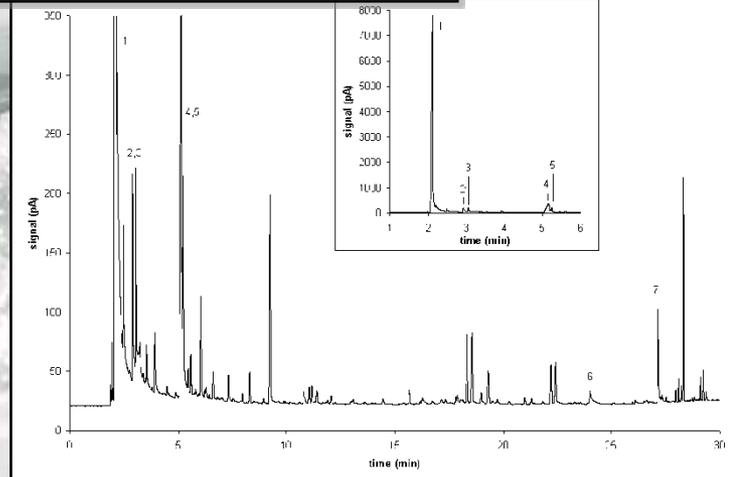
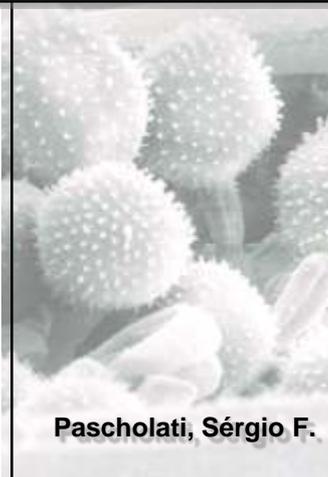
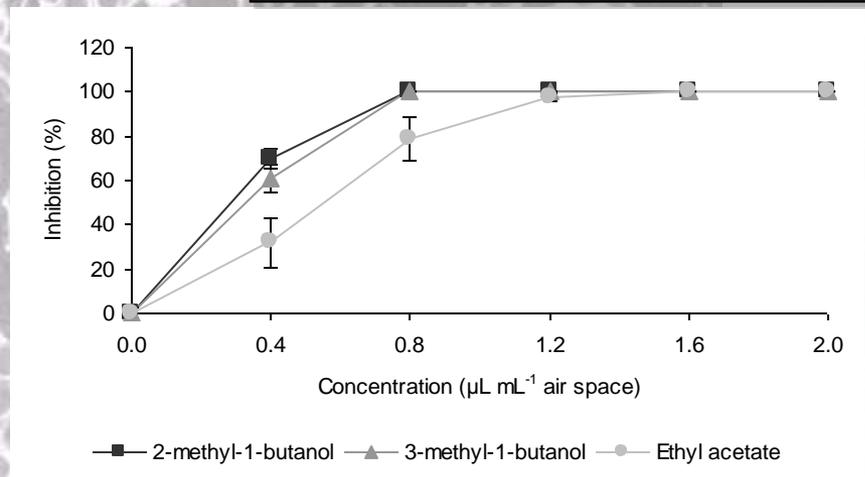


LFT - 5830

Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica



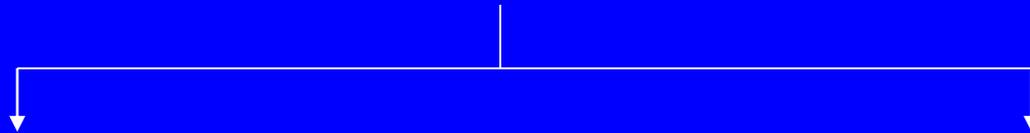


MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE
RESISTÊNCIA PÓS-FORMADOS

**ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO,
FITOALEXINAS, PROTEÍNAS
RELACIONADAS A PATOGÊNESE**

2) **Bioquímicos** ⇒ Inibição do crescimento

⇒ Condições adversas para a sobrevivência



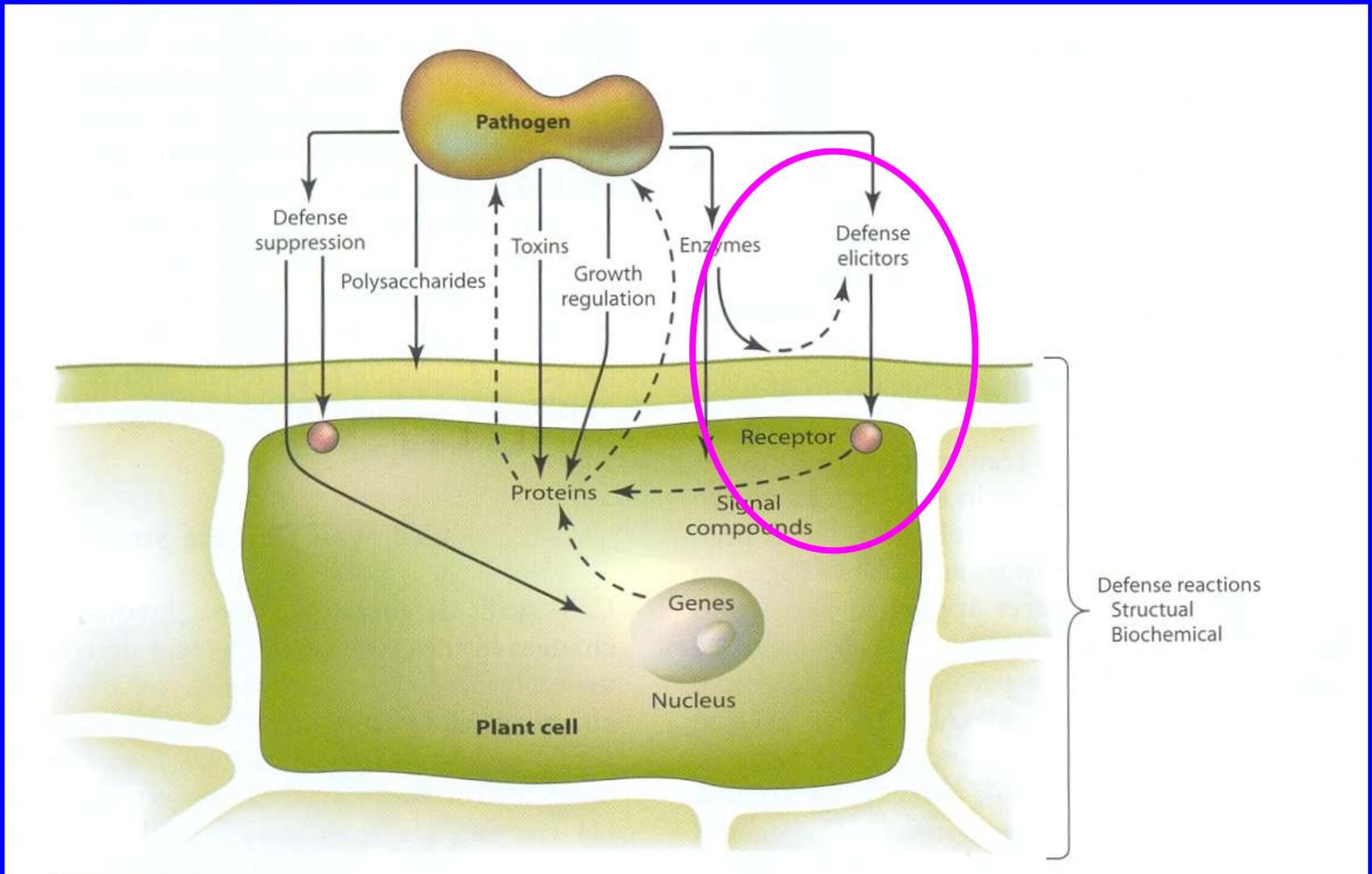
Pré-formados

- Fenóis
- Alcalóides
- Lactonas insaturadas
- Glicosídeos fenólicos
- Glicosídeos cianogênicos
- Fototoxinas
- Proteínas / peptídeos antimicrobianos

Pós-formados

- Fitoalexinas
- Espécies reativas de oxigênio
- Quitinases
- β -1,3-glucanases
- Proteínas-RP
- Peptídeos antimicrobianos

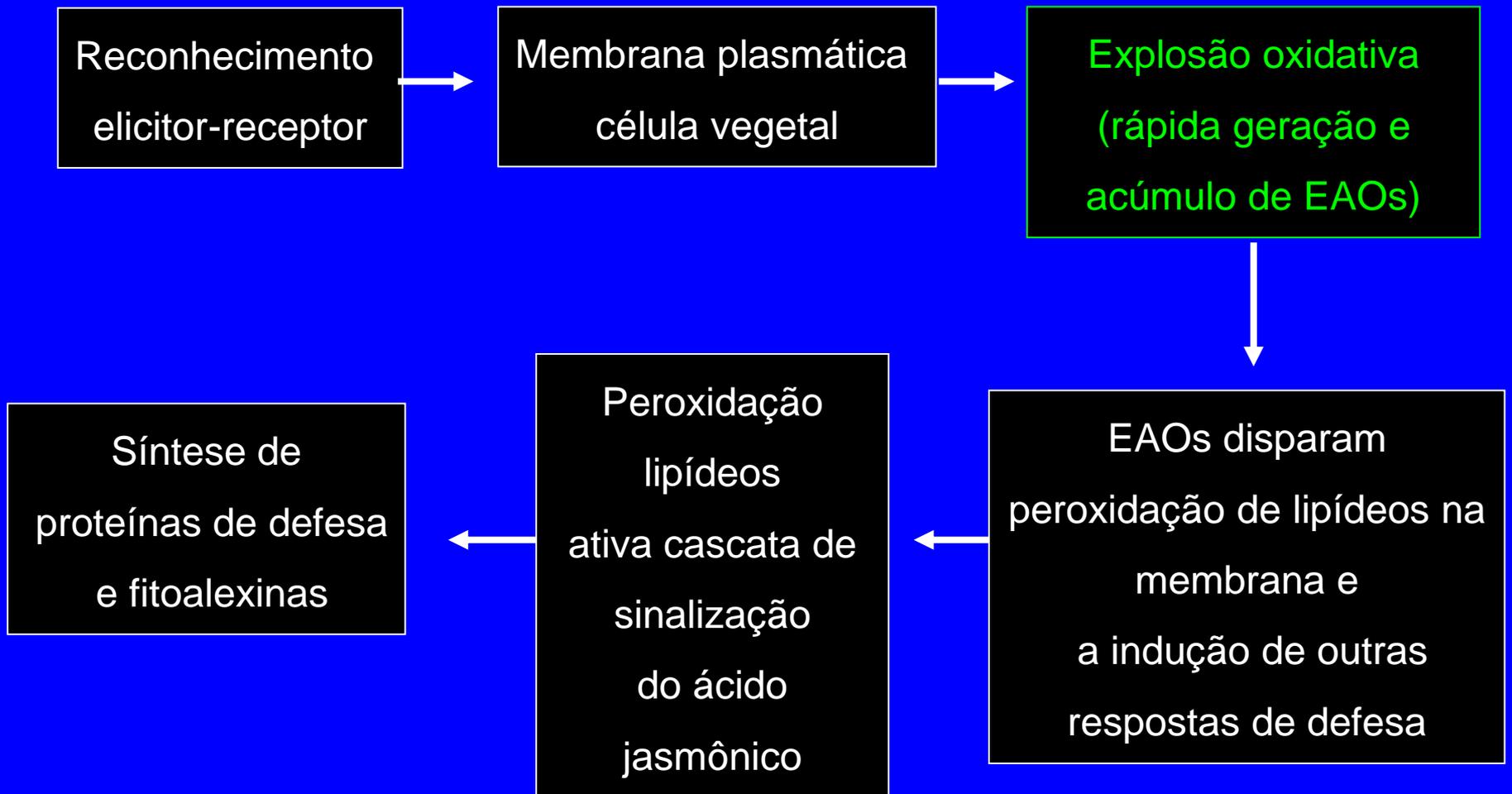
Espécies reativas de oxigênio (EAOs)

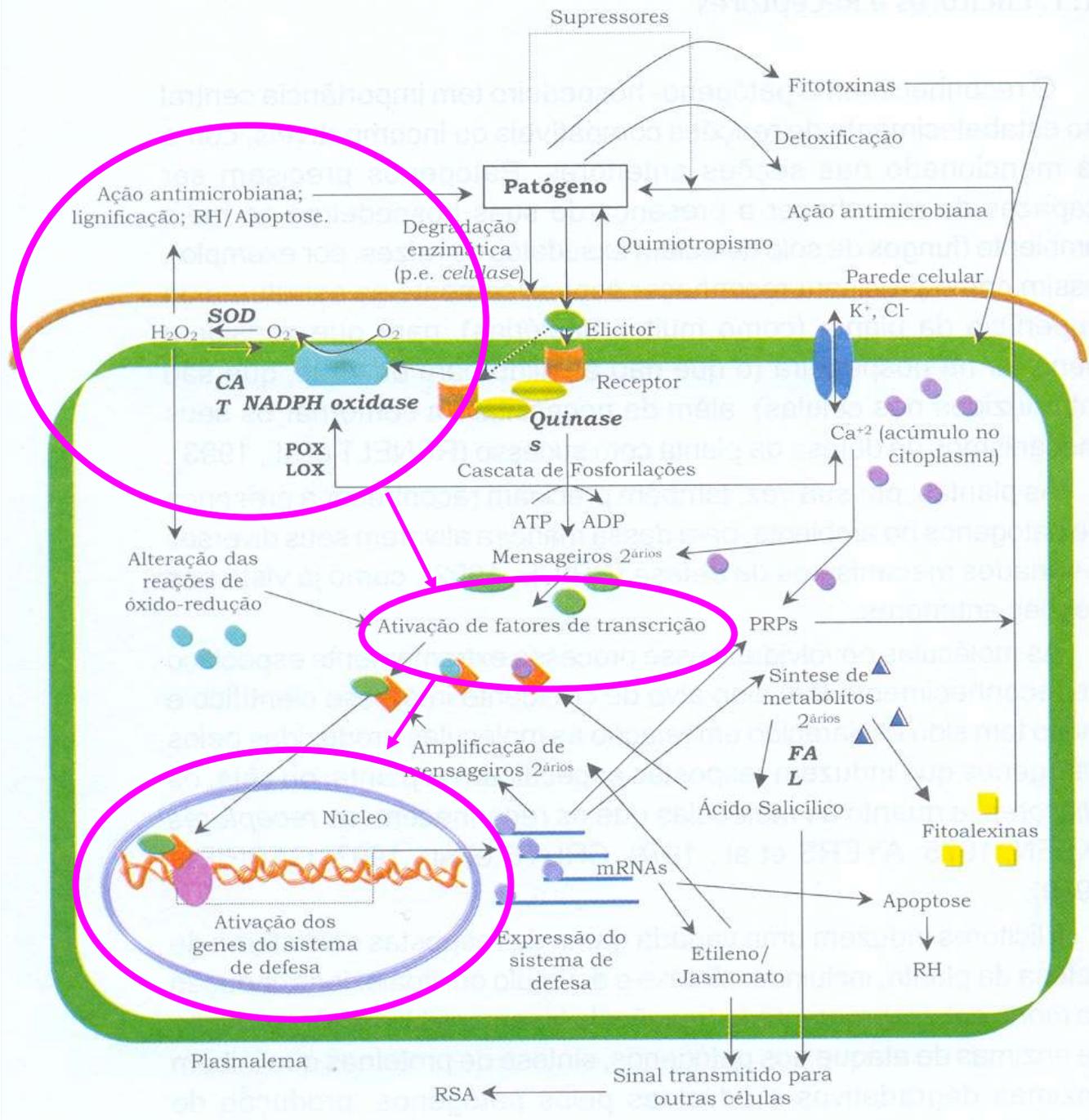


Interação de um patógeno com a célula da planta hospedeira

Espécies (re) ativas de oxigênio (EAOs)

(Reactive oxygen species (ROS))





Ação antimicrobiana; lignificação; RH/Apoptose.

