

Anais



VI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais da VI Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Regina Caetano Quisen
Ronaldo Ribeiro de Moraes
Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue
Gilvan Ferreira da Silva
Editores Técnicos*

*Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2010*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara

Caixa Postal 319, 69010-970, Manaus, AM

Fone: (92) 3303-7800

Fax: (92) 3303-7820

www.cpa.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*

Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Membros: *Aparecida das Graças Claret de Souza*

José Ricardo Pupo Gonçalves

Lucinda Carneiro Garcia

Luis Antonio Kioshi Inoue

Maria Augusta Abtibol Brito

Maria Perpétua Beleza Pereira

Paulo César Teixeira

Raimundo Nonato Vieira da Cunha

Ricardo Lopes

Ronaldo Ribeiro de Moraes

Revisão de texto: *Maria Perpétua Beleza Pereira*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação e arte: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

1ª edição

1ª gravação em CD-ROM (2010): 200

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Amazônia Ocidental.**

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental (6. : 2010 : Manaus).

Anais... / editores Regina Caetano Quisen, Ronaldo Ribeiro de Moraes, Luis Antonio Kioshi Aoki Inoue e Gilvan Ferreira da Silva. – Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2010.

1 CD-ROM; 4 ¼ pol.

ISBN 978-85-89111-10-2

1. Pesquisa. 2. Desenvolvimento. I. Quisen, Regina Caetano. II. Moraes, Ronaldo Ribeiro de. III. Inoue, Luis Antonio Kioshi Aoki. IV. Silva, Gilvan Ferreira da. V. Título.

CDD 501

Seção III – Genética e Melhoramento

Análise do Fator de Transcrição PacC e Condições de pH Ambiente em *Mycosphaerella fijiensis*

Casley Borges de Queiroz
Gilvan Ferreira da Silva
Nelcimar Reis Sousa
Luadir Gasparotto
Rogério E. Hanada

Resumo

Alguns fitopatógenos podem dinamicamente alterar o pH local para adaptar o ambiente ao seu arsenal enzimático. A amplitude na mudança de pH depende da força de tamponamento do tecido da planta, de forma que o patógeno produzirá diferentes efeitos em diferentes tecidos. Além disso, muitos patógenos aumentam sua virulência pela modulação do pH do hospedeiro. Esse mecanismo asseguraria que genes, que codificam enzimas exportadas, sejam expressos e seus produtos, secretados em condições ótimas de pH para o seu funcionamento. Por esse motivo, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o fator de transcrição PacC e a influência do pH no crescimento de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da sigatoka-negra em bananeira. O promotor do gene *pacCMf* apresenta nove possíveis sítios de reconhecimento 5'-GCCARG-3' para o fator de transcrição PacC indicando que a transcrição desse gene pode ser autoinduzida em condições de crescimento alcalino. A proteína deduzida – PacCMf é altamente conservada na região dedo de zinco. Os motivos YPXL/I de ligação a PaIA foram localizados na região C-terminal. Análises do crescimento de *M. fijiensis* em pH 3.0, 5.0, 7.0 e 9.0 revelaram a habilidade desse patógeno em alterar o pH durante o cultivo para valores entre 7.9 e 8.9, independente do pH inicial, com taxa de crescimento maior em pH 3.0.

Termos para indexação: *Mycosphaerella fijiensis*, *pacC*, transdução de sinal por pH, virulência, sigatoka-negra.

Introdução

A sigatoka-negra é uma doença foliar da bananeira causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. É a doença mais destrutiva dessa cultura e, nas regiões onde ocorre, devido à maior agressividade de seu agente etiológico e também em decorrência da alta gama de cultivares de bananeira suscetíveis, supera rápida e muito eficientemente a sigatoka-amarela. O ataque resulta na produção de frutos pouco desenvolvidos e impróprios para comercialização ou pode até causar a morte das plantas em virtude da redução da capacidade fotossintética (GASPAROTTO et al., 2006).

No Brasil, *M. fijiensis* foi detectada inicialmente no Amazonas em 1998, no Município de Tabatinga, fronteira do Brasil com a Colômbia e o Peru. Desde então, o fungo se alastrou rapidamente por todos os municípios do estado e tem se expandido rapidamente pelo País. A alta capacidade destrutiva do patógeno faz com que a doença adquira grande importância econômica e social (GASPAROTTO et al., 2006).

