas foliares ocasionados por *B. oryzae* são bastante característicos sendo observadas nas folhas lesões arredondadas de coloração marrom bem definida (FUNCK; KEMPF, 2008; FARIAS et al., 2011).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunogênica que se ligam especificamente e reversivelmente a diferentes carboidratos e glicoproteínas. Representam um grupo heterogêneo de proteínas oligoméricas variando em tamanho, estrutura, organização molecular e entre os sítios de ligação a carboidratos, e estão amplamente distribuídas em plantas, vírus, bactérias e animais (GERLACH, 2005).

Essas proteínas servem como importantes moléculas de reconhecimento em organismos, desempenhando um importante papel por apresentarem um amplo espectro de atividades biológicas. (PAN, 2010). Dentre as várias propriedades biológicas dessas proteínas, destaca-se um envolvimento no mecanismo de defesa das plantas contra ataque de insetos e fungos fitopatogênicos.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antifúngico de uma lectina denominada BvL, obtida de sementes de *B. variegata* sobre isolados de *B. oryzae*, oriundos de diferentes regiões produtoras de arroz do estado do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Para a obtenção da lectina BvL procedeu-se a homogeneização de farinha de semente de *B. variegata* com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6, NaCl 150 mM (1:20 m/v) por 3 h em temperatura ambiente. Após, realizou-se centrifugação, a fração protéica foi carregada em uma coluna de agarose-lactose (Sigma) equilibrada e eluída com o tampão de extração em uma taxa de fluxo de 30 mL.min⁻¹. Posteriormente, procedeu-se a lavagem das proteínas não ligadas à coluna, a lectina foi eluída com tampão glicina 50 mM pH 2,6 com NaCl 150 mM.

As frações foram coletadas manualmente e testadas para a atividade hemaglutinante em eritrócitos de coelho. As frações ativas foram associadas, dialisadas extensivamente contra água destilada, liofilizadas. A lectina liofilizada foi ressuspensa em 1ml de água ultrapura estéril para utilização no ensaio biológico.

Para a realização do ensaio biológico, isolados fúngicos *B. oryzae* de diferentes regiões orizícolas foram cultivados em placa de petri contendo BDA (batata+dextrose+agar) e incubados a $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h.

A atividade antifúngica foi avaliada utilizando o ensaio de inibição de expansão das hifas. Em placas de Petri estéreis com meio sólido BDA foi colocado um fragmento de micélio do patógeno alvo no centro da placa e discos estéreis de papel de filtro foram distribuídos sobre a mesma ao redor de cada micélio. Em cada disco, foram aplicadas soluções de lectinas em concentrações de 25; 50; 75 e 100 μg de lectina em 30 μL solução, como controle foi utilizado um disco contendo água ultrapura estéril e a atividade foi avaliada diariamente com a realização das medidas do halos de inibição.

Posteriormente, foi realizada a avaliação da esporulação das colônias. Realizou-se a raspagem superficial das colônias com auxílio de um pincel estéril e água destilada estéril. Após, procedeu-se a contagem de esporos em Câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa WinStat, versão 2.0 (MACHADO e CONCEIÇÃO, 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As preparações das lectinas de BvL nas concentrações de 25, 50, e 75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ não apresentaram diferença significativa estatisticamente para a inibição do crescimento do fungo em relação à testemunha (Fig. 1). Em alguns casos, a inibição do crescimento micelar tem a ver com a fase de crescimento do fungo, podendo em determinado estágio não existir, ao nível do micélio, hidratos de carbono envolventes que a lectina possa reconhecer (MELO et al,2005).

No entanto, a concentração de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ da proteína diferiu estatisticamente da testemunha, demonstrando potencial inibitório do crescimento micelial.

As lectinas apresentam a habilidade dos seus sítios de ligarem quitina. Tal propriedade provavelmente está envolvida na atividade antifúngica das lectinas contra *B. oryzae*. Pois, lectinas ligadoras de quitina afetam o crescimento e desenvolvimento fúngico por causarem distúrbios na síntese e deposição de quitina na parede celular (SELITRENNIKOFF, 2001).

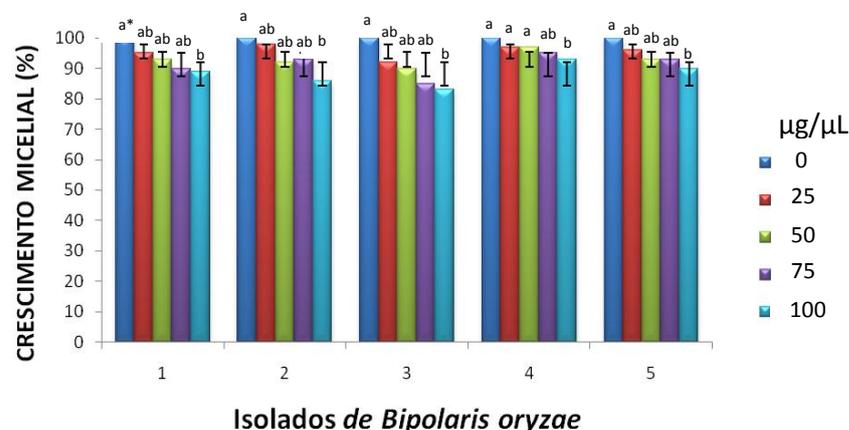


Figura 1: Efeito da lectina de *B. variegata* (BvL) sobre o crescimento micelial de isolados de *B. oryzae* de diferentes regiões do RS. *Os valores das médias com a

mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No eixo x, 1; 2; 3; 4; 5 representam ordenadamente a origem dos isolados de *B. oryzae* (1= Depressão Central, 2=Região da Campanha; 3= Planície Costeira Interna; 4= Planície Costeira Externa; 5= Rosário).