Patógeno

Fitotoxinas

Detoxificação

Ação antimicrobiana

Parede celular

Elicitor

Receptor

Quinase

Cascata de Fosforilações

ATP → ADP

Mensageiros 2ários

Ca²⁺ (acúmulo no citoplasma)

K⁺, Cl⁻

SOD

H₂O₂ ← O₂

CA

T NADPH oxidase

POX

LOX

Alteração das reações de oxido-redução

Ativação de fatores de transcrição

PRPs

Síntese de metabólitos 2ários

FA

L

Ácido Salicílico

Fitoalexinas

Núcleo

Ativação dos genes do sistema de defesa

mRNAs

Expressão do sistema de defesa

Etileno/Jasmonato

Apoptose

RH

Plasmalema

Sinal transmitido para outras células

RSA

Queima ou explosão oxidativa

(Oxidative burst)

- Um dos fenômenos mais estudados em relação à interação planta-patógeno (1983 – primeiro relato EAOs x defesa vegetal)
- Produção de moléculas de H_2O_2 , ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila livres (OH^\cdot)
- Substâncias citotóxicas / causam danos oxidativos em lipídeos, enzimas e ácidos nucleicos \longrightarrow podem causar morte celular
(RH)

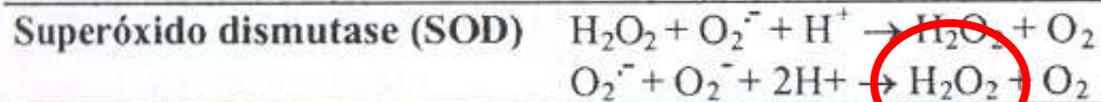
Espécies reativas de oxigênio

- Superóxido (O_2^-) é formado pela adição de um elétron
- Pode ser produzido através de reação catalisada pela **NADPH oxidase**



Espécies reativas de oxigênio

- Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)



Espécies reativas de oxigênio

- Radicais livres (OH^\cdot) são os mais potentes oxidantes
- Geralmente produzidos através da reação abaixo (oxidação de moléculas orgânicas ou redução de metais)



Reações que controlam o nível das EAOs

TABELA 1 - Equações químicas ilustrando as principais enzimas chaves catalisando a formação e degradação de espécies ativas de oxigênio (EAO's) em plantas

Superóxido dismutase (SOD)	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Ascorbato Peroxidase (APX)	$\text{APX} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Composto I} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{Composto I} + \text{Ascorbato} \rightarrow \text{Composto II} + \text{MDA}^{\cdot(*)}$ $\text{Composto II} + \text{Ascorbato} \rightarrow \text{APX} + \text{MDA}^{\cdot(*)} + \text{H}_2\text{O}$
Catalase	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

MDA^{·(*)}: Radical monodehidroascorbato



Química da produção de EAO's

Oxigênio molecular (O_2)

Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Peróxido de hidrogênio
(H_2O_2)

Radicais de hidroxila livres
(OH^{\cdot})

+ e^- , H^+

+ e^- , H^+

+ e^- , H^+

Níveis oxidativos das Espécies Ativas de Oxigênio

(Matysik *et al.*, 2002)

Espécies reativas de oxigênio

- Podem estar envolvidas na resposta de defesa contra patógenos
- Induzem a síntese de fitoalexinas, participam na síntese de lignina e etileno, ativam genes de resistência
- Exibem atividade antimicrobiana direta
- Inibição da produção de EAOs favorece a compatibilidade

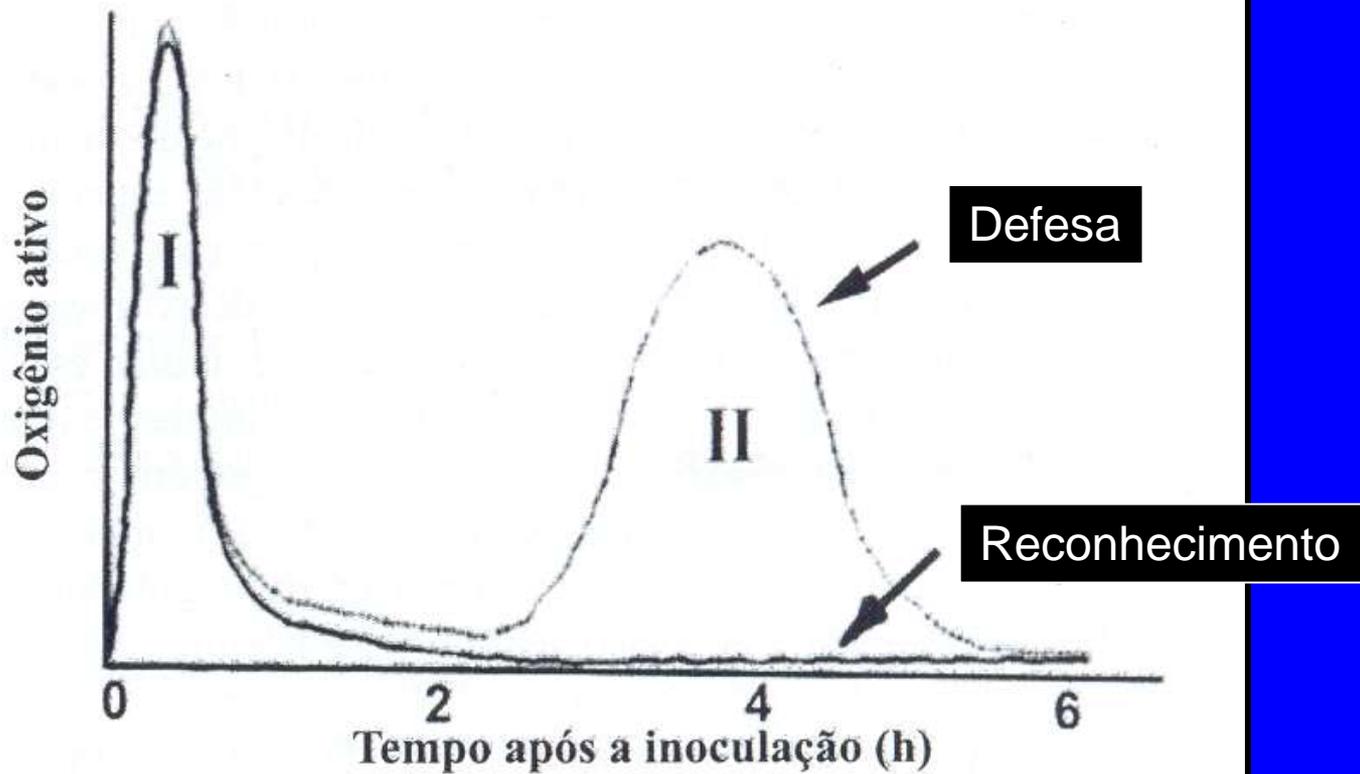
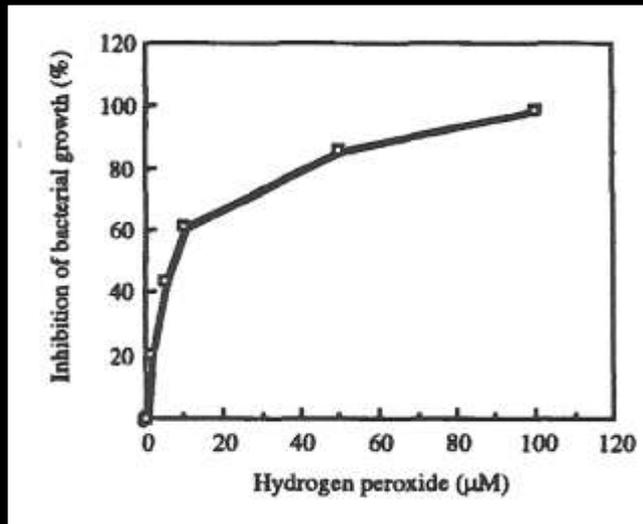


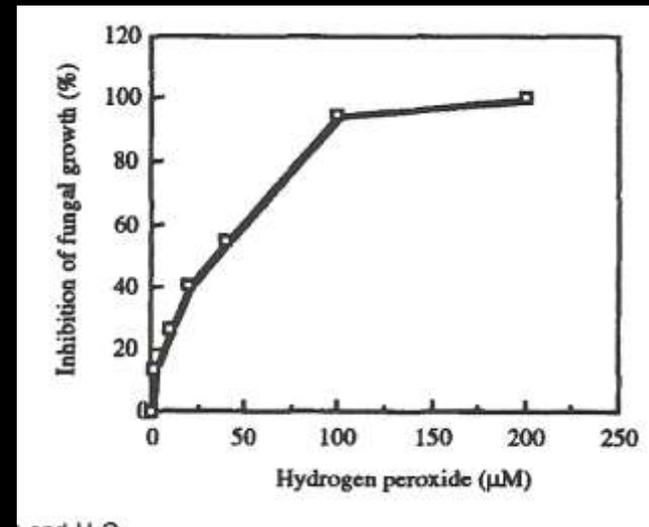
FIG. 2 - Fases da produção de EAO's na interação planta-bactéria (adaptado de Baker & Orlandi, 1995).

Funções das EAO's na planta

- Efeito tóxico direto do H_2O_2 ao patógeno (antifúngico e antibacteriano)



Erwinia carotovora sp. *carotovora*



Phytophthora infestans

O H_2O_2 a 0,1 mM inibiu completamente o crescimento de *E. carotovora* e mais de 95% do crescimento de *P. infestans*

(Wu et al. 1995)