Estudo das condições fisiológicas possivelmente relacionadas à patogenicidade é fundamental para o desenvolvimento de ferramentas de controle da doença, e as condições de pH são um desses componentes, haja vista que os microrganismos possuem a capacidade de adaptar-se ao pH do ambiente. Um dos aspectos dessa adaptação, particularmente importante para os organismos que crescem sob ampla variação de pH, é a capacidade de expressão gênica adequada a cada pH (ARST e PEÑALVA, 2003; PEÑALVA e ARST, 2004).

Entre os genes regulados por pH ambiental, encontram-se aqueles que codificam para enzimas secretadas, permeases e reguladores da expressão de genes que codificam enzimas intracelulares ligadas à síntese de produtos, que são exportados como toxinas, antibióticos, assim como enzimas ligadas à produção de compostos capazes de modificar o pH. Nos últimos anos, têm surgido evidências de que a regulação de genes envolvidos na modificação pós-traducional das enzimas destinadas à secreção também é regulada em resposta ao pH (NOZAWA et al., 2003).

A proteína PacC reconhece o cis-elemento 5'-GCCAAG-3'. A substituição de bases resultou em substancial ou completa perda de ligação, exceto a adenina 5 (trocado por G). Um T precedente ao hexanucleotídeo aumentou a ligação da proteína (ESPESO et al., 1997).

A existência de uma cascata de sinalização, responsável pela regulação em resposta ao pH, tem sido amplamente demonstrada na maioria dos fungos filamentosos, bem como em leveduras (PEÑALVA e ARST, 2004). O fungo *A. nidulans* tem sido usado como organismo modelo para o estudo dessa cascata, e o papel funcional de cada um dos genes responsáveis pela sinalização tem sido exaustivamente analisado. Esses sinais permitem a ativação de genes, que respondem ao pH alcalino, bem como a repressão de genes expressos em pH ácido de acordo com o meio (PEÑALVA e ARST, 2004).

O sistema de sinalização é codificado por seis genes: *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* e *pall*, os dois últimos codificam proteínas transmembrana capazes de detectar o pH externo. Os produtos dos

genes *palC* e *palF* ainda não possuem papel claro na cascata de sinalização. A transdução de sinal mediada por pH culmina na clivagem do fator de transcrição *PacC* para sua forma ativa, e, para que tal fato ocorra, a proteína *PalA* liga-se a dois motivos *YPXL/I* localizados em cada lado da região de sinalização da protease. Adicionalmente, *PalA* interage com *Vps32/Snf7* e recruta a proteína *PalB*, que é uma cisteína protease (CADDICK et al., 1986; VINCENT et al., 2003; ARST e PEÑALVA 2003; TILBURN et al., 2005).

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o fator de transcrição *PacC* e a influência do pH no crescimento de *M. fijiensis* Morelet, agente causal da sigatoka-negra.

Material e Métodos

Isolados e condições de crescimento

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Amazônia Ocidental. Para as análises, foram utilizados dois isolados das fases sexuada e assexuada de *M. fijiensis* obtidos de folhas de bananeira com sintomas da doença. Os isolados foram mantidos em meio BDA a 27 °C. Para obtenção de massa micelial, os isolados foram macerados e distribuídos em *erlenmyers* de 125 mL, cada um contendo 50 mL de meio de Potato Dextrose Broth enriquecido (250 g de batata, 2 g de peptona, 1,5 g de caseína, 2 g de extrato de levedura e 10 g de glicose). Após 7 dias em crescimento, os micélios foram recuperados por filtração e lavados com água autoclavada. Para se conseguir peso estável, o micélio foi pressionado entre papel toalha e papel filtro em placa de petri, para retirada da

umidade. Obteve-se peso total de micélios e dividiu-se em 16 porções como peso inicial. Cada porção foi distribuída em *erlenmyer* de 125 mL, cada um contendo meio de Potato Dextrose Broth em pH 3.0, 5.0, 7.0 e 9.0, com 4 repetições de cada pH.

