

C. Ciências Biológicas - 3. Bioquímica - 1. Biologia Molecular

CARACTERIZAÇÃO DE POLIGALACTURONASES DE MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS AGENTE CAUSAL DA SIGATOKA-NEGRA DA BANANEIRA.

Edil Correa de Miranda ¹

Luadir Gasparotto ²

Rogério E. Hanada ³

Nelcimar Reis Sousa ⁴

Gilvan Ferreira da Silva ⁴

1. Universidade do Estado do Amazonas - UEA
2. Laboratório de Fitopatologia - Embrapa Amazônia Ocidental
3. INPA - Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
4. Laboratório de Biologia - Molecular-Embrapa Amazônia Ocidental

INTRODUÇÃO:

O fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet é o agente causal da Sigatoka-negra, doença que atinge cultivos de bananeiras causando grande prejuízo econômico para os agricultores. Os reflexos da doença são sentidos pela rápida destruição da área foliar, reduzindo-se a capacidade fotossintética da planta. Durante a patogênese os fungos secretam pectinases capazes de degradar a pectina que é um dos principais componentes da parede celular vegetal, levando a maceração do tecido do hospedeiro. Entre as enzimas pectinolíticas destacam-se as poligalacturonases (PG) que são hidrolases que atuam sobre o ácido poligalacturônico e pectina de baixo grau de esterificação. As PGs são classificadas em endopoligalacturonase (endoPG) e exopoligalacturonase (exoPG) de acordo com o mecanismo de ação no substrato. Os genes que codificam PGs podem ser regulados pelos fatores de transcrição CreA relacionado a repressão catabólica e por PacC um repressor de genes que codificam proteínas que atuam em pH ácido e ativador dos que atuam em condições alcalinas. Em muitos fungos fitopagônênicos a inativação dos genes que codificam PGs tem revelado que essas proteínas tem um importante papel na virulência (Degrassi 2008). O presente trabalho teve como objetivo analisar e caracterizar as PGs codificadas por *M. fijiensis*.

METODOLOGIA:

As sequências dos genes que codificam Poligalacturonases foram identificadas no banco genômico de *M. fijiensis* (<http://genome.jgi-psf.org/Mycfi1/Mycfi1.home.html>) usando a ferramenta advancedsearch. As sequências homólogas foram localizadas no banco de dados NCBI por meio da ferramenta BLASTP (Astschi et al., 1997), onde foram obtidas mais 20 ortólogas, totalizando 25 proteínas para a serem analisadas. A análise de 800 pares de base (pb) da região promotora foi realizada com o intuito de detectar cis-elementos de ligação aos fatores de transcrição PacC e CreA. As proteínas deduzidas tiveram seu peso molecular e ponto isoelétrico (pI) determinados pelo programa ExPasy (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html). O peptídeo sinal e os sítios de glicosilação foram localizados pelo software SignalP 3.0 (Bendtsen et al, 2004) e NetNGlyc 1.0, respectivamente. O alinhamento foi realizado no programa ClustalX 2.0 (Larkin et al 2007) e editado com auxílio do Bioedit (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.htm>). Para análise filogenética foi utilizado o programa Mega 4.0 com robustez dos ramos determinada por bootstrap de mil réplicas (Kumar et al 2008).

RESULTADOS:

Foram identificadas cinco sequências que codificam PGs em *M. fijiensis*, sendo duas com homologia à endoPGs e três com exoPGs, estes genes foram denominados de endopgMf1 e 2 e exopgMf 1, 2 e 3. A análise da região promotora revelou a presença de consensos para os fatores de transcrição PacC e CreA em todos os genes. Em relação à glicosilação, a proteína EndopgMf1 não apresentou nenhum sítio (NXT/S) e em ExopgMf2 foram encontrados 15 prováveis sítios. O Peptídeo sinal não foi localizado nas EndopgMf1 e 2, já as ExoPG1, 2 e 3 apresentam peptídeo sinal de 16, 23 e 19 aa, respectivamente. Quanto ao ponto isoelétrico (pI), houve um contraste entre as endoPGs, pois a EndopgMf1 tem seu pI de 8.85 enquanto que a EndopgMf2 de 4.27, as ExoPG1, 2 e 3 apresentaram pI respectivamente 5.01, 5.90 e 4.86. O motivo RIK considerado assinatura para PGs foi identificado em todas as PGs de *M. fijiensis* exceto em ExopgMf2, que apresentou (RFK) uma substituição de Isoleucina por Fenilalanina (I302F). O gráfico filogenético deixou claro a separação de EndoPGs das ExoPGs revelando que endoMf1 está mais proximamente relacionada com endoPG de *Aspergillus niger*, enquanto que as exoPGs1 e 3 se agruparam no mesmo grupo que as exoPGs de *Aspergillus fumigatus* e *Botrytis fuckeliana*, respectivamente.

CONCLUSÃO:

A identificação de cis-elementos na região promotora de todas as PGs de *M. fijiensis* indica uma potencial regulação dos genes por pH ambiental e repressão catabólica, principalmente em ExopgMf1 com três consensos

para PacC e oito para CreA. A ausência de peptídeo sinal nas endoPGs 1 e 2 é um indicativo da possível ausência de secreção destas proteínas. Todas as proteínas apresentaram a assinatura RIK, exceto a ExopgMf2, onde houve uma substituição de I-302-□F, devido uma mutação do tipo transversão (substituição de A>T na posição 904).

Instituição de Fomento: CNPq

Palavras-chave: Fitopatígeno, Exopoligalacturonase, Fatores de Virulencia.