

Isolamento e Caracterização de uma Aspartyl protease do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* envolvida no processo de patogênese.

ALVES, Elda B¹.; BRESEGHELO, Lucas N.; OLIVEIRA, Marília B.; PETROFEZA, Silvana².

Universidade Federal de Goiás, Departamento de Bioquímica e Biologia molecular, Goiânia, GO

Palavra-chave: aspartyl protease; *Sclerotinia sclerotiorum*.

INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo que infeta mais de 400 espécies de plantas incluindo muitas economicamente importantes (Purdy, 1979). A maceração de tecido é parte dos sintomas associada com a doença causada por *S. sclerotiorum*. Degradação dos componentes da parede celular e maceração do tecido hospedeiro é possível pela ação combinada de um número de enzimas hidrolíticas como celulases, pectinases e proteinases secretadas pelo fungo (Riou, *et al.*, 1991). Proteinases de vários fungos fitopatogênicos têm sido encontradas em tecidos de planta infetadas, mas na maioria dos casos não está claro qual o papel desta enzima no desenvolvimento de doença. Em *S. sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* a atividade de enzimas proteolíticas parece estar correlacionada ao desenvolvimento dos sintomas (Poussereau, *et al.*, 2001; Urbanek, *et al.*, 1985) sendo estas enzimas consideradas importantes fatores de virulência. Proteases também são consideradas antagonistas de proteínas antifúngicas secretadas pela planta como parte da resposta de defesa (Mohavedi, *et al.*, 1990). Neste estudo foi isolado e caracterizado um gene de aspartyl protease de *S. sclerotiorum* e determinada a sua expressão durante a interação com plantas de feijoeiro.

MATERIAL E MÉTODO.

Estabelecimento do processo de infecção:

O isolado de *S. sclerotiorum* previamente caracterizados, crescidos em meio BDA, foi utilizado para o inóculo de plantas de feijão, soja e girassol, com 11 a 28 dias, segundo o método descrito por Hunter *et al.* (1981). Foram inoculados um total de 10 plantas com três repetições. Após o período de 1 a 10 dias para o estabelecimento da infecção foram retirados os tecidos da região infectada para extração de RNA total.

Isolamento e caracterização do gene aspS

O clone para o gene da aspartyl proteinase foi obtido no projeto Transcriptoma de *S. sclerotiorum*. Sua identidade foi estabelecida por comparação em bancos públicos de dados.

RT-PCR

RNA total foi extraído de tecido de plantas infectado por *S. sclerotiorum* utilizando o reagente Trizol (Invitrogen). O RNA foi tratado com DNAase I (Invitrogen). O RNA Total (1µg) foi utilizado para a síntese da primeira fita utilizando a Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante, e oligo(dT) como primer. Como controle negativo, as mesmas reações foram executadas na ausência da enzima. Um quinto da reação foi usado para amplificação de PCR para cada gene analisado: aspS e actina. O produto da PCR foi separado em gel de agarose 1.2% corado com brometo de etídeo (Sambrook & Russel, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, o gene de *aspS* de *S. sclerotiorum* codificando para uma aspartyl protease foi caracterizado. A comparação com seqüências de aminoácido de aspartyl proteases de fungos fitopatogênicos mostrou ser muito conservada e o grau de identidade de aminoácido variou de 41 a 47%.

Em aspartyl proteases, acontecem os resíduos de Asp catalíticos dentro do motivo Asp-Xaa-Gly no qual Xaa pode ser Ser ou Thr (Rawlings. & Barrett, 1995). Em aspartyl proteases de fungos o Asp catalítico estão contidos em um motivo DTGS e um motivo de DTGT na região N- e C-terminais da enzima, respectivamente. Em ASPS, a região ao redor do resíduo de ativo Asp322 corresponde ao motivo conservado DTGT enquanto o resíduo ativo Asp137 acontece dentro do motivo DSGS, que é incomum para enzimas de fungos.

A expressão do gene *aspS* de *S. sclerotiorum* foi analisado durante a interação com plantas de feijão, soja e girassol em intervalos de 24, 48, 72, 96 horas, e 10 dias após a inoculação. Neste contexto o gene de actina de expressão constitutiva para *S. sclerotiorum* foi utilizado como controle durante a cinética de infecção. Nenhum produto de amplificação foi obtido das amostras de RNA de tecido de feijoeiro não infectado demonstrando a especificidade da análise.

