Análise comparativa da expressão de poligalacturonases produzidas por *S. sclerotiorum* durante a infecção em diferentes culturas.

OLIVEIRA, Marilia.B [1]; BRESEGHELO, Lucas N.; ALVES, Elda B.; PETROFEZA, Silvana[2].
Universidade Federal de Goiás, Departamento de bioquímica e Biologia molecular, Goiânia, GO

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*, poligalacturonases.

INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo de solo, causador de uma doença conhecida como mofo branco. Este fungo possui um amplo espectro de espécies de plantas hospedeiras. Para penetrar e colonizar tecidos de planta, *S. sclerotiorm* secreta numerosa enzimas extracelulares que degradam polímeros presentes na parede celular da planta (Annis & Goodwin, 1997). Isso macera os tecidos do hospedeiro e libera nutrientes para o crescimento micelial. Entre as enzimas secretadas estão as poligalacturonases (PGs), que estão envolvidas na degradação de pectina. Um maior interesse é dado as endopoligalacturonases (endoPGs) as quais são capazes de macerar o tecido da planta promovendo a liberação de oligossacarídeos que são potentes sinalizadores celulares e podem ativar a resposta de defesa da planta hospedeira (Benito, *et al*. 1998; Bussink, *et al*. 1992). Durante o crescimento *S. sclerotiorum* produz várias endo- e exo- poligalacturonases (Cotton, *et al* 2002). Estudos moleculares permitiram a caracterização de vários genes de endoPG que são organizados como uma família multigenica (Di Pietro & Roncero, 1998). Uma subfamília codifica isoformas de pI neutro e é constituída pelos genes *sspg*1, *sspg*2 e *sspg*3. Outra subfamília é constituída pelos genes *sspg*5 *sspg*6 e *sspg*7 que codificam proteínas ácidas (Fraissinet-Tachet, *et al*. 1995). No presente trabalho foram avaliados os níveis de expressão dos genes *sspg*5 *sspg*6 e *sspg*7 durante o processo de patogênese de *S. sclerotiorum* em plantas de feijão, soja e girassol.

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 feijoeiro, soja e girassol, com 11 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.

RT-PCR

Cerca de 200 mg de tecido infectado das respectivas amostras, foram empregados para extração de RNA total utilizando reagente Trizol® (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. Após quantificação por espectofotometria e verificação da integridade do RNA total por eletroforese em gel de agarose 1%, em condições livre de RNAse (Sambrook & Russel, 2001), cerca de 10 μg do RNA total obtido foi submetido a tratamento com DNAse I livre de RNAse (Invitrogen) a fim de se eliminar qualquer traço residual de contaminação por DNA genômico. Para verificação dos níveis de expressão dos genes de poligalacturonases os oligonucleotídeos foram desenhados com base nas

seqüências dos genes *sspg5*, *sspg*6 e *sspg*7 obtidas pelo Projeto Transcriptoma de *S. sclerotiorum*, utilizando-se o programa Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu).
A reação de síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 1 μg de RNA total de tecido infectado, 0,5 μg de oligo dT_{12-18}, 200U da enzima transcriptase reversa (SuperScript II, Invitrogen), segundo instruções do fabricante. Para todos os sistemas foi feito controle da RT-PCR omitindo-se a enzima transcriptase reversa, para verificar uma possível contaminação por DNA genômico.
Uma alíquota correspondente a 1/5 da reação de síntese de cDNA foi submetida à reação de amplificação em um volume final de 25 μL contendo: tampão *Taq* DNA Polimerase 1X; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM dNTPs; 0,2 μM de cada oligonucleotídeo e 2U da enzima *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). As etapas de amplificação utilizadas foram as: 95ºC/2minutos; 30 ciclos de 94ºC/ 1 minuto;45ºC/1minuto e 30 segundos;72ºC/1 minuto; e uma extensão final: 72ºC/5 minutos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % (Sambrook & Russel, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as diferentes culturas foi observado que durante as primeiras 24 horas após inoculação (hpi), o micélio desenvolveu e invadiu os tecidos, mas muito pouco do sintoma macroscópico foi detectado. A 48 hpi, micélio aéreo abundante emergiu do tecido da planta onde o ponto de maceração podia ser observado na superfície. De 72 hpi para 96 hpi, o micélio progressivamente ficou menos abundante enquanto os tecidos das plantas foram totalmente macerados.
A expressão de genes da família das poligalacturonases foi analisada durante o processo de patogênese de *S. sclerotiorum*. Para os genes *sspg*5 e *sspg*6, os primers utilizados na RT-PCR foram desenhados em ambos os lados de um intron, para permitir a amplificação de um produto de PCR derivado de mRNA que fosse distinto do derivados de DNA genômico. No caso de *sspg*7, foram desenhados primers em uma região de exon. Foi amplificado um fragmento do gene que codifica para a actina como um controle para a quantidade de mRNA do fungal presente em cada amostra de tecido infectado.
Os produtos da RT-PCR para os genes *sspg*5 e *sspg*7 foram observados somente durante as primeiras 48 hpi para plantas de feijoeiro, e em girassol esta expressão foi detectada com 48 hpi com uma redução em 72 hpi. De forma interessante, não foi observado a presença de transcritos para o gene *sspg*6 durante os tempos avaliados em plantas de girassol, sendo que em feijoeiro o transcrito estava presentes somente 48 hpi (Fig.1). Em plantas de soja infectadas transcritos para os genes sspg5, sspg6 e sspg7 estavam constantemente presentes de 24 hpi até o final do período avaliado. Foi observado para esta cultura que a expressão decaiu somente a partir de 96 horas após a inoculação (dados não mostrados). Estes padrões de expressão mostram claramente uma transcrição estágio específica destes genes nas diferentes culturas. O gene *sspg*5 foi expressos durante a fase inicial de maceração dos tecidos, e sspg6 e sspg7 exibiram um padrão de expressão mais constante. No curso da infecção, acidificação do meio ambiente e degradação dos polímeros, pode criar uma sucessão de condições ambientais com uma diminuição de indutores como ácido galacturônico que conseqüentemente promova a ativação ou repressão da transcrição dos genes de endoPG (Cotton, *et al* 2002).