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Bioquímicos pós-formados

FITOALEXINAS

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Bioquímicos pós-formados

FITOALEXINAS

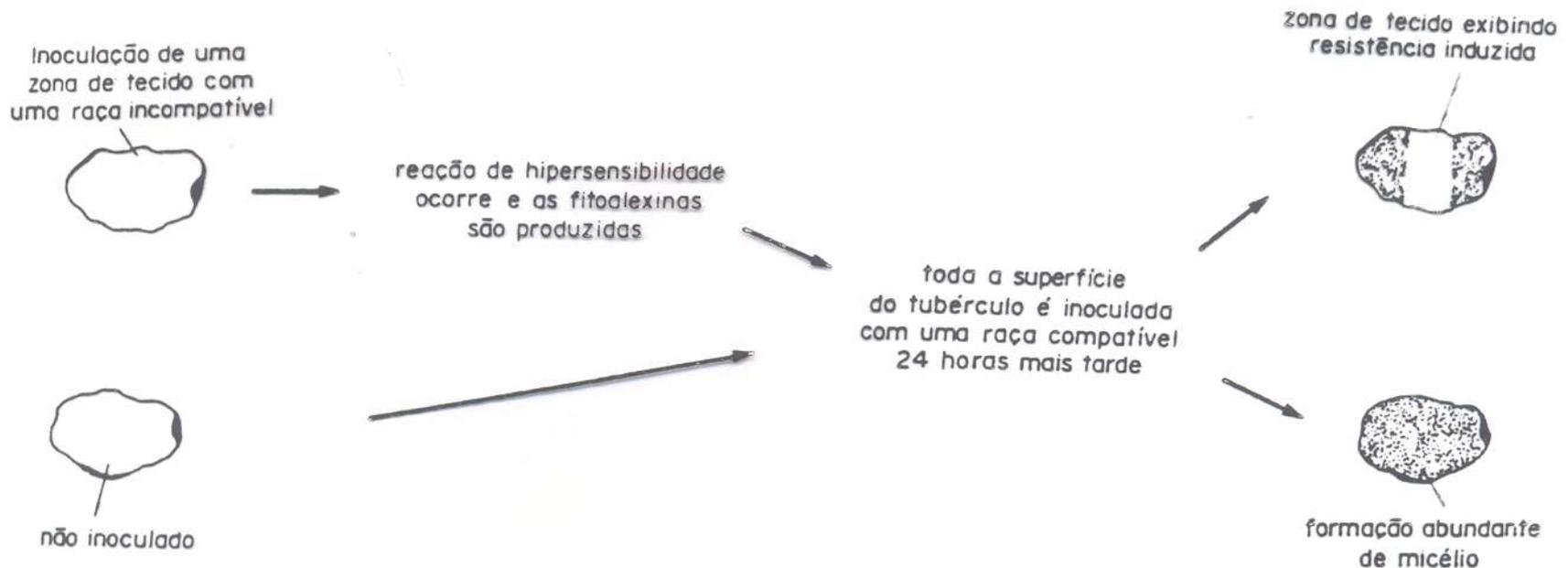


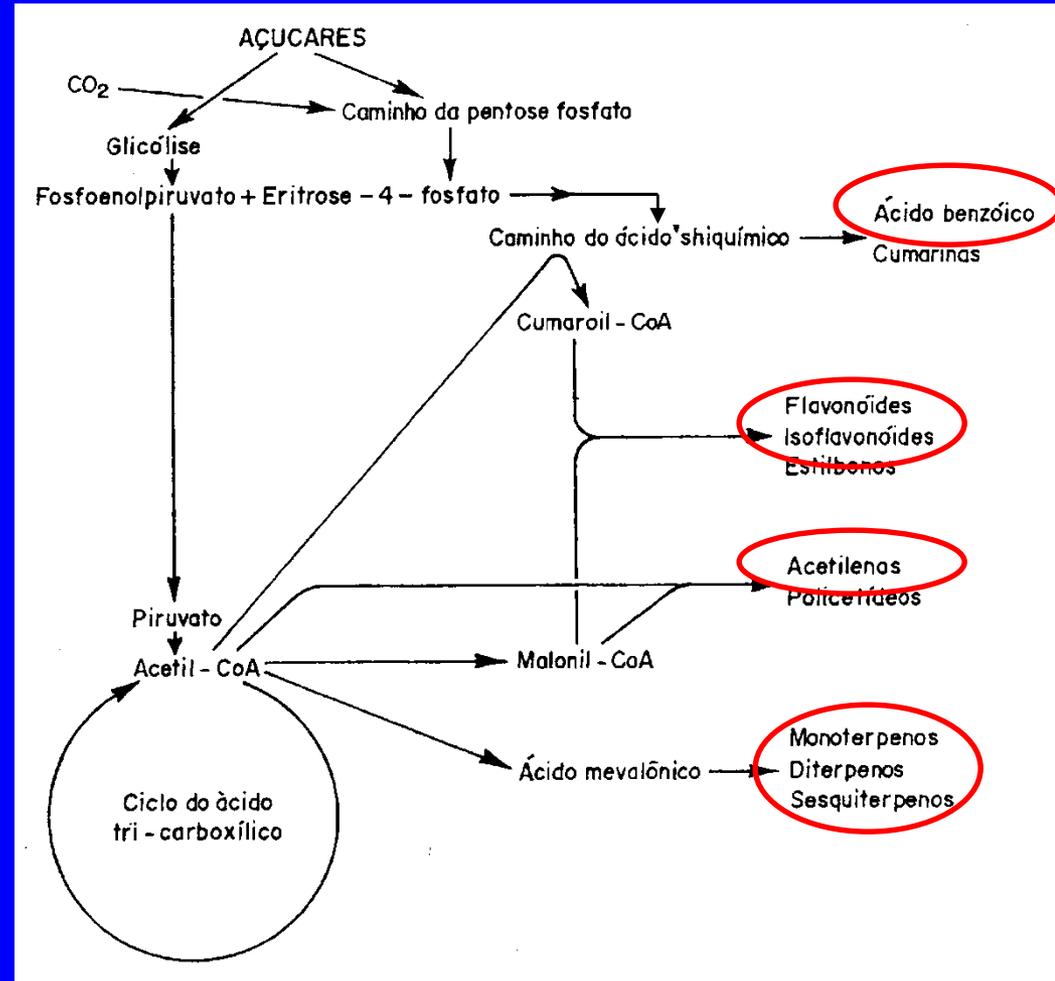
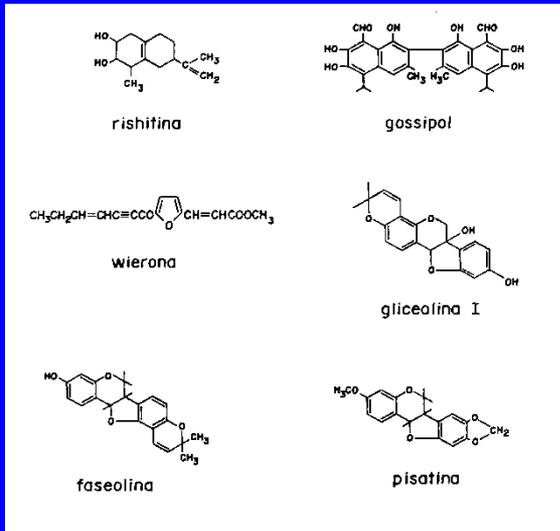
Figura 22.15 - Indução de resistência local em tubérculos de batata em resposta à inoculação com raça incompatível de *Phytophthora infestans* seguida, 24 horas mais tarde, por inoculação com uma raça compatível do fungo (adaptado de Goodman et al., 1986).

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Bioquímicos pós-formados

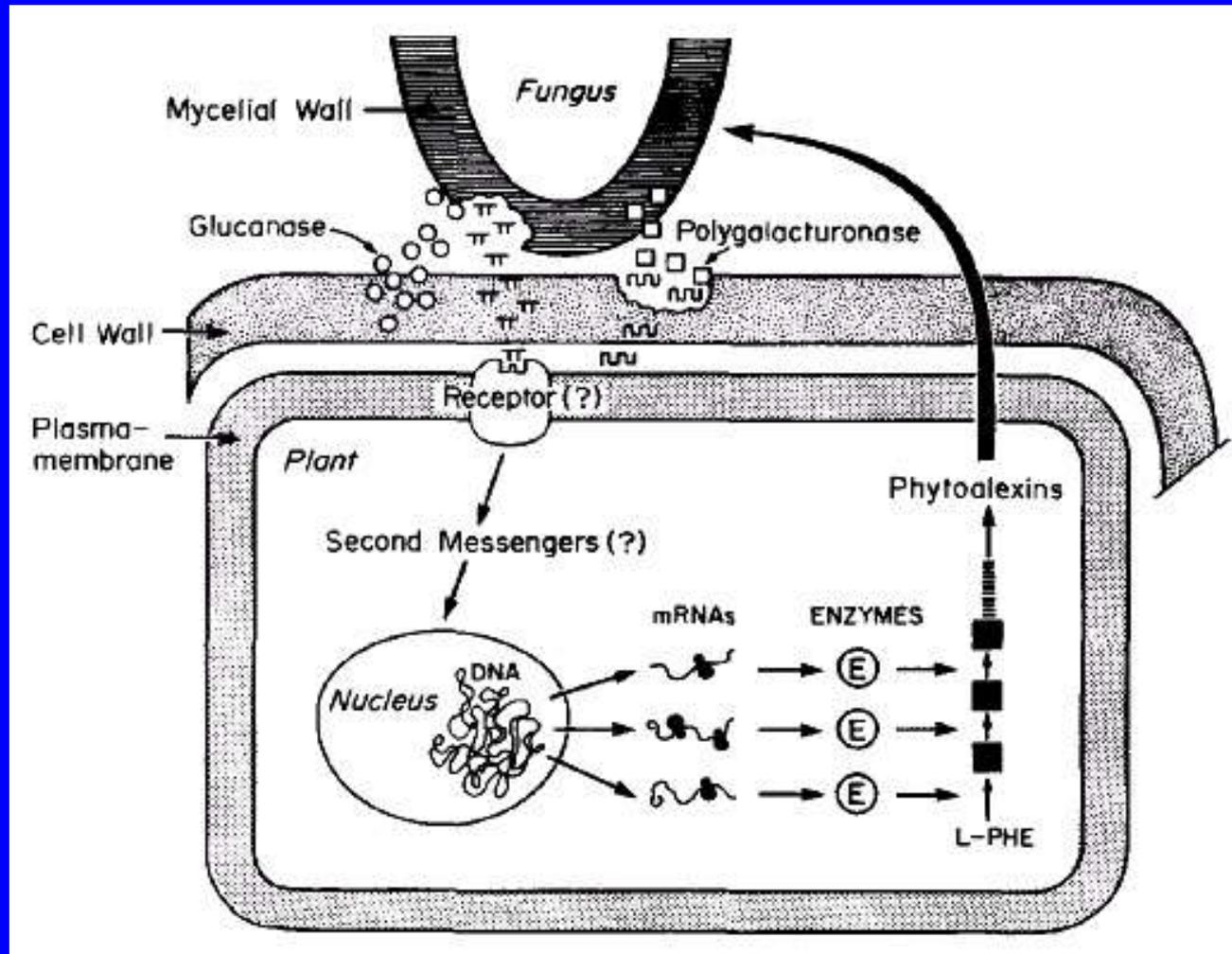
⇒ Fitoalexinas

- Compostos antimicrobianos de baixa massa molecular, sintetizados pelas plantas, que acumulam em células vegetais em resposta à infecção microbiana.



Síntese de fitoalexinas

- Modelo hipotético para a síntese de fitoalexinas



Phenylalanine

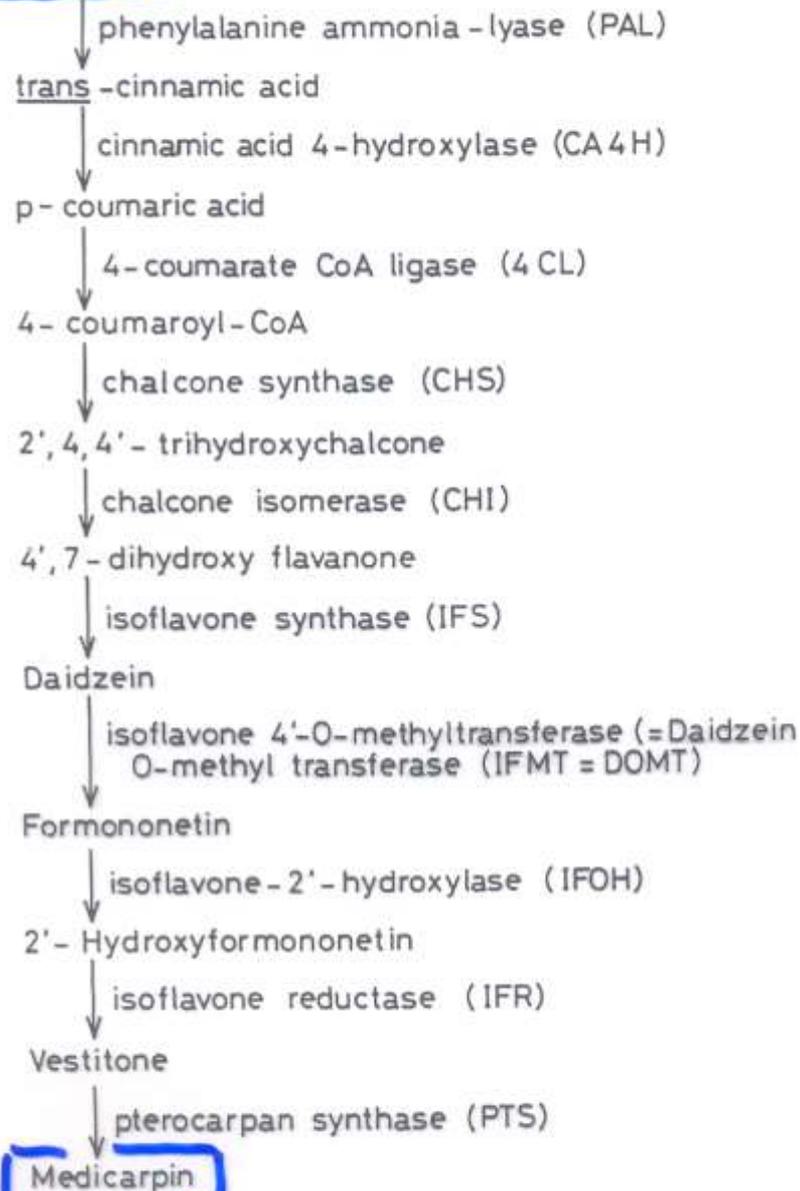
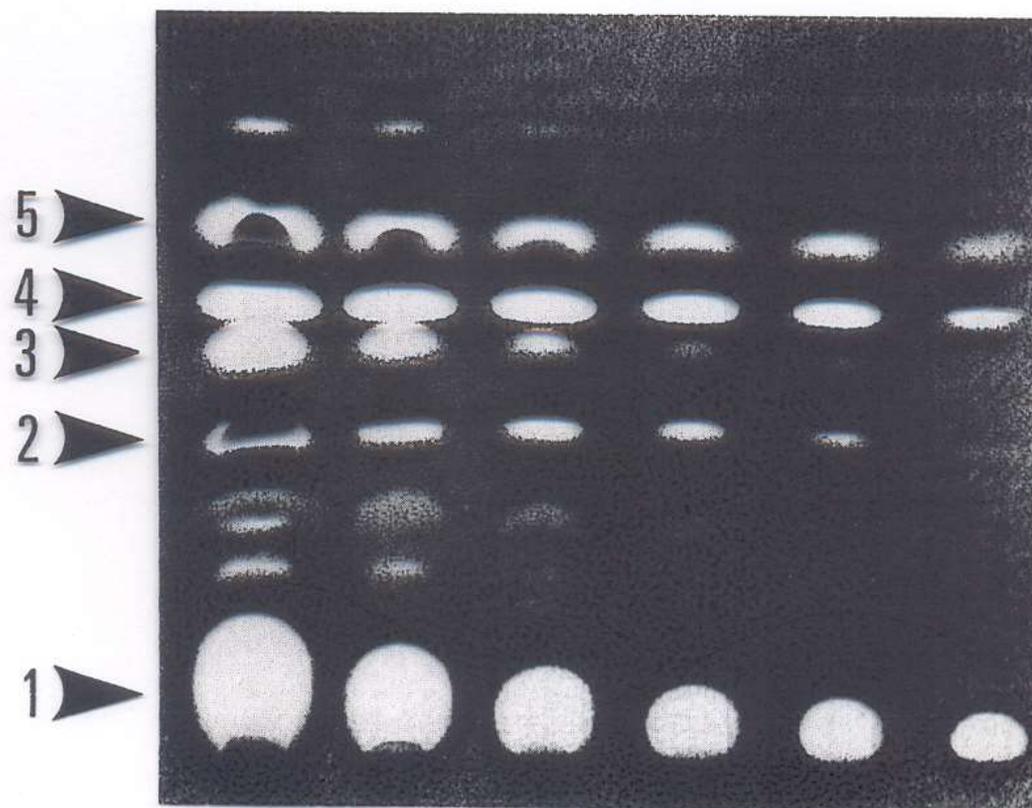


Figure 3 Biosynthesis of medicarpin in alfalfa. (From Dalkin et al., 1990a.)

Tabela 22.2 - Influência de agentes bióticos e abióticos no acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos estiolados de sorgo. (Modificado de Freitas et al., 1994).