Todos os *erlenmyers* foram mantidos em mesa agitadora a 120 rpm durante 15 dias. Os micélios foram pesados novamente pelo mesmo método descrito acima, obtendo-se, assim, um peso final.

Análise de *PacC* em *M. fijiensis*

A sequência do gene que codifica *PacC* foi obtida no banco de dados do projeto sequenciamento de *M. fijiensis* (sítio <http://genome.jgi-psf.org/Mycfi1/Mycfi1.home.html>), por meio da ferramenta *blastp* utilizando *PacC* de *Aspergillus nidulans* (Tabela 1).

As ferramentas de *blast* (*tblastx* e *tblastp*) foram usadas para analisar a presença de genes homólogos a *PacC* em outros fungos. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa *Clustal W 2.0* (LARKIN et al, 2007). As inferências filogenéticas foram obtidas usando o programa *MEGA 4.0* (KUMAR et al., 2007).

Análise da região promotora do gene *pacCmF*

Para analisar a região promotora de *pacCmF*, foi utilizado o software *DNAman* para identificação do cis-elemento 5'-GCCAAG-3'.

Tabela 1. Organismos utilizados na análise filogenética.

Organismo	Número de Acesso
<i>Aspergillus oryzae</i>	BAB20756
<i>Aspergillus niger</i>	Q00203
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Q96UW0
<i>Aspergillus flavus</i>	EED55786
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	XP_001930424
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	AAV54519
<i>Aspergillus clavatus</i>	XP_001271195
<i>Ajellomyces capsulatus</i>	XP_001538988
<i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_754424
<i>Trichophyton rubrum</i>	Q9C1A4
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	XP_001591909
<i>Neosartorya fischeri</i>	XP_001263266
<i>Coccidioides immitis</i>	XP_001244284
<i>Exophiala dermatitidis</i>	ACB12920
<i>Hypocrea lixii</i>	ABK60115
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Q8J257
<i>Yarrowia lipolytica</i>	XP_500847

Resultados e Discussão

Identificação do gene que codifica PacC em *M. fijiensis*

A sequência do gene PacC de *M. fijiensis* foi localizada no banco de dados JGI (*M. fijiensis* v1.0) com auxílio da ferramenta blastp. Uma região de 2.669 pares de bases (pb) apresentando 4 introns de tamanho variável (49 a 73pb) com uma ORF (Open Reading Frame) de 1923 pb (Figura 1).



Figura 1. Esquema representando a sequência do gene PacC de *M. fijiensis* localizado no JGI, os exons são apresentados em linhas grossas; os introns, em linhas finas com os tamanhos indicados na parte inferior.

Análise da região promotora do gene PacCMf

Foram analisados 1.000 pares de bases da região promotora de PacC de *M. fijiensis* para a presença do cis-elemento (5'-GCCARG-3'). Foram localizados nove sítios de reconhecimento para o fator

PacC, cujas posições estão listadas na (Tabela 2). O fator de transcrição PacC liga-se aos cis-elementos para ativação da transcrição em condições de pH alcalino (ESPESO et al., 1997). Esses dados indicam que PacCMf sofre autorregulação transcricional.

Tabela 2. Análise da região promotora de PacC de *M. fijiensis* indicando as posições de cada sítio de consensos para o fator PacC .

Posições	Consensos
-1pb	CCCTCTGGAGATCCATCAC GCCAAGA AATG
-50pb	ACGTCTTGGCAGCAGCGCAG CCAGG CTCAGCCAG
-65pb	CAACAAGACAGCTTCACGT CTTGGC AGCAGCGCA
-368pb	GAAGGCAGTGAGGCAGGCG CTTGGC ACAGTTGGC
-449pb	TTGGCAGCAGGGATGGCGG CTTGGC AGCGCTCTC
-469pb	CTCCGAAGTCAGCTTGATT CTTGGC AGCAGGGAT
-706pb	GGGGTGTGGTTTAGAGGGT CTTGGC ATTCAATTAT
-961pb	CATTTCCGTGCGTCTTGGCT CTTGGC ATGTTGCAT
-967pb	ATCTT CATTCCGTGCGT CTTGGC CTTGGCATG

Caracterização de PacC em *M. fijiensis*

A proteína deduzida PacCMf revelou que os motivos de reconhecimento proteína-proteína YPXL/I de

interação com PalA estão localizados na região C-terminal da proteína PacC entre os aminoácidos 440 e 633, em *M. fijiensis* cuja sequência é YPSL (Figura 2). Mutações em qualquer um dos dois sítios YPXL/I impedem o processamento de PacC (DÍEZ et al., 2002).

