

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE POLIGALACTURONASES EXPRESSAS DURANTE O
PROCESSO DE PATOGENICIDADE DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM
VARIEDADES DE *Phaseolus vulgaris* L.
BRESEGHELO, Lucas¹ PETROFEZA, Silvana²**

Palavra chave: Poligalacturonases, fitopatógeno, feijoeiro.

1. INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum (Lib) De Bary é um fungo de solo, pertencente à família Sclerotiniaceae, da ordem Helotiales, phylum Ascomycota que causa a enfermidade conhecida como mofo branco. É um fungo fitopatogênico de um amplo espectro de hospedeiros e de uma ampla distribuição geográfica tanto em grãos quanto em vegetais (PURDY, 1979). *S. sclerotiorum* produz uma série de enzimas que auxiliam no processo infeccioso, dentre estas incluem as poligalacturonases (PGs) as quais atuam sobre a pectina. A hidrólise deste composto auxilia a degradação da parede celular da planta auxiliando a colonização do fungo, dessa forma as PGs são de grande importância para o *S. sclerotiorum* no processo infeccioso. Diversas isoformas das poligalacturonases são produzidas por *S. sclerotiorum*, tanto em cultura, quanto em planta, entretanto, seu número total e propriedades diferem extensivamente entre os isolados fúngicos e na cinética de expressão destes genes (CRUICKSHANK, 1983;).

2. METODOLOGIA

2.1. Estabelecimento do processo de infecção

Palitos de dentes de madeira foram cortados (1cm), autoclavados e incubados juntamente com o fungo *S. sclerotiorum* em placas de Petri contendo meio BDA por 5 dias a 22°C. Após este período, os palitos foram utilizados para inocular plantas de feijoeiro, mantidas em câmara úmida na temperatura ambiente. Foram inoculados um total de 10 plantas com três repetições, por variedade analisada. Durante o período de 10 dias foram retirados tecidos da planta infectados para extração de RNA total, seguindo os seguintes tempos: 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 10 dias de infecção. As amostras foram guardadas em nitrogênio líquido até o momento do uso.

2.2. Extração de RNA total

Para a extração do RNA total foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen). Após quantificação por espectrofotometria e verificação da integridade do RNA total cerca de 10 µg foi submetido a tratamento com DNase I livre de RNase (Invitrogen) a fim de se eliminar qualquer traço residual de contaminação por DNA genômico. As amostras foram analisadas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/mL visualizado em transluminador de luz ultravioleta (UV) (Sambrook & Russel, 2001).

2.3. Análise poligalacturonases

Para padronização do sistema de amplificação, uma alíquota do DNA genômico de *S. sclerotiorum* (10ng/ µL) foi submetida à reação de amplificação utilizando primers que codificam genes para poligalacturonases (*sspg5*, *sspg6* e *sspg7*) em um volume final de 30 µL. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, de acordo com nas condições padrão de eletroforese descritas por Sambrook e Russel (2001).

Para obtenção do cDNA desejado foi feita amplificação do gene *sspg5* *sspg6* e *sspg7* através de RT-PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos e o kit de amplificação (AccessQuick RT-PCR System - Promega) e como molde o RNA total da interação de *S. sclerotiorum* e plantas de feijoeiro nas seguintes amostras: 24, 48, 72, 96 horas e 10 dias. O produto da RT-PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, baseando-se nas condições padrão de eletroforese descritas por Sambrook e Russel (2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que, em média ao longo do período de infecção, as lesões atingiram um diâmetro de 0.2 a 5.5 cm, sendo evidente o crescimento de micélio no local da lesão nos estágios tardios de infecção.

A análise da cinética de expressão dos genes *sspg5*, *sspg6* e *sspg7* durante o período de interação patógeno-hospedeiro para a variedade carioca (Fig.1), demonstrou a amplificação de um fragmento único de 452pb, 462pb e 380pb para os genes *sspg5*, *sspg6* e *sspg7*, respectivamente. Entretanto, apenas para as amostras com 48 horas de interação planta-patógeno a expressão foi observada.

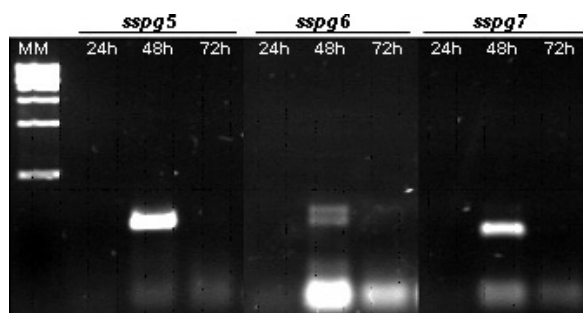


Figura 1. Perfil eletroforético da amplificação através de RT-PCR dos genes *sspg5*, *sspg6* e *sspg7* em feijoeiro variedade carioca. Amostras de DNA, amplificado por RT-PCR a partir de RNA obtido da interação *S. sclerotiorum* x feijoeiro. Poços: MM - marcador massa molecular 1Kb (Invitrogen). Tratamentos: 24 horas, 48 horas, 72 horas após a infecção, respectivamente.