Agentes	Cultivares	$\mu\text{g} / \text{grama de peso fresco}$		
		Luteolinidina	Apigeninidina	Éster de apigeninidina
<i>Abióticos</i>				
Luz U.V.	SC 175-14	-	0,129	-
	Brandes	-	0,064	-
	DK-18	0,406	0,028	0,027
HgCl ₂	SC 175-14	-	0,251	-
	Brandes	-	0,072	-
	DK-18	0,458	0,050	-
<i>Bióticos</i>				
<i>Bipolaris carbonum</i>	SC 175-14	-	0,059	+
	Brandes	-	0,180	-
	DK-18	0,378	0,011	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DK-18	0,412	0,031	+
Thuricide	SC 175-14	-	0,062	+
	DK-18	0,786	0,054	+
<i>Controle</i>				
Água	SC 175-14	-	-	-
	Brandes	-	-	-
	DK-18	-	-	-

Fig. 9.9 Bioassay of phytoalexins produced by broad bean leaves in response to inoculation with the fungus *Botrytis cinerea*. Extracts from 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 and 0.0125 g of tissue were collected 3 days after inoculation and separated by thin-layer chromatography. Antifungal compounds were then located by spraying the plate with a spore suspension of the dark-coloured fungus *Cladosporium herbarum*. Phytoalexins identified are (1) wyerone acid, (2) medicarpin, (3) wyerol, (4) wyerone epoxide and (5) wyerone. (From Hargreaves *et al.* 1977.)



⇒ Mecanismos de ação

- Alterações na membrana plasmática
- Alterações no metabolismo respiratório

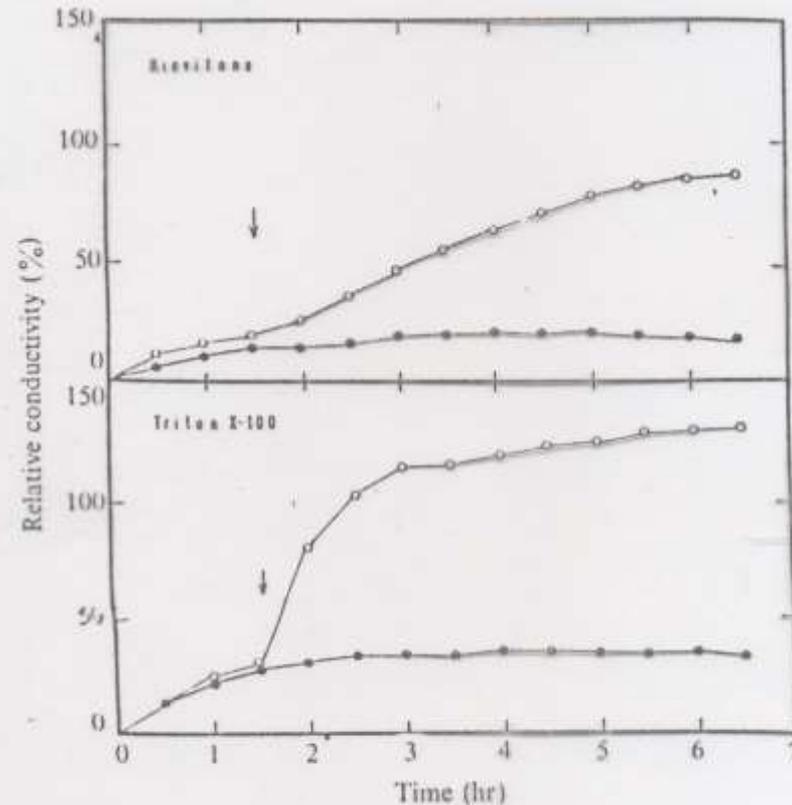
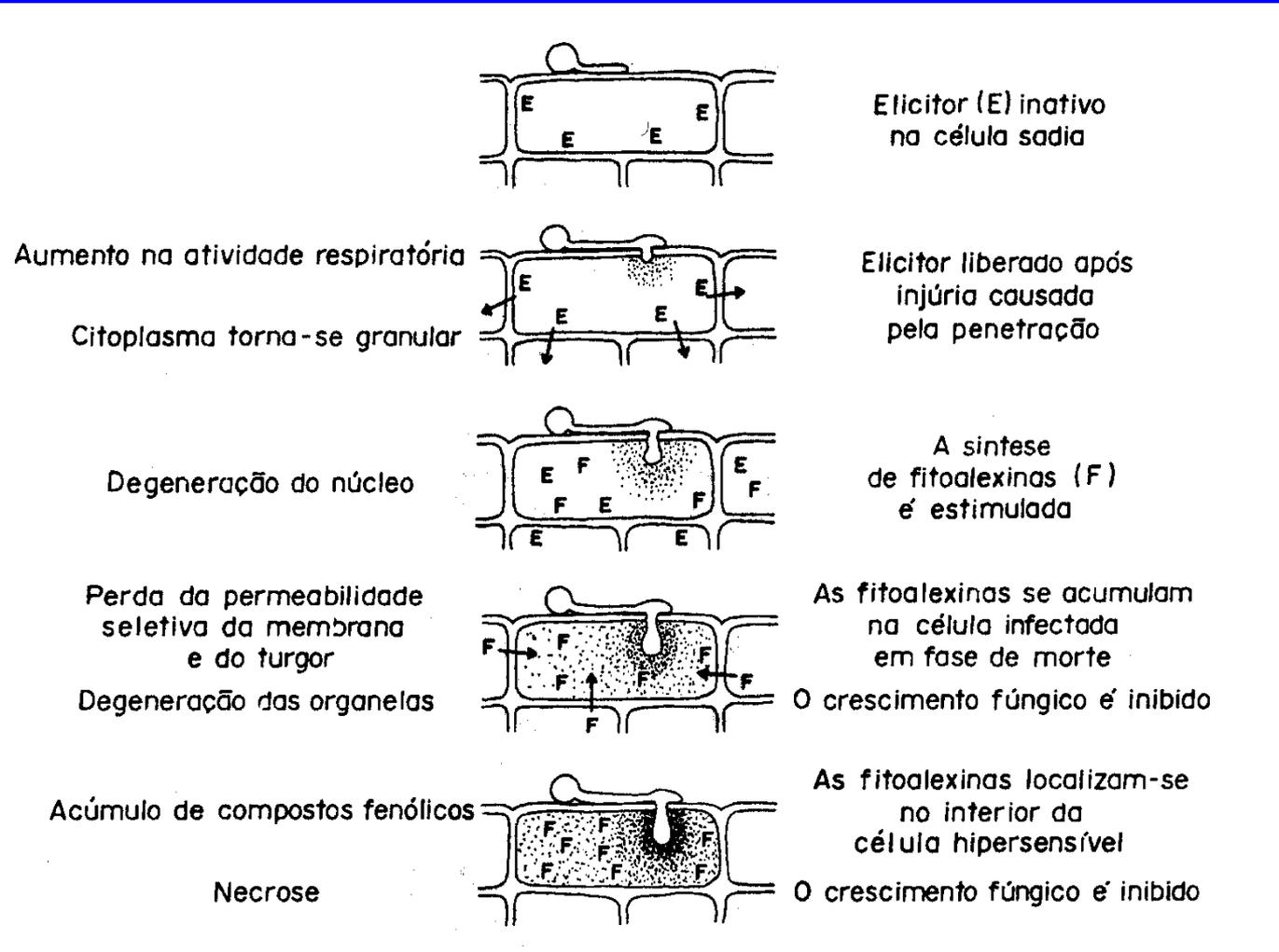


Figure 7.10 The effects of kevitona and Triton X-100 on the relative conductivities of 0.2 M sucrose solution bathing mycelial pads of *Rhizoglyphus solani*. The pads (1/ml) were agitated in 10 ml sucrose solution before adding kevitona (75 µg/ml in 0.5% ethanol) or 0.05% Triton X-100 (arrow). Agitation was continued and the conductivities of the solutions were monitored for the next 5 h; incubation was at room temperature, ca. 22°C. Each point is the mean of two replicates. Treatments (○—○); controls (●---●).

Resposta de hipersensibilidade



Elicitor (E) inativo na célula sadia

Aumento na atividade respiratória
Citoplasma torna-se granular

Elicitor liberado após injúria causada pela penetração

Degeneração do núcleo

A síntese de fitoalexinas (F) é estimulada

Perda da permeabilidade seletiva da membrana e do turgor
Degeneração das organelas

As fitoalexinas se acumulam na célula infectada em fase de morte

O crescimento fúngico é inibido

Acúmulo de compostos fenólicos

As fitoalexinas localizam-se no interior da célula hipersensível

Necrose

O crescimento fúngico é inibido

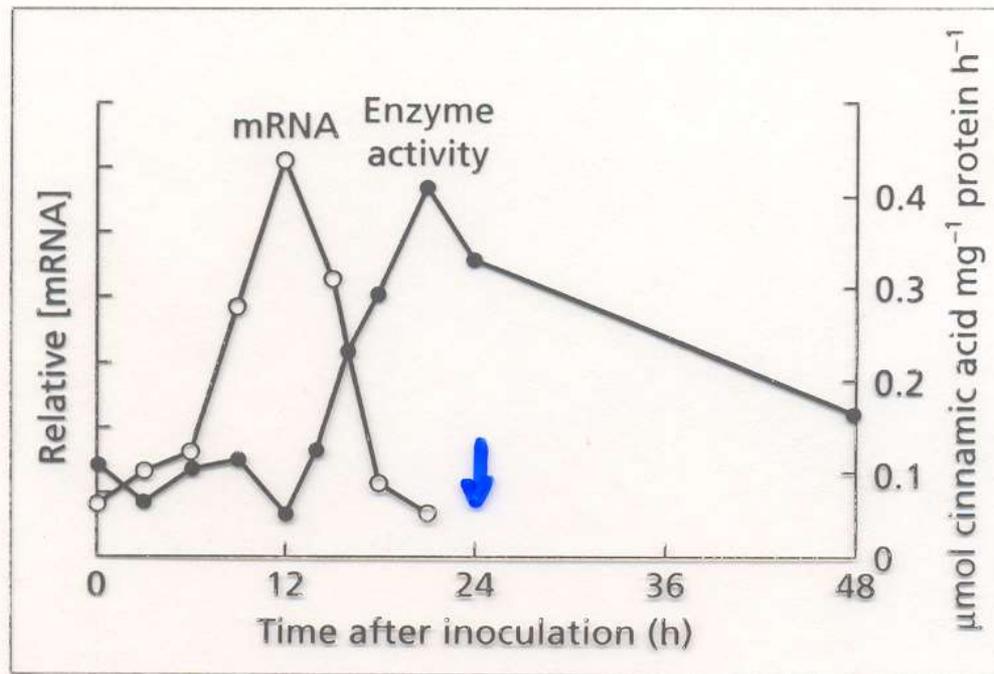


Fig. 9.14 Timing of induction of phenylalanine ammonia lyase (PAL) mRNA and enzyme activity in the hypersensitive response of *Phaseolus* bean to an incompatible race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Relative mRNA concentration was determined by probing dot blots and northern blots with a cDNA probe for bean PAL. Chalcone synthase mRNA showed a similar pattern of induction. PAL enzyme activity increased in parallel with mRNA concentration but about 6 h later. Antibacterial isoflavonoids were detectable by 24 h after inoculation. (After Slusarenko *et al.* 1991; by permission of Oxford University Press.)