		440				
361	GGHQYRSSNS	PPNFQNNLNO	GGMGGV GAMS	SSSGMOGMTQ	SASALDTPAL	TPASVSSYNS
421	SSHSPMSSH	RASFGSAHMY	PSL PAVTGMS	DLGAGYPTTT	SAPASGLASG	FEGLDGRRYS
481	GGRLQRQAPS	ASSEQQDTEM	GDAEDGS RTP	KASDAKRPKS	KGNSSIDPAL	RGENEGSDSA
541	STPAAQSEGA	EDKQEQWVE	NIRLIEALRK	WVGERLKNGE	YDNAEASKSD	DAKDGADVEM
601	KNPVDPSNAV	EEKLKSAL EG	EKEKASASGD	AK YPSL PIAA		
				633		

Figura 2. Motivos de reconhecimento YPSL para interação com PalA, localizados na região C-terminal da proteína PacCMf entre os aminoácidos 440 e 633.

O alinhamento de PacC mostrou que a região dedo de zinco mantém-se extremamente conservada em todos os organismos utilizados que contém PacC/Rim101 (Figura 3). O aminoácido triptofano (W), localizado entre duas cisteínas entre o primeiro e o segundo dedo de zinco, é considerado um fator crítico na estrutura e função de PacC. No terceiro dedo de zinco, a glicina (Q) envolvida no contato com o DNA e as duas lisinas (K) que precedem a histidina

(H) estão relacionadas à localização nuclear e estão também conservadas em todos os organismos (FERNANDEZ-MARTÍNEZ et al., 2003). O fato de a região dedo de zinco estar altamente conservada em todos os organismos analisados é um indicativo de que essa sequência é importante para sobrevivência desses organismos, tanto que se mantém conservada durante a evolução. Esse achado também é um indício de que PacC em *M. fijiensis* pode ser funcional.