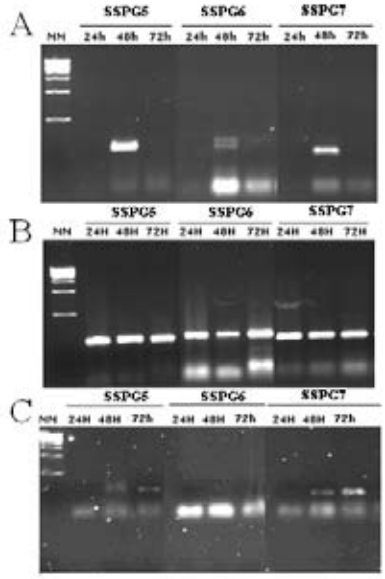

Figura 1. **RT-PCR dos genes *sspg5, sspg6 e sspg7* de *S. sclerotiorum* durante a interação patogênica.** Amostras de cDNA, amplificado por RT-PCR a partir de RNA obtido da interação *S. sclerotiorum* e plantas de: (a)- feijoeiro; (b) soja e (c) Girassol. Poços: MM – marcador massa molecular 1Kb (Invitrogen).Tratamentos: 24 horas, 48 horas, 72 horas após a infecção, respectivamente

CONCLUSÕES.

Acredita-se que a indução desses genes pode viabilizar a sobrevivência desse patógeno no tecido hospedeiro, conduzindo ao estabelecimento da infecção. O estudo da regulação da expressão desses genes facilitará a compreensão do seu papel no processo de infecção, bem como o entendimento dos mecanismos adotados pelo fungo para o processo de invasão em diferentes plantas hospedeiras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Annis SL, Goodwin PH (1997) Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **Eur J Plant Pathol** 103:1–14

Benito EP, ten Have AJ, van Klooster JW, van Kan AJ (1998) Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea.* **Eur J Plant Pathol** 104:207–220

Bussink HJD, Buxton FP, Fraaye BA, de Graaf LH, Visser J (1992) The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. **Eur J Biochem** 208:83–90

Cooper RM (1983) The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. In: Callow JA (ed) Biochemical plant pathology. Chichester: Wiley, pp 101–137

Cotton P, Rascle C, Fe`vre M (2002) Characterization of PG2, an early endoPG produced by *Sclerotinia sclerotiorum,* expressed in yeast. **FEMS Microbiol Lett** 213:239–244

Di Pietro A, Roncero MIG (1998) Cloning, expression and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum.* **Mol Plant-Microbe Interact** 11:91–98

Fraissinet-Tachet L, Reymond-Cotton P, Fe`vre M (1995) Characterisation of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum.* **Curr Genet** 29:96–99

APOIO FINANCEIRO: CNPq

[1] Aluno de iniciação científica - PIVIC. Instituto de Ciências biológicas - UFG - Laboratório de enzimologia,
[2] Orientador/Instituto de Ciencias biológicas/UFG, petrofez@uol.com.br