Isoflavonóides - caminho metabólico de síntese

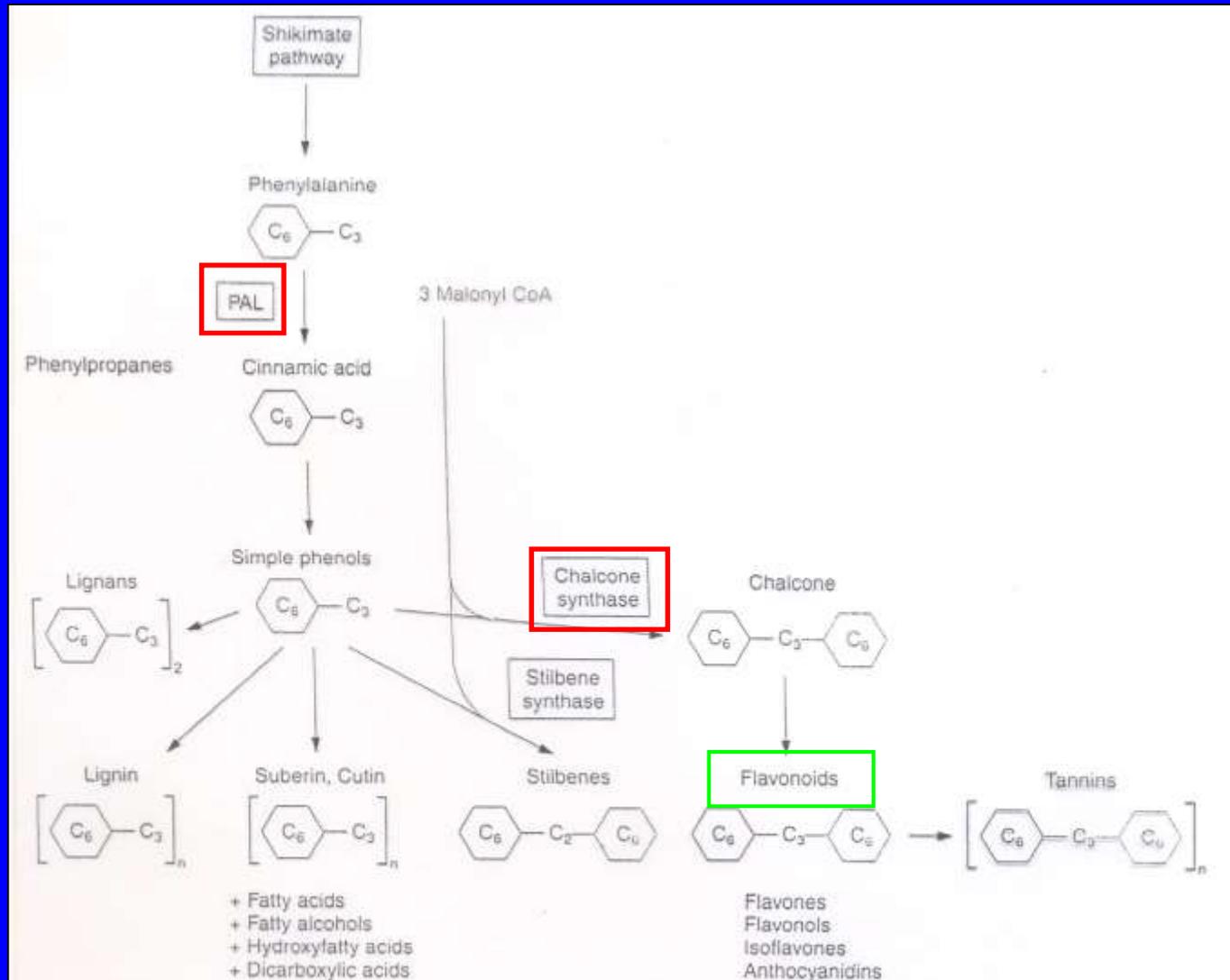
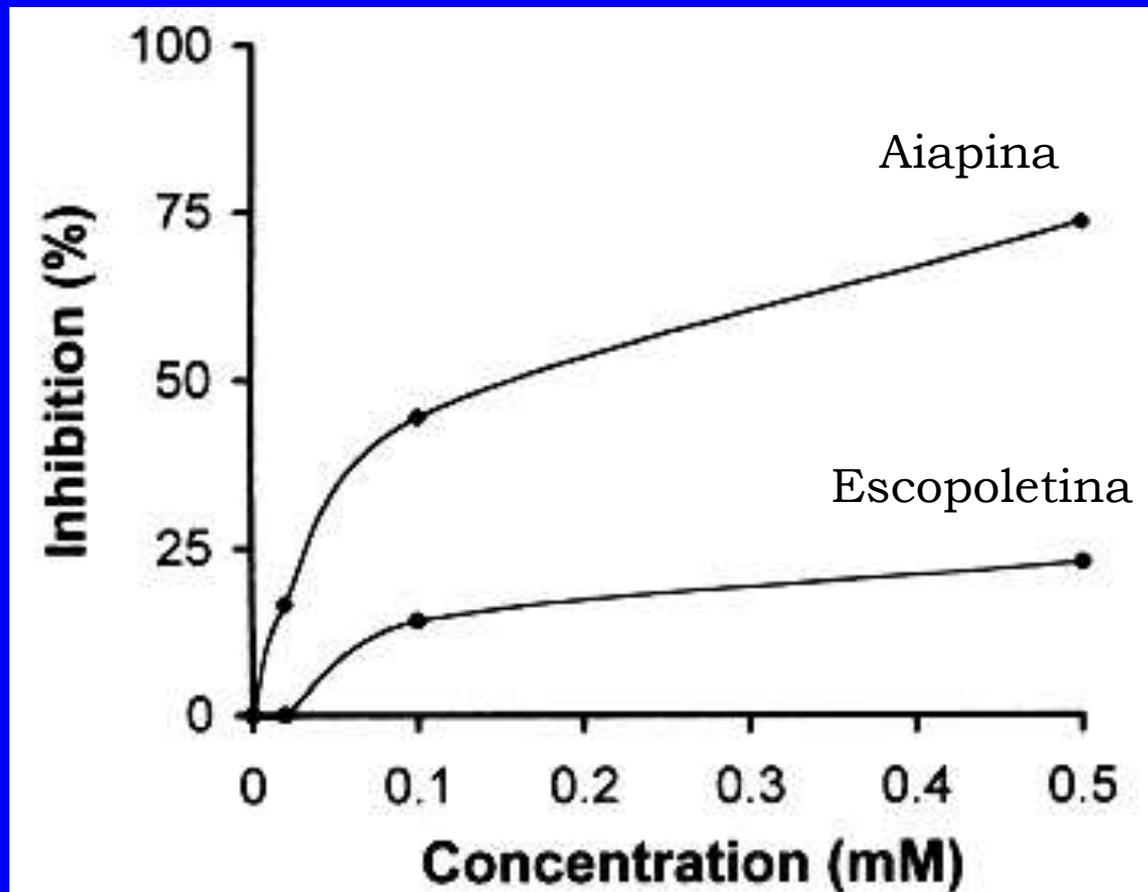


Figure 18.1 Overview of the products of phenylpropanoid metabolism. Cinnamic acid, formed from phenylalanine by phenylalanine ammonia lyase (PAL) is precursor for the various phenylpropanoids. In some plants 4-hydroxycinnamic acid is formed from tyrosine in an analogous way (not shown in the figure). An additional aromatic ring is formed either by chalcone synthase or stilbene synthase from three molecules of malonyl CoA.

Fitoalexinas x resistência

- Atividade antifúngica de duas cumarinas de girassol no crescimento *Sclerotinia sclerotiorum*



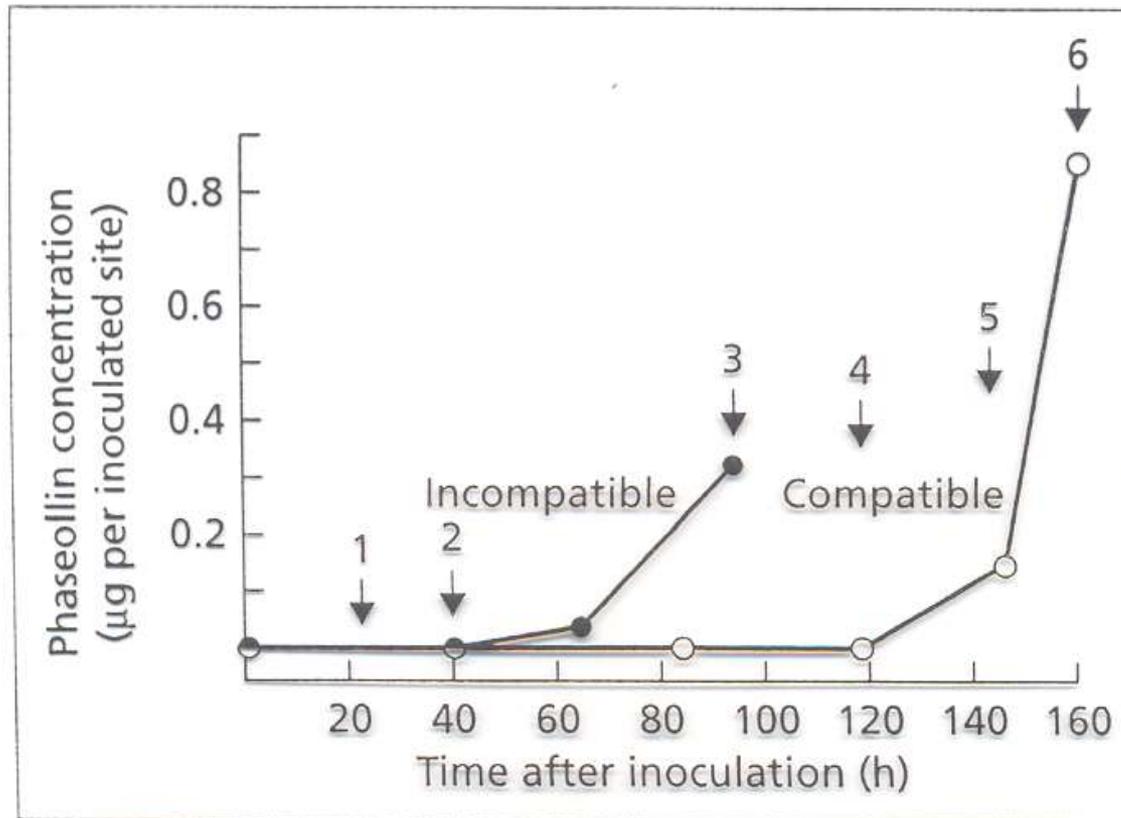


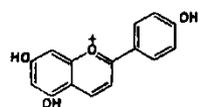
Fig. 9.10 Accumulation of phaseollin in beans inoculated with compatible and incompatible races of the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Stage 1, appressorium formation; stage 2, hypersensitive response visible; stage 3, hypersensitive response complete; stage 4, 1% lesions in compatible combination; stage 5, 80% lesions; stage 6, 100% lesions. (Data from Bailey & Deverall 1971.)

Mecanismos de Defesa

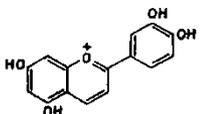
Fitoalexinas

Sorgo
X
*Colletotrichum
sublineolum*

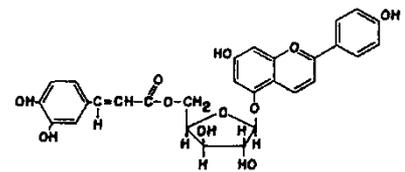
(Ralph L. Nicholson)



apigeninidina



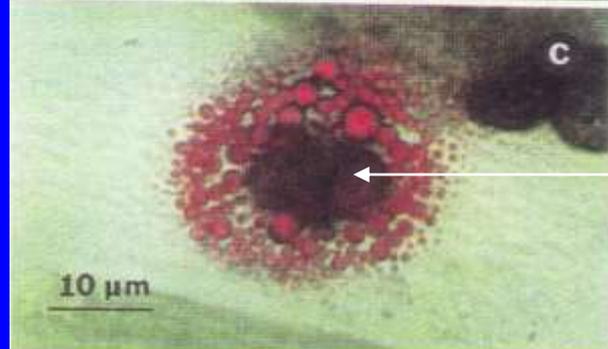
luteolinidina



éster do ácido cafeico com arabinosil 5-O-apigeninidina



22 horas



30 horas

Apressório



45 horas

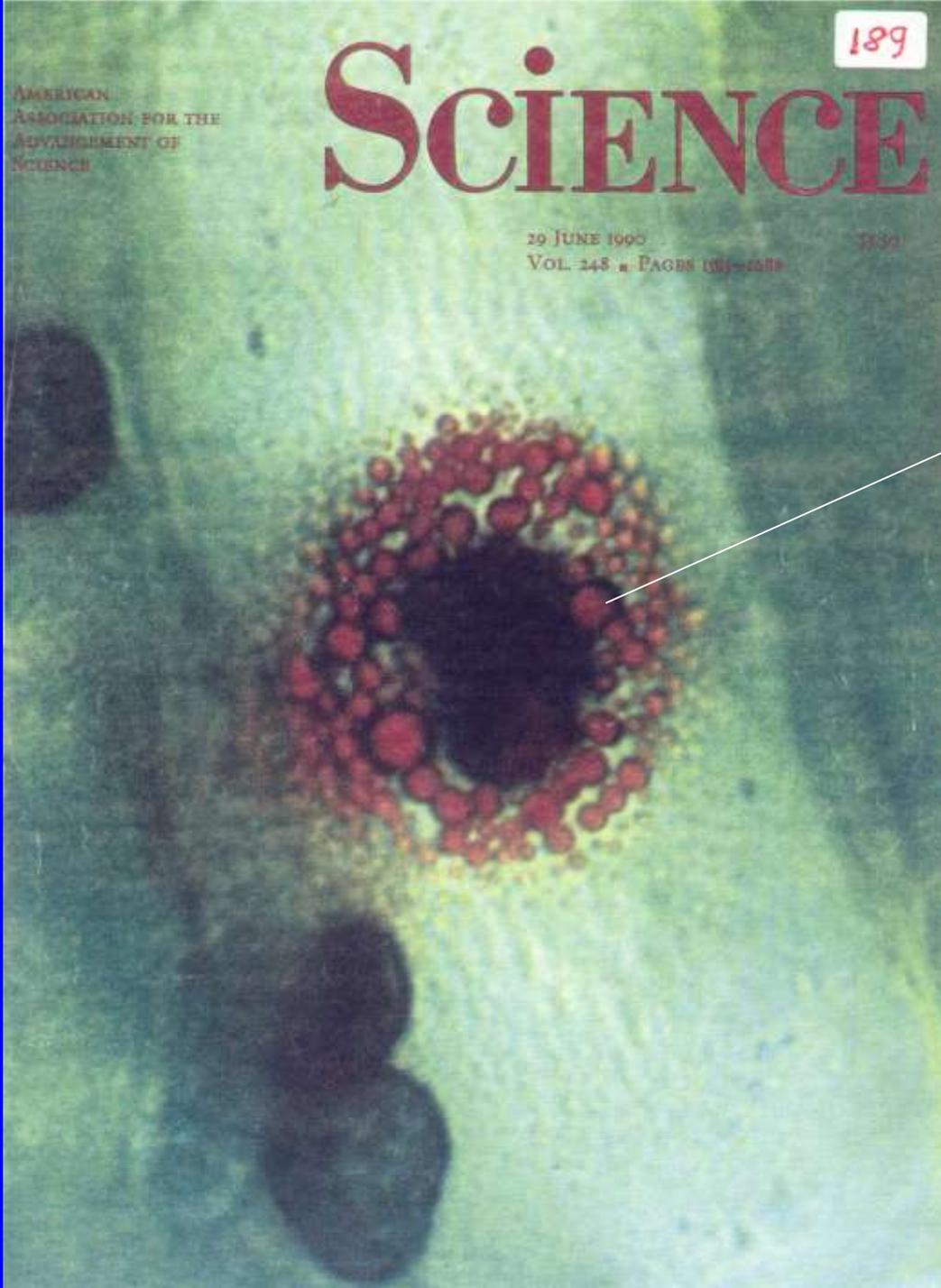
AMERICAN
ASSOCIATION FOR THE
ADVANCEMENT OF
SCIENCE

SCIENCE

189

29 JUNE 1999
VOL. 248 # PAGES 181-248

11.00



Concentração
fitoalexinas
150 mM

9 uM inibe
C. graminicola
in vitro

Boxe 35.1 - Fitoalexinas e resistência de plantas às doenças

Inúmeras evidências relacionam a produção de fitoalexinas em plantas com a expressão da resistência a fitopatógenos (Keen, 1990):

- as plantas resistentes, invariavelmente, produzem altos níveis de fitoalexinas quando comparadas às plantas suscetíveis. O aumento na concentração das fitoalexinas é acompanhado de alterações nas enzimas-chaves das vias biossintéticas de produção das mesmas;

Boxe 35.1 - Fitoalexinas e resistência de plantas às doenças

Inúmeras evidências relacionam a produção de fitoalexinas em plantas com a expressão da resistência a fitopatógenos (Keen, 1990):

- as plantas resistentes, invariavelmente, produzem altos níveis de fitoalexinas quando comparadas às plantas suscetíveis. O aumento na concentração das fitoalexinas é acompanhado de alterações nas enzimas-chaves das vias biossintéticas de produção das mesmas;
- a remoção de fitoalexinas de um sítio de infecção diminui a resistência da planta, enquanto que a aplicação de fitoalexinas aumenta a resistência;

Boxe 35.1 - Fitoalexinas e resistência de plantas às doenças

Inúmeras evidências relacionam a produção de fitoalexinas em plantas com a expressão da resistência a fitopatógenos (Keen, 1990):