Para a variedade de feijão Pérola (Fig. 2) a amplificação dos genes *sspg5*, *sspg6* e *sspg7* foi observada no ponto de 96 horas, sendo que para os genes *sspg5* e *sspg6* uma expressão residual foi observada com 10 dias após inoculação. O tamanho dos fragmentos amplificados foi os mesmos observados para a variedade carioca.

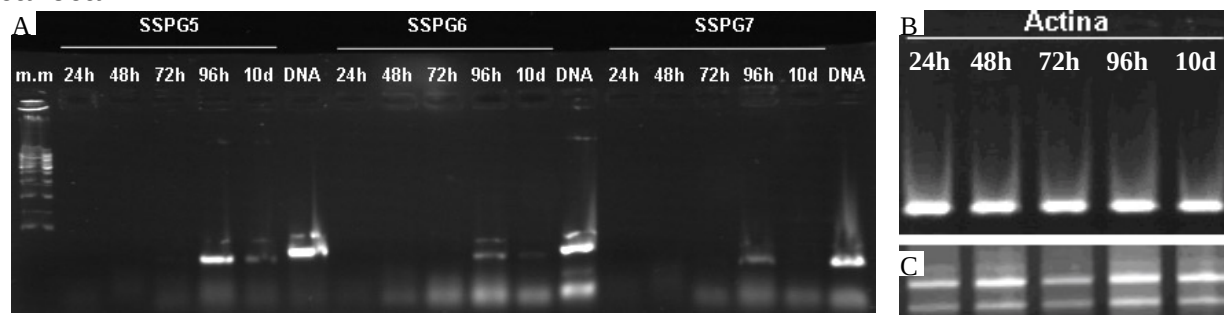


Fig. 2. Perfil eletroforético da amplificação através da RT-PCR dos genes *sspg5*, *sspg6* e *sspg7* em feijoeiro. (A) - Amostras de cDNA, amplificado por RT-PCR a partir de RNA obtido da interação *S. sclerotiorum* x feijoeiro variedade Pérola. Poços: MM - marcador massa molecular 1Kb (Invitrogen). Tratamentos: 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 10 dias após a infecção, respectivamente. (B)- RNA total (1µg) extraído nos diferentes tratamentos (C)- amplificação do gene da actina nos diferentes tratamentos.

Os resultados demonstram, que a expressão dos genes da família das poligalacturonases ocorre somente em pontos específicos do processo de invasão do fungo na planta hospedeira, indicando que possivelmente outros membros desta família são responsáveis pela degradação nas primeiras horas do processo de infecção. Os níveis de expressão do gene *sspg5* foram superiores as demais PGs durante o processo de interação analisado, indicando uma provável função majoritária neste estágio da infecção.

Experimentos utilizando o cultivo de *S. sclerotinia* em meio mínimo com presença de pectina, sugerem a expressão dos genes *sspg5*, *sspg6* e *sspg7* a partir de 96 horas de indução (Li *et al.*, 2004).

Kasza *et al.*, (2004) testaram a expressão dos genes *sspg5*, *sspg6* e *sspg7* na interação de *S. sclerotiorum* em raiz de cenoura e obtiveram resultados diferenciados: Para o gene *sspg5* houve expressão nos pontos de 48 e 72 horas e não em 96 horas após a infecção, indicando uma provável função pós-colonização e final da maceração dos tecidos; Nos genes *sspg6* e *sspg7* houve um padrão constante de expressão durante todo o período de 24 a 96 horas de interação indicando uma função constante durante o processo infeccioso.

4. CONCLUSÃO

Diferenças significativas foram observadas na expressão dos genes *sspg5*, *sspg6* e *sspg7* entre os tempos de interação e entre as duas variedades estudadas. Mostrando uma provável função destas proteínas em etapas definidas do processo de invasão. A diferença observada nos níveis de expressão dos genes de poligalacturonases analisados entre as duas variedades de feijoeiro, pode indicar uma provável resposta diferencial da planta ao patógeno durante o processo de invasão.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRUICKSHANK, R.H. Distinction between *Sclerotinia* species by their pectic zymograms. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 80, 117-119, 1983.
- PURDY, L.H., . *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact. **Phytopathology** 69:875-880, 1979.
- LI, R.; RIMMER, R.; BUCHWALD L.; SHARPE, A.G.; SEGUIN-SWARD, G.; HEGEDUS, D., Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo- and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic mode. **Fungal Genetics and Biology** 41, 754-765, 2004.
- SAMBROOK J. & RUSSEL D.W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 3 ed., 2001.
- KASZA, Z., VAGVÖLGYI, C., FÉVRE, M., COTTON P. Molecular Characterization and in planta Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* Endopolygalacturonase Genes. **Current Microbiology** 48, 208-213, 2004.

FONTE DE FINANCIAMENTO: CNPq

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciencias biológicas - UFG - Laboratório de enzimologia, biolucas@ibestvip.com.br

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