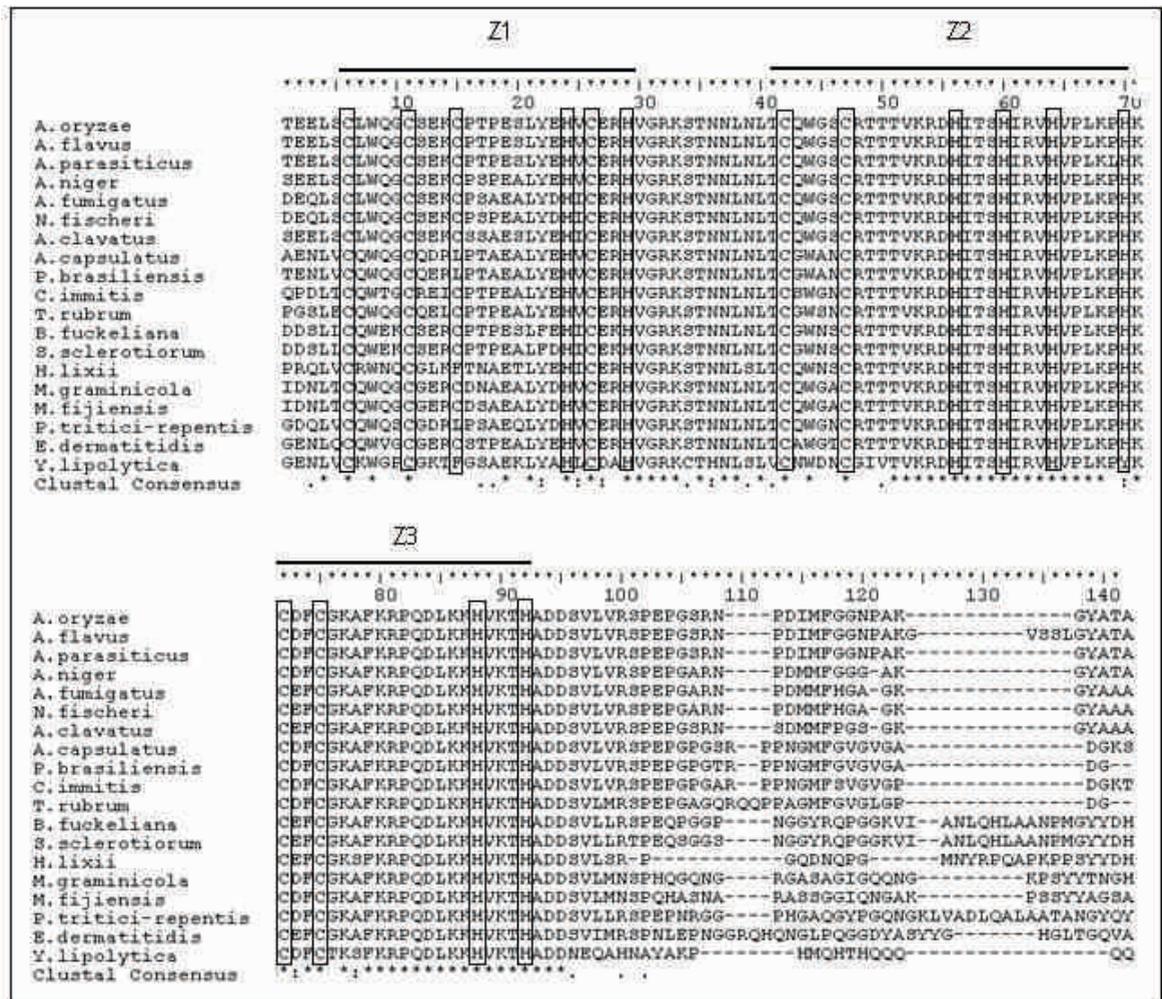


Figura 3. Alinhamento de PacC de *M. fijiensis* com as proteínas homólogas em outros fungos. As cisteínas do dedo de zinco e as histidinas estão destacadas em colunas. Os organismos e o número de acesso das proteínas estão listados na Tabela 1.

A análise filogenética apresentada na Figura 4 mostra que o fator de transcrição de *Yarrowia lipolytica* Rim101, que é o homólogo de PacC em leveduras, está enraizando o cladograma, o que está de acordo com o esperado do ponto de vista evolutivo. A análise revela também o agrupamento de todos os ascomicetos pertencentes ao gênero *Aspergillus* utilizados na análise, exceto *Neosartorya fischeri*, que está mais proximamente relacionada com *A.*

fumigatus; por outro lado ambos pertencem à mesma família (Trichocomaceae) (Figura 4A). Os organismos pertencentes à ordem Onygenales, da qual faz parte o ascomiceto *Trichophyton rubrum*, que é um importante agente de dermatofitoses capaz de parasitar tecidos como pele e unha, mostram-se agrupados no mesmo ramo (Figura 4B). *M. fijiensis* está mais relacionado a *M. graminicola*, agente causal da septoriose no trigo (Figura 4C).