A avaliação atividade da lectina BvL sobre a esporulação do patógenos de *B. oryzae*, demonstrou atividade inibitória da esporulação em todos os tratamentos utilizados em relação à testemunha (Fig. 2). O tratamento com concentração de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ da proteína em todos os isolados avaliados das diferentes regiões orizícolas apresentou o melhor resultado na avaliação da esporulação, demonstrando potencial inibitório de até 90% da esporulação.

Podemos observar, que o comportamento dos isolados frente ao teste de inibição de esporulação não apresentaram diferenças entre si nas concentrações utilizadas, apesar da origem dos isolados serem de diferentes regiões e acreditar na variabilidade genética existente entre os isolados. Os isolados da Depressão Central e da Planície Costeira Externa não apresentaram diferença significativa estatisticamente nas diluições de 25 e 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

O fato de ocorrer a redução da esporulação do fungo, pode estar relacionada a atuação do lectinas ligadoras de quitina atuarem em algum estágio de desenvolvimento de esporulação do fungo (SELITRENNIKOFF, 2001).

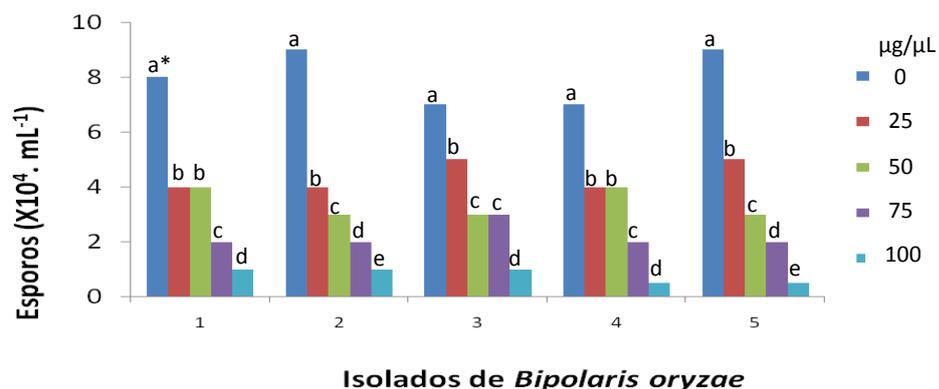


Figura 2: Efeito da lectina de *B. variegata* (BvL) sobre a esporulação de isolados de *B. oryzae* de diferentes regiões do RS. *Os valores das médias com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No eixo x, 1; 2; 3; 4; 5 representam ordenadamente a origem dos isolados de *B. oryzae* (1= Depressão Central, 2=Região da Campanha; 3= Planície Costeira Interna; 4= Planície Costeira Externa; 5= Rosário).

4. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que a lectina isolada de sementes de *B. variegata* apresenta grande potencial como insumo biotecnológico, podendo ser utilizado no controle da esporulação do fungo fitopatogênico *B. oryzae*.

No entanto, novos estudos devem ser realizados para verificar o potencial das lectinas frente à germinação dos esporos deste fungo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALARDIN, R. S. **Doenças do Arroz**. Santa Maria: Orium, 2003.

BEDENDO, I. P. Doenças do arroz (*Oryza sativa* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 85-99, 1997.

FARIAS, C. R. J.; AFONSO, A. P. S.; PIEROBOM, C. R.; DEL PONTE, E. M. Regional survey and identification of *Bipolaris* spp. associated with rice seeds in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 41, p. 369-372, 2011. <http://www.scielo.br/pdf/cr/v41n3/a882cr4060.pdf>

FUNCK, G.D.; KEMPF, D. **Doenças do Arroz Irrigado no Rio Grande do Sul**. Cachoeirinha: IRGA Divisão de Pesquisa. Equipe de Melhoramento, 2008.

GERLACH, D.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U.; SCHMIDT, K. H. *N*-acetyl-Dgalactosamine/ *N*-acetyl-D-glucosamine – recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, p. 223-232, 2005.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. Sistema de análise estatística para Windows. Winstat. Versão 2.0. UFPel, 2003.

PAN, J.S. TANG, X. G. **Isolation and characterization of a novel fucose-binding lectin from the gills of bighead carp (*Aristichthys nobilis*)** *Vet Immunol Immunopathol*, 133 (2010), pp. 154–164

RIBEIRO, A. S. **Doenças do arroz irrigado**. Pelotas, Embrapa-CPATB., 1998.

SELITRENNIKOFF, C. P. 2001. **Antifungal proteins**. *Appl Environ Microbiol* 67:2883-2894.