- as plantas resistentes, invariavelmente, produzem altos níveis de fitoalexinas quando comparadas às plantas suscetíveis. O aumento na concentração das fitoalexinas é acompanhado de alterações nas enzimas-chaves das vias biossintéticas de produção das mesmas;
- a remoção de fitoalexinas de um sítio de infecção diminui a resistência da planta, enquanto que a aplicação de fitoalexinas aumenta a resistência;
- a liberação de moléculas que atuam como supressores da produção de fitoalexinas, por fitopatógenos, diminui a resistência da planta;

Boxe 35.1 - Fitoalexinas e resistência de plantas às doenças

Inúmeras evidências relacionam a produção de fitoalexinas em plantas com a expressão da resistência a fitopatógenos (Keen, 1990):

- as plantas resistentes, invariavelmente, produzem altos níveis de fitoalexinas quando comparadas às plantas suscetíveis. O aumento na concentração das fitoalexinas é acompanhado de alterações nas enzimas-chaves das vias biossintéticas de produção das mesmas;
- a remoção de fitoalexinas de um sítio de infecção diminui a resistência da planta, enquanto que a aplicação de fitoalexinas aumenta a resistência;
- a liberação de moléculas que atuam como supressores da produção de fitoalexinas, por fitopatógenos, diminui a resistência da planta;
- a aplicação de inibidores químicos da síntese de proteínas ou inibidores de enzimas das vias biossintéticas de fitoalexinas diminui a produção destas e compromete a resistência da planta;

Boxe 35.1 - Fitoalexinas e resistência de plantas às doenças

Inúmeras evidências relacionam a produção de fitoalexinas em plantas com a expressão da resistência a fitopatógenos (Keen, 1990):

- as plantas resistentes, invariavelmente, produzem altos níveis de fitoalexinas quando comparadas às plantas suscetíveis. O aumento na concentração das fitoalexinas é acompanhado de alterações nas enzimas-chaves das vias biossintéticas de produção das mesmas;
- a remoção de fitoalexinas de um sítio de infecção diminui a resistência da planta, enquanto que a aplicação de fitoalexinas aumenta a resistência;
- a liberação de moléculas que atuam como supressores da produção de fitoalexinas, por fitopatógenos, diminui a resistência da planta;
- a aplicação de inibidores químicos da síntese de proteínas ou inibidores de enzimas das vias biossintéticas de fitoalexinas diminui a produção destas e compromete a resistência da planta;
- elicitores específicos, isolados a partir de uma raça do patógeno, mostram-se capazes de induzir a síntese de fitoalexinas na planta tão eficientemente quanto a raça a partir da qual os elicitores foram isolados;

Boxe 35.1 - Fitoalexinas e resistência de plantas às doenças

Inúmeras evidências relacionam a produção de fitoalexinas em plantas com a expressão da resistência a fitopatógenos (Keen, 1990):

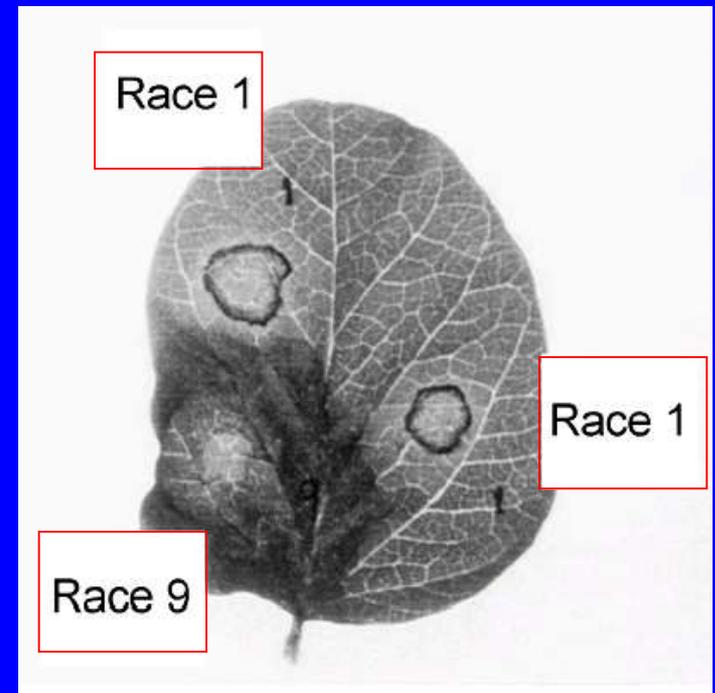
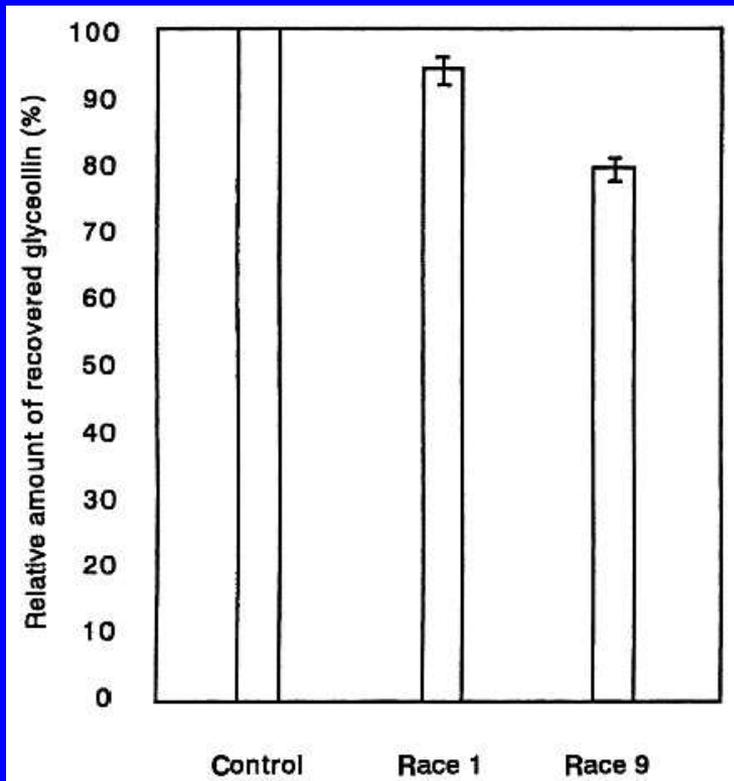
- as plantas resistentes, invariavelmente, produzem altos níveis de fitoalexinas quando comparadas às plantas suscetíveis. O aumento na concentração das fitoalexinas é acompanhado de alterações nas enzimas-chaves das vias biossintéticas de produção das mesmas;
- a remoção de fitoalexinas de um sítio de infecção diminui a resistência da planta, enquanto que a aplicação de fitoalexinas aumenta a resistência;
- a liberação de moléculas que atuam como supressores da produção de fitoalexinas, por fitopatógenos, diminui a resistência da planta;
- a aplicação de inibidores químicos da síntese de proteínas ou inibidores de enzimas das vias biossintéticas de fitoalexinas diminui a produção destas e compromete a resistência da planta;
- elicitores específicos, isolados a partir de uma raça do patógeno, mostram-se capazes de induzir a síntese de fitoalexinas na planta tão eficientemente quanto a raça a partir da qual os elicitores foram isolados;
- as fitoalexinas acumulam-se no local e no tempo apropriados para causar a inibição do patógeno nos tecidos do hospedeiro.

Como patógenos superam o efeito das fitoalexinas?

- Acúmulo lento de fitoalexinas
- Difusão de fitoalexinas
- Supressão acúmulo de fitoalexinas
- Degradação pelo próprio hospedeiro

Como patógenos superam o efeito das fitoalexinas ?

- Soja (*Glycine max*) cv. Harosoy 63: resistente a raça 1 e suscetível a raça 9 de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*



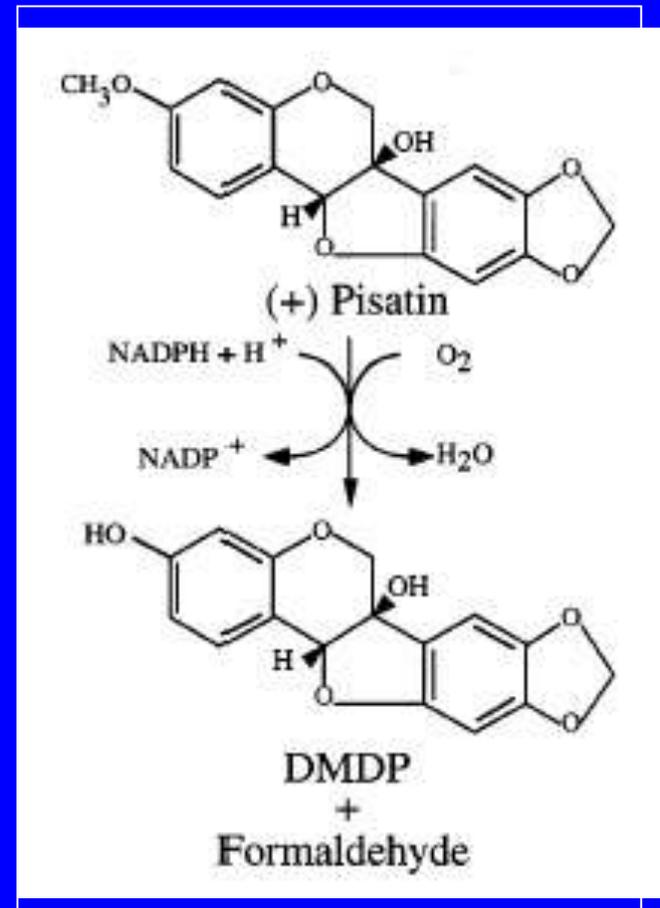
Controle: 1 mL de solução de gliceolina (20 µg/mL)

(Abe et al., 2002)

Como patógenos superam o efeito das fitoalexinas ?

- Detoxificação de fitoalexinas
 - Pisatina demetilase detoxifica pisatina
 - *Nectria hematococca*
 - *Ascochita pisi*
 - *Phoma pinodella*
 - *Micospharella pinodes*

Demetilação



PROTEÍNAS RELACIONADAS A PATOGÊNESE (PR-proteins)

“Proteínas-RP” = proteínas induzidas no hospedeiro após a infecção com patógenos
(podem compreender 10% das proteínas solúveis da folha)

PROTEÍNAS RELACIONADAS A PATOGÊNESE (PR-proteins)

“Proteínas-RP” = proteínas induzidas no hospedeiro após a infecção com patógenos
(podem compreender 10% das proteínas solúveis da folha)

1970 – folhas de fumo exibindo reação de hipersensibilidade ao TMV – 10 proteínas isoladas

1993 – 33 proteínas isoladas / 31 caracterizadas / 25 encaixavam nos 5 grupos existentes

2007 – 17 grupos com sub-grupos
(centenas de proteínas isoladas / caracterizadas)

Características

Boxe 35.2 - Algumas características físico-químicas das proteínas-RP

Essas características são comuns a maior parte das proteínas-RP (modificado de Schwan-Estrada et al., 2008):

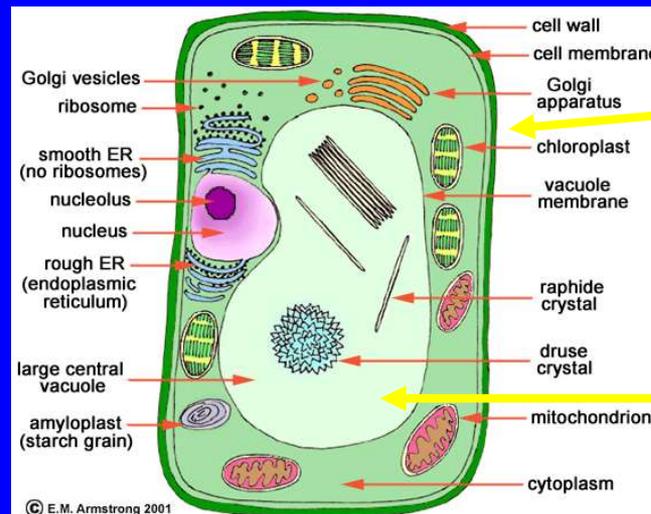
- São estáveis em pH baixo (em torno de 2,8);
- Mostram-se resistentes à ação de enzimas proteolíticas;
- Geralmente ocorrem como monômeros, com massa molecular variando de 5 a 70 kDa;
- Podem estar localizadas no vácuolo, parede celular e/ou apoplasto;
- São estáveis sob altas temperaturas (60 – 70°C).

Características

Boxe 35.2 - Algumas características físico-químicas das proteínas-RP

Essas características são comuns a maior parte das proteínas-RP (modificado de Schwan-Estrada et al., 2008):

- São estáveis em pH baixo (em torno de 2,8);
- Mostram-se resistentes à ação de enzimas proteolíticas;
- Geralmente ocorrem como monômeros, com massa molecular variando de 5 a 70 kDa;
- Podem estar localizadas no vácuolo, parede celular e/ou apoplasto;
- São estáveis sob altas temperaturas (60 – 70°C).