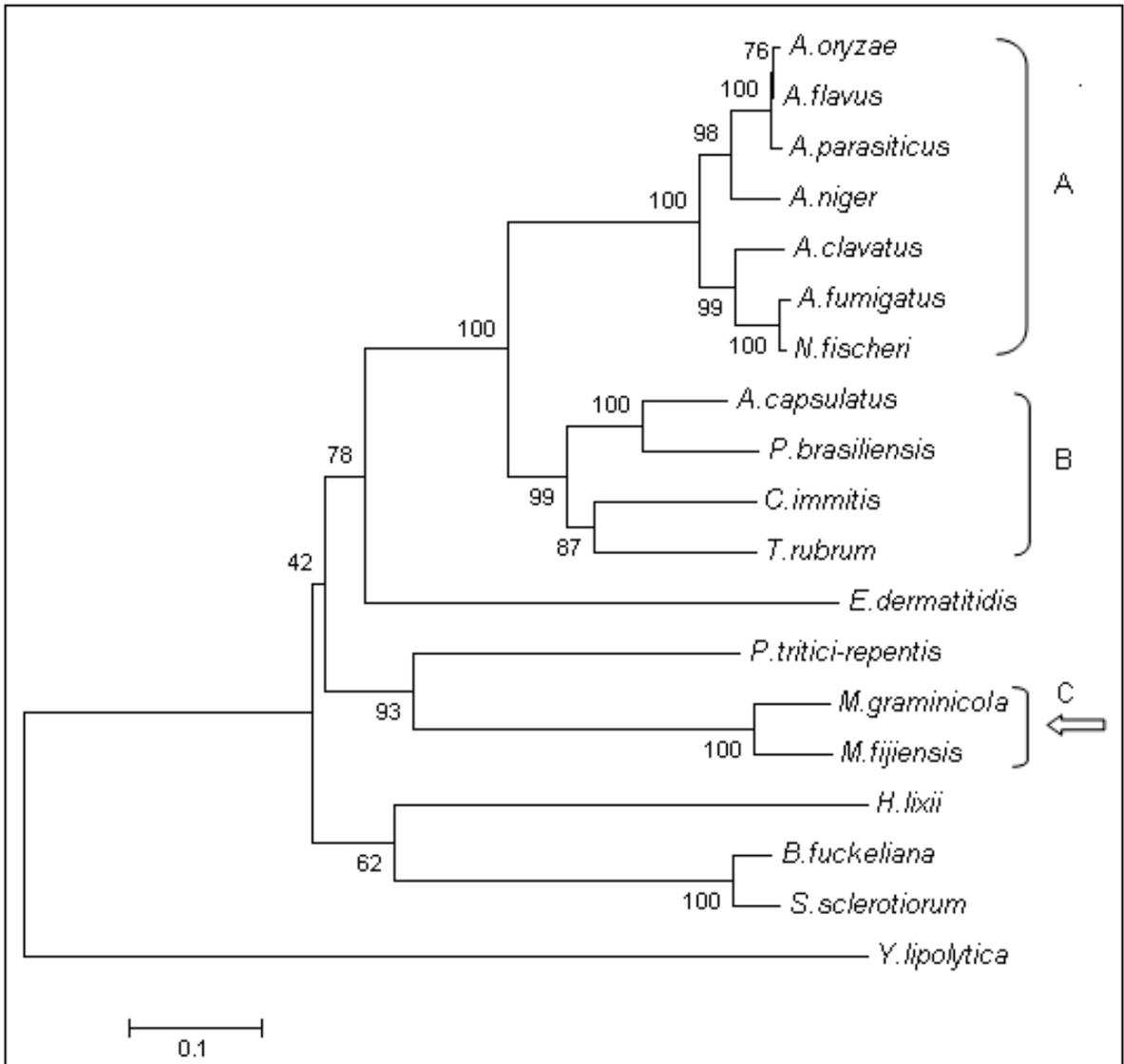


Figura 4. Análise filogenética do fator de transcrição PacC/Rim101 de *M. fijiensis* usando o programa MEGA 4.0 pelo método Neighbor-Joining (NJ) com bootstrap de 1.000 réplicas. Os organismos utilizados e o número de acesso estão localizados na Tabela 1.

Influência do pH no crescimento de *M. fijiensis*

Para determinar a taxa de crescimento em relação ao pH, dois isolados de *M. fijiensis*, um sexuado e outro assexuado, foram crescidos em meio BD em pH 3,0, 5,0, 7,0, e 9,0. A avaliação do crescimento foi feita por meio do peso seco após 15 dias de incubação, os resultados são mostrados na Figura 5. A taxa de crescimento de *M. fijiensis* foi maior no meio ajustado inicial-

mente com o pH 3,0, e quanto maior o pH, menor o crescimento, tanto no isolado sexuado quanto no assexuado, com uma leve diferença a partir do pH 5,0. Contudo, independentemente do pH inicial, *M. fijiensis* tem a habilidade de alterar pH do meio, durante o cultivo, para valores entre 7,96 e 8,90 (Tabela 3). Os fungos alteram o pH ambiente como estratégia para garantir que enzimas extracelulares sejam secretadas somente em valores de pH onde possam ter uma atividade eficaz (PEÑALVA et al., 2008).

