

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

#### IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA INDUTORA DE NECROSE E ETILENO (NEP) EM *Mycosphaerella fijiensis* AGENTE CAUSAL DA SIGATOKA-NEGRA DA BANANEIRA

Casley Borges de Queiroz <sup>1</sup>

Eric Leandro Silva Pereira <sup>1</sup>

Edil Correa de Miranda <sup>1, 2</sup>

Rogério E. Hanada <sup>3</sup>

Luadir Gasparotto <sup>1</sup>

Gilvan Ferreira da Silva <sup>1</sup>

1. Embrapa Amazônia Ocidental (Cpaa)
2. Universidade do Estado do Amazonas
3. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

#### INTRODUÇÃO:

A proteína Nep1 (Necrosis and Ethylene Inducing Protein) foi inicialmente identificada por Bailey (1995) em filtrado de cultura de um isolado patogênico de *Fusarium oxysporum* e classificada como uma família nova de elicitores. Desde então proteínas semelhantes a NEP (NEP Like Proteins - NLP) têm sido identificadas em procariotos e eucariotos. Apesar de existirem em grupos tão distantes filogeneticamente os ortólogos mantiveram algumas características conservadas ao longo da evolução (Pemberton e Salmond, 2004). Todas as NLPs se caracterizam por apresentar o domínio NPP1 com dois ou quatro resíduos de cisteína conservados. Gijzen e Nurberger (2006) classificaram as NLPs em dois grupos de acordo com o número de cisteínas presentes, tipo I (duas cisteínas) e tipo II (quatro cisteínas). Outra característica comum do domínio NPP1 é uma sequência conservada de sete aminoácidos (GHRHDWE) localizada na região central de todas as NLPs. Recentes trabalhos têm demonstrado que NLP está associada a morte celular programada em fungos necrotróficos (Bae *et al.*, 2006; Shouten *et al.*, 2007). Desse modo o presente trabalho traz como contribuição a caracterização da NLP de *Mycosphaerella fijiensis* que é considerado o patógeno que causa as maiores perdas ao cultivo da bananeira.

#### METODOLOGIA:

A sequência do gene que codifica o indutor de necrose e etileno (NLP) foi identificada no banco de dados onde está depositado do genoma de *M. fijiensis* (<http://genome.jgi-psf.org/Mycfi1/Mycfi1.home.html>). Sequências homólogas foram localizadas no banco de dados público NCBI por meio da ferramenta BLASTP (Astschul *et al.*, 1997) e 33 ortólogos foram selecionados entre bactérias, fungos e oomicetos para alinhamento e análise filogenética. A proteína deduzida teve seu peso molecular e ponto isoelétrico (pI) determinados pelo programa ExPasy ([http://ca.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](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:

No genoma de *M. fijiensis* foi identificada uma única sequência com homologia a NLP, representada por uma ORF (Open Reading Frame) de 1021 pares de base (pb) interrompida por dois possíveis introns de 58 e 63 pb respectivamente. A proteína predita apresenta 299 aminoácidos (aa), com um peptídeo sinal apresentando 20 aa na porção N-terminal, indicando que a proteína madura é secretada. MfNEP apresenta dois possíveis sítios de glicosilação (Ans-X-Ser/Thr) nas posições 187 e 204. Análise comparativa entre NLP de *M. fijiensis* com o ortólogo do fitopatógeno de trigo pertencente ao mesmo gênero *Mycosphaerella graminicola* revelou que na região correspondente ao domínio são encontradas quatro cisteínas (nas posições 58, 74, 91 e 96) conservadas em *M. fijiensis* e apenas duas em *M. graminicola*, indicando que esses patógenos possuem fatores de necrose de diferentes grupos (tipo II e tipo I respectivamente). Os resultados do alinhamento revelam a presença do heptapeptídeo (GHRHDWE) conservado em todos os organismos utilizados na análise, exceto em *M. fijiensis* que apresenta a substituição (D→E) na posição 121. A análise filogenética pelo método Neighbor-joining (NJ) separa os organismos em dois grandes grupos de acordo com a presença de duas ou de quatro cisteínas e revela que MfNEP está mais relacionada a *Phaeosphaeria nodorum*.

#### CONCLUSÃO:

A identificação de uma única ORF no banco de dados de *M. fijiensis* indica que possivelmente uma única cópia desse gene está presente no genoma. MfNEP pertence ao grupo tipo II caracterizado pela presença de quatro resíduos de cisteína na região correspondente ao domínio, a substituição (D→E) na região do heptapeptídeo deve-se a uma mutação do tipo transversão (C/T>G), contudo essa alteração pode não influenciar na atividade da proteína uma vez que ambos os aminoácidos apresentam os mesmos atributos hidrofóbicos e hidrofílicos.

Instituição de Fomento: CNPQ

Palavras-chave: Indutor de necrose, fitopatígeno, indutor.