PR ácidas

PR básicas

Classificação das “Proteínas-RP”

Classificadas em 17 famílias de acordo com:

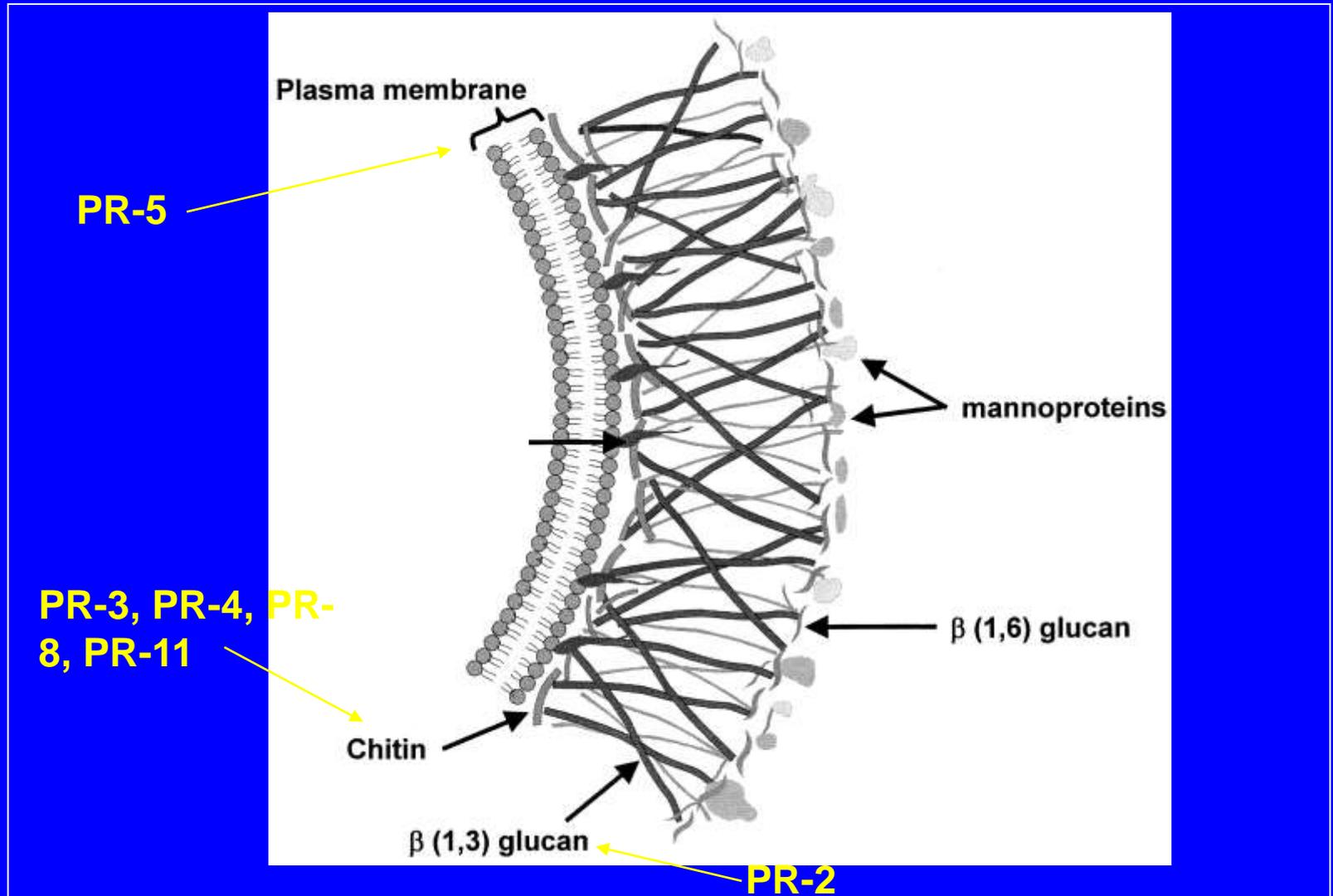
- Massa molecular
- Composição de amino-ácidos
- Reações serológicas

Tabela 35.5 – Famílias e principais propriedades das proteínas-RP
(modificado de van Loon et al., 2006; Sels et al., 2008)

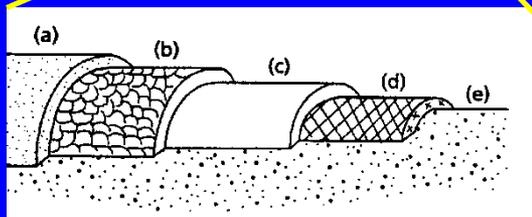
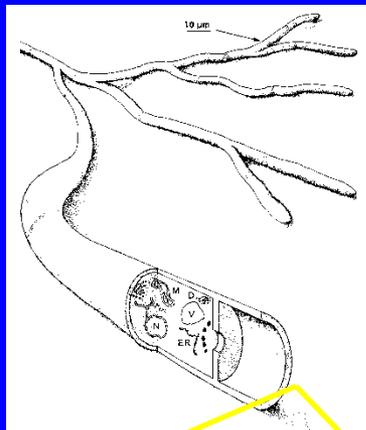
Família	Membro tipo	Massa molecular (kDa)	Propriedades	Alvo microbiano provável
RP-1	Fumo PR-1a	15	Antifúngico	Desconhecido
RP-2	Fumo PR-2	30	β -1,3-glucanase	β -1,3-glucana
RP-3	Fumo P, Q	25-30	Quitinase (Classes I, II, IV-VII)	Quitina
RP-4	Fumo “R”	15-20	Quitinase (Classes I, II)	Quitina
RP-5	Fumo S	25	Similar a taumatina	Membrana
RP-6	Tomate Inibidor I	8	Inibidor de proteinase	- ^a
RP-7	Tomate P ₆₉	75	Endoproteinase	- ^a
RP-8	Pepino quitinase	28	Quitinase (Classe III)	
RP-9	Fumo “peroxidase formadora de lignina”	35	Peroxidase	- ^a
RP-10	Salsa “PR-1”	17	Similar a ribonuclease	- ^a
RP-11	Fumo quitinase “classe V”	40	Quitinase (Classe I)	Quitina
RP-12	Rabanete Rs-AFP3	5	Defensina	Membrana
RP-13	Arabidopsis THI2.1	5	Tionina	Membrana
RP-14	Cevada LTP4	9	Proteína de transferência de lipídeo	Membrana
RP-15	Cevada OxOa	20	Oxidase do oxalato	- ^a
RP-16	Cevada OxOLP	20	Similar a oxidase do oxalato	- ^a
RP-17	Fumo PRp27	27	Desconhecida	- ^a

^a Atividade antimicrobiana *in vitro* não relatada.

Exemplos de mecanismos de ação

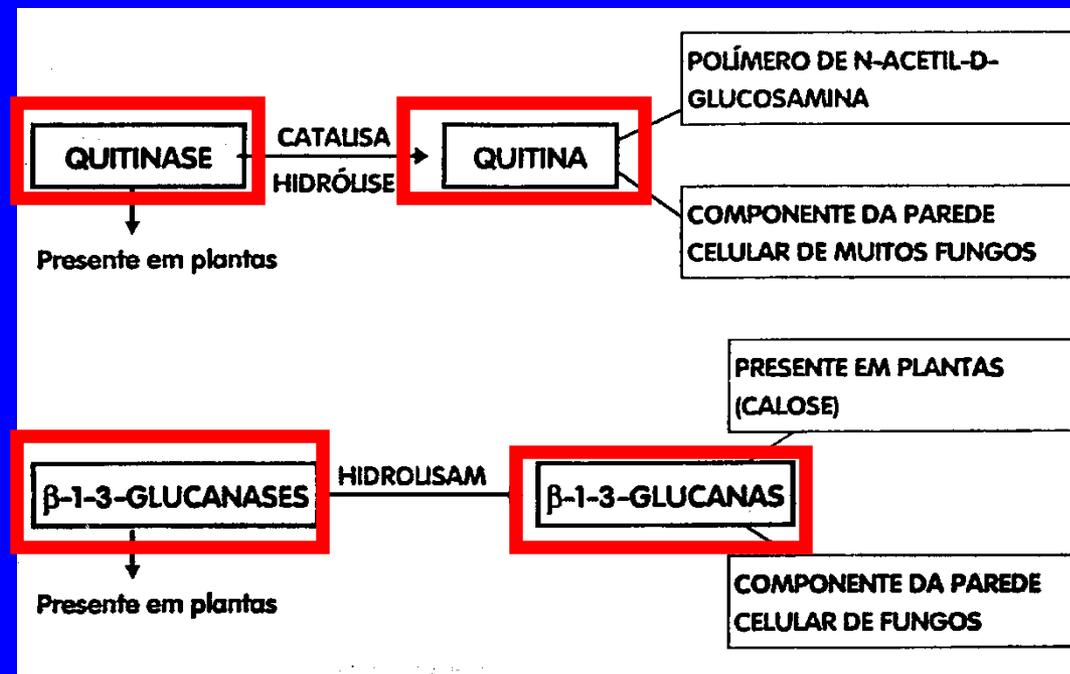


MECANISMOS DE RESISTÊNCIA - Bioquímicos pós-formados



- (a) - β -1,3 e β -1,6-glucanas
- (b) - Retículo glicoproteico
- (c) - Proteína
- (d) - **Microfibrilas de quitina**
- (e) - Plasmalema

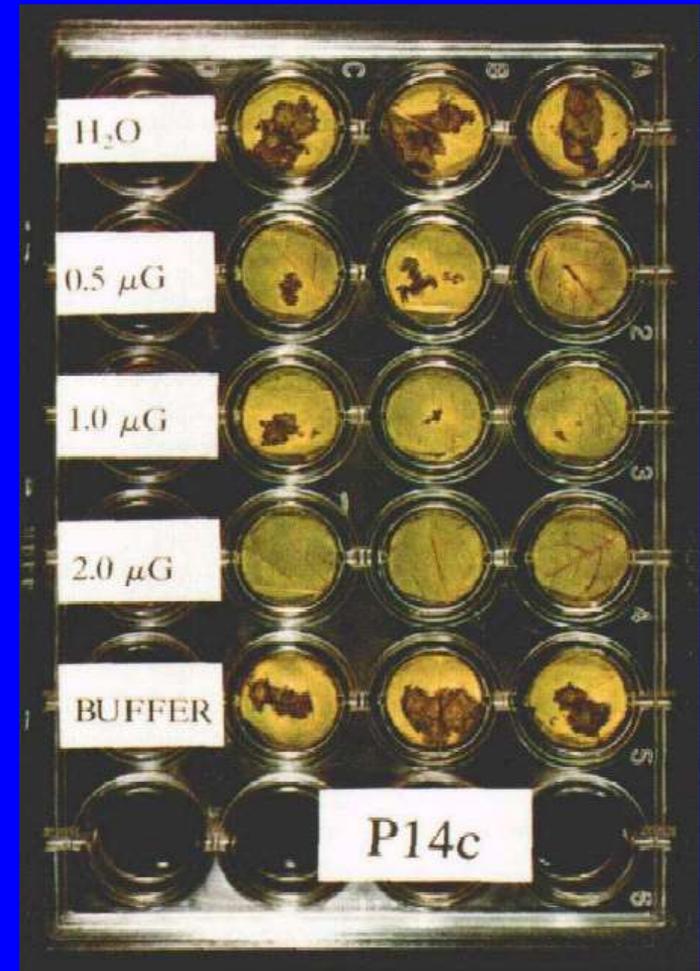
⇒ β -1,3-glucanases e quitinases



Ação antifúngica

- Inibição de *Phytophthora infestans* em tomate

Protein Assayed	Percent Inhibition with Protein Amounts of		
	0.5 μg	1.0 μg	2.0 μg
Tomato			
P14a	45	80	80
P14b	40	50	50
P14c	80	95	85



(Niderman et al., 1995)

Como fungos superam Proteínas-RP ?

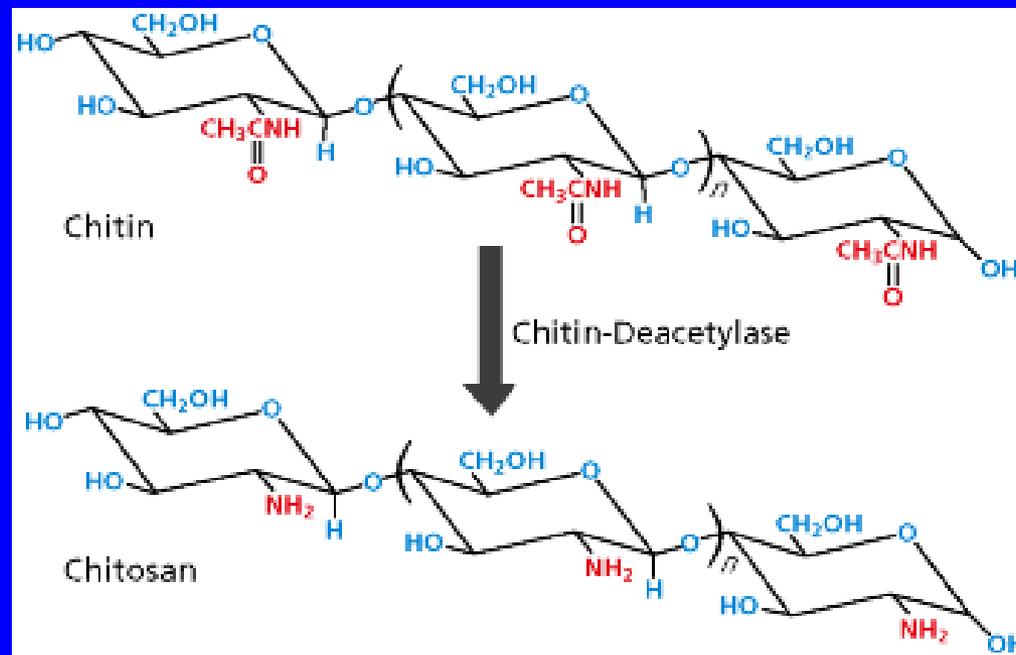
- Acúmulo lento
 - Acúmulo de Proteína-RP em tomate inoculado com *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*

Time after inoculation (h)	Density of labeling with anti-PR P14 antiserum in tomato root tissue (number of gold particles μm^{-2})			
	Epidermis	Cortex	Endodermis	Vascular elements
48 S	35	32	27	11
R	95	58	47	40
72 S	80	64	36	19
R	177	115	84	69
96 S	99	88	93	65
R	182	111	80	80
120 S	140	90	91	89
R	178	112	74	100

S, susceptible cultivar; R, resistant cultivar.

Como patógenos superam PR-Proteínas ?