O produto de 306bp correspondente a amplificação do gene *aspS* foi observado durante a interação com plantas de soja 24 horas após a inoculação e permaneceu constante durante 72 h, decaindo entre 96 horas e 10 dias (Fig 1). Para a interação com plantas de feijoeiro a expressão de *aspS* ocorreu somente 48 horas após a inoculação não sendo observado após este período. Já durante a interação com plantas de girassol foi observada a expressão somente com 48 e 96 horas de infecção. O aumento da expressão em 48h coincidiu com a fase de maior desenvolvimento do sintoma na planta, na qual o micélio em crescimento intensivo secreta a maioria das enzimas hidrolíticas. A diminuição do sinal foi observada após 10 dias, em todos os tratamentos, quando o tecido da planta já estava completamente invadido e degradado pelo fungo.

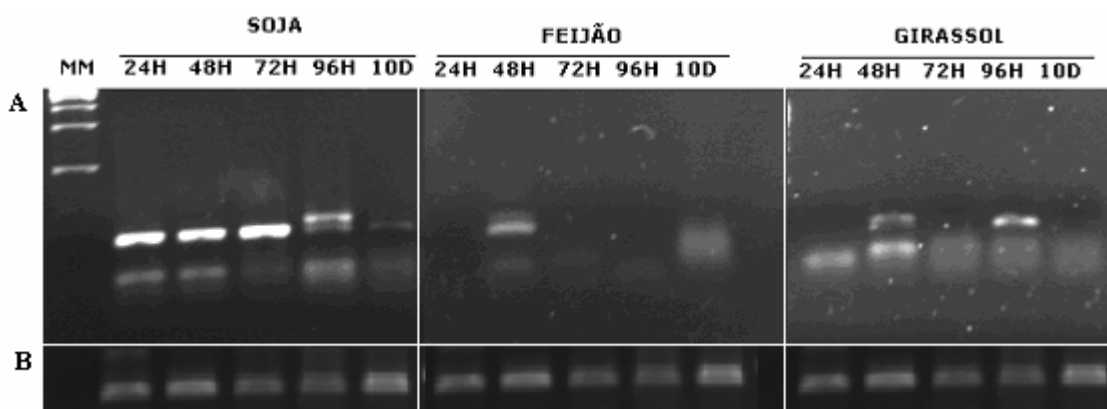


Fig2. RT-PCR durante a interação de *S. sclerotiorum* - planta. A- Amostras de cDNA, amplificado por RT-PCR a partir de RNA obtido da interação *S. sclerotiorum* e plantas de feijoeiro, soja e girassol para o gene *aspS*, respectivamente. Poços: MM - marcador massa molecular 1Kb (Invitrogen tratamentos: 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 10 dias de infecção, respectivamente. B- RT-PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene da actina e RNA obtido da interação *S. sclerotiorum* e respectivas plantas em diferentes tempos de infecção.

CONCLUSÕES.

Em cultura, a presença e os níveis de *aspS* não foi alterado pelo pH ambiente e a disponibilidade de fontes de carbono e de nitrogênio o que indicam que a *aspS* é constitutivamente expressa nestas condições. Em plantas, a expressão de *aspS* ocorre nas fases iniciais de infecção. Esta expressão permite a *S. sclerotiorum* a capacidade de produzir, desde o princípio de infecção, uma enzima capaz de atacar proteínas estruturais de parede, assim como proteínas de defesa da planta hospedeira. Desta forma, a Aspartyl proteases têm sido considerada um importante fator de virulência aumentando a eficiência do fungo no ataque a plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mohavedi, S; Heale, J.B. Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers in culture and in infected carrots. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 36, 289 -302. 1990.
- Poussereau, N., Gente, S., Rasclé, C., Billon-Grand, G.; Fevre, M. *aspS* encoding an unusual aspartyl protease from *Sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis. **FEMS Microbiol. Lett.** 194, 27–32. 2001.
- Purdy, L.H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology** 69, 875-880. 1979.
- Rawlings, N.G.; Barrett, A.J. Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. **Methods Enzymol.** 248, 105-146. (1995)
- Riou, C., Freyssinet, G.; Fevre, M. Production of cell walldegrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 54, 1478-1484. 1991.
- Sambrook J. & Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. ed. 3. Cold Spring Harbor, New York.
- Urbanek, H. and Kaczmarek, A. Extracellukar proteinases of the isolate *Botrytis cinerea* virulent to apple tissues. **Acta Biochim. Pol.** 32, 101–109. 1985

Fonte financiamento: CNPq.

¹ Aluno de iniciação científica. Instituto de Ciencias biológicas - UFG - Laboratório de enzimologia,

² Orientador/Instituto de Ciencias biológicas/UFG, petrofez@uol.com.br