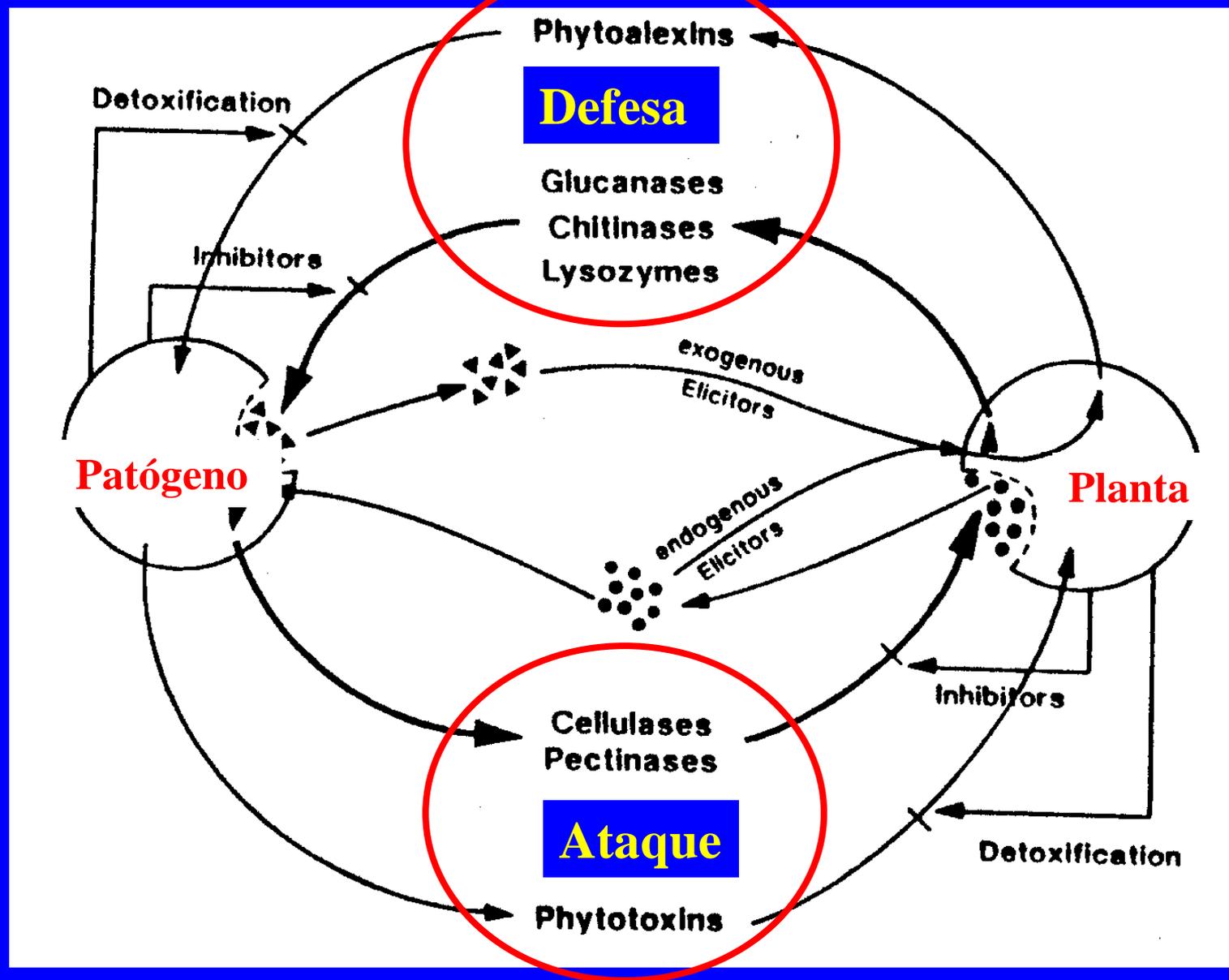
- Patógenos podem produzir enzimas que os protegem da ação tóxica da quitinase
 - *C. lagenarium* produz quitina deacetilase que torna a quitina inacessível a quitinase



(Siegrist & Kauss, 1990)

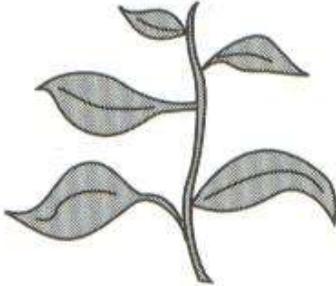
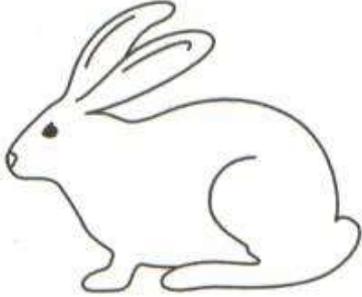
Como patógenos superam PR-Proteínas ?

- Redução na liberação de elicitor da parede celular do patógeno
- Degradação rápida das PR-Proteínas
- PR-Proteínas podem não estar envolvidas na resistência a doença



Patógeno x Planta – complexidade da interação

Comparação entre a defesa de plantas e animais

		
Recognize	✓	✓
Respond	✓	✓
Remember	?	✓

Qual é a utilidade dos estudos
sobre os mecanismos de
resistência em plantas ?

⇒ Indução de resistência

Resistência induzida ou adquirida

Ativação de mecanismos de resistência latentes em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos

Resistência induzida ou adquirida



*Provocador = desafiador = patógeno (“Challenger”)

Resistência induzida em pepino contra *Colletotrichum* sp



Controle não tratado

Acibenzolar-S-methyl
(Bion)

Qual é a utilidade dos estudos
sobre os mecanismos de
resistência em plantas ?

⇒ Plantas transgênicas



Constitutive expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced disease resistance but impaired plant growth

HEATHER M. WATSON^{1,2,3*}, KEMAL KAZAN^{1,2}, NEENA MITTER¹, KENNETH C. GOULTER¹, ROBERT G. BIRCH¹ and JOHN M. MANNERS^{1,2}

¹Cooperative Research Centre for Tropical Plant Pathology, University of Queensland, Brisbane, 4072, Australia, ²CSIRO Plant Industry, Long Pocket Laboratories, 120 Meiers Rd Indooroopilly, Brisbane, 4068, Australia and ³Botany Department, University of Queensland, Brisbane, 4072, Australia

(Accepted for publication 12 March 2002)

Transgenic tobacco plants expressing a phenylalanine ammonia-lyase cDNA (*ShPAL*), isolated from *Stylosanthes humilis*, under the control of the 35S promoter of the cauliflower mosaic virus were produced to test the effect of high level PAL expression on disease resistance. The transgenic plants showed up to eight-fold PAL activity and were slowed in growth and flowering relative to non-transgenic controls which have segregated out the transgene. The expression of the *ShPAL* transgene and elevated PAL levels were correlated and stably inherited. In T₁ and T₂ tobacco plants with increased PAL activity, lesion expansion was significantly reduced by up to 55% on stems inoculated with the Oomycete pathogen *Phytophthora parasitica* pv. *nicotianae*. Lesion area was significantly reduced by up to 50% on leaves inoculated with the fungal pathogen *Cercospora nicotianae*. This study provides further evidence that PAL has a role in plant defence.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: transgenic disease resistance; phenylalanine ammonia-lyase.

INTRODUCTION

Phenylalanine ammonia-lyase (PAL; EC 4.3.1.5) catalyses the conversion of L-phenylalanine to *trans*-cinnamic acid in the first step in the phenylpropanoid pathway which leads to the synthesis of defence-related compounds including lignin, phytoalexins such as isoflavonoids, and coumarins [6, 7, 31, 36]. PAL has also been implicated in the biosynthetic pathway for salicylic acid (SA), another defence related compound and a key signalling component required for the activation of PR genes, catalases, receptor-like protein kinases and bZIP transcription factors [19]. These are associated with systemic acquired resistance (SAR) leading to immunity to a wide range of pathogens [12]. There are two pathways thought to lead to the synthesis of SA. One pathway uses isochorismate synthase to produce SA from chorismate [17]. The other possible pathway involves the PAL product *trans*-

cinnamic acid [28]. Thus increasing the expression of PAL in a transgenic plant may lead to increased levels of the above-mentioned pre-formed protectants.

Many studies have shown that PAL activity increases in plants challenged by phytopathogens. For instance, tobacco resistant to *Phytophthora nicotianae* pv. *nicotianae* responded to stem inoculation by activating PAL activity at the infection front [29]. Transcriptional activation of PAL occurred rapidly upon inoculating potato with *Phytophthora infestans* [10, 42]. A PAL1 promoter-GUS construct was rapidly activated in tobacco inoculated with *Pseudomonas solanacearum* [16] and in cells surrounding invading *Peronospora parasitica* hyphae in transgenic Arabidopsis plants [28]. During the tobacco hypersensitive response (HR) against tobacco mosaic virus (TMV), PAL activity increased radially in advance of the necrosis, and the zone of phenolic deposition correlated with regions of high resistance to virus multiplication [19].

There is increasing evidence that genetic modification of PAL activity may be a useful approach to enhance disease resistance. For instance, transgenic tobacco with decreased PAL activity have shown increased susceptibility to *Cercospora nicotianae* [24], and reduced levels and

Abbreviations used in text: ADF, acid digestible fibre; ADL, acid digested lignin; CGA, chlorogenic acid; HR, hypersensitive response; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; SA, salicylic acid; SAR, systemic acquired resistance; TMV, tobacco mosaic virus.

PR-Proteínas x Produtos alergênicos

- Alergênicos de plantas: 25% pertencem às PR-Proteínas (International Union of Immunological Societies):
 - Plantas transgênicas: novas fontes de alergênicos

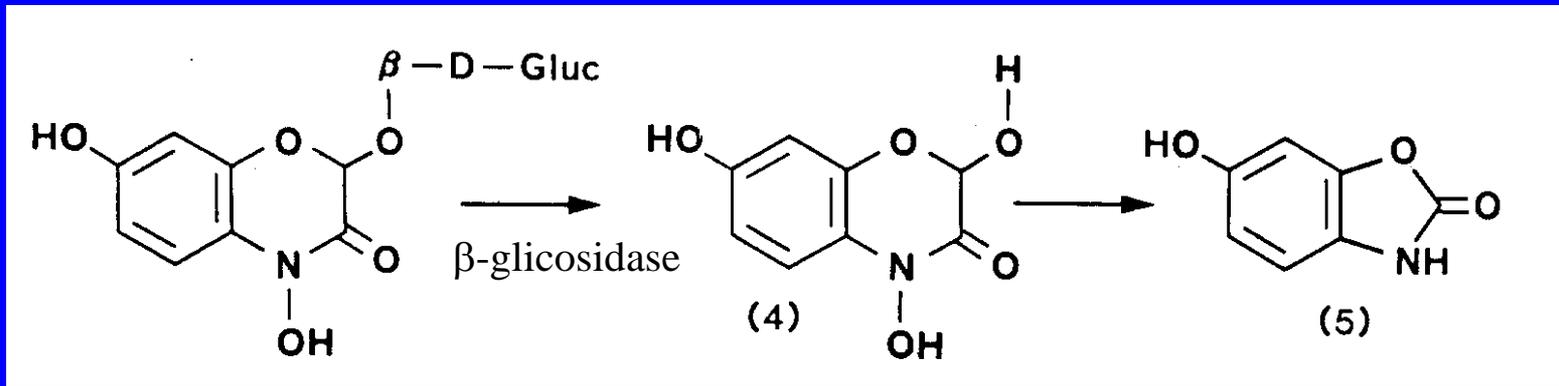
Family	Designation	Source	Allergen name
PR-2	β -1,3-Glucanases	<i>Hevea brasiliensis</i> latex, banana	Hev b 2
PR-3	Class I chitinases	Avocado, <i>H. brasiliensis</i> latex, chestnut, banana	Pers a 1, Hev b 11, Cas s 5
PR-4	Chitinases	<i>H. brasiliensis</i> latex, tumip	Hev b 6
PR-5	TLPs	Cherry, apple, bell pepper, mountain cedar	Pru av 2, Mal d 2, Cap a 1, Jun a 3
PR-8	Class III chitinases	<i>H. brasiliensis</i> latex	Hevamine
PR-10	Unknown; Bet v I homologues	Birch, hazel, alder, hornbeam, chestnut, apple, celery, cherry, peach, apricot, pear, carrot, potato, parsley	Bet v 1, Cor a 1, Aln g 1, Car b 1, Cas s 1, Mal d 1, Api g 1, Pru av 1, Pru p 1, Pru ar 1, Pyr c 1, Dau c 1, STH-2, PcPR-1
PR-14	LTPs	Peach, apple, soybean, apricot, plum, cherry, barley, <i>H. brasiliensis</i> latex, chestnut, hazelnut, walnut, mugwort, ragweed, asparagus, grape, maize, olive	Pru p 3, Mal d 3, Gly m 1, Pru av 3, Art v 3, Amb a 6, Par j 1,2, Cas s 8, Cor a 8, Jug r 1, Aspa o 1, Vit v 1, Hev b 12, Zea m 14, Ole e 7

Qual é a utilidade dos estudos
sobre os mecanismos de
resistência em plantas ?

⇒ Agentes químicos para o controle de
fitopatógenos

“Benzoxazinones”

- Compostos pré-formados encontrados em gramíneas

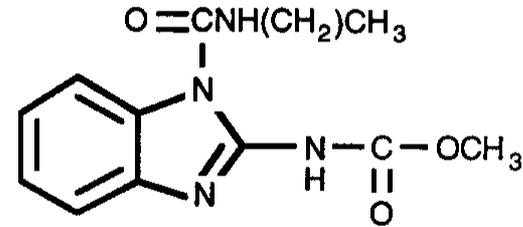


Glicosídeo de
benzoxazinone

Benzoxazinone

Benzoxazolinone
(fungitóxico)

Benomyl



- Fungicida sistêmico
(Delp & Klöpping, 1968)

SECONDARY PLANT METABOLITES IN PLANT DISEASE RESISTANCE PART I: PREFORMED RESISTANCE FACTORS

ALBERT STOESSL

Agriculture Canada, London Research Centre, University Sub Post
Office, London, Ontario, Canada, N6A 5B7.

(Accepted for publication on 11/06/1985)

ABSTRACT

STOESSL, A. Secondary plant metabolites in plant disease resistance. Part I: Preformed resistance factors. *Fitopatol. bras.* 10: 391-416. 1985.

Vol. 10

Outubr

the actual involvement of endogenous benzoxazinones and benzoxazolinones in the disease resistance of plants is a matter of debate, their discovery seems to have been the basis for the development of synthetic analogues that are successful commercial fungicides such as benomyl (Overeem, 1976). The tulipalins 6a and 6b form another particularly interesting example. They are generated (Scheme 2) on hydrolysis of the glucosides of the corresponding onen-chain

Qual é a utilidade dos estudos
sobre os mecanismos de
resistência em plantas ?

⇒ Controle de ervas daninhas

Mecanismos de Defesa – Fitoalexinas x Elicitor

Purdue Exponent

Life & Times

C 3

Chemical may make weeds suicidal

By Gannett News Service

Searching for a way to help corn and sorghum fight off a disease called anthracnose, a professor at Purdue University may have found a natural weed killer that uses the weed's defenses.

Anthracnose is spread by a

fungus, which in turn uses a slime to help penetrate plants.

Ralph Nicholson found that plants fight back by making chemicals that kill the spores but also kill the plant's own cells. Nicholson hopes to isolate the chemical in the slime that could be sprayed on weeds to induce them to commit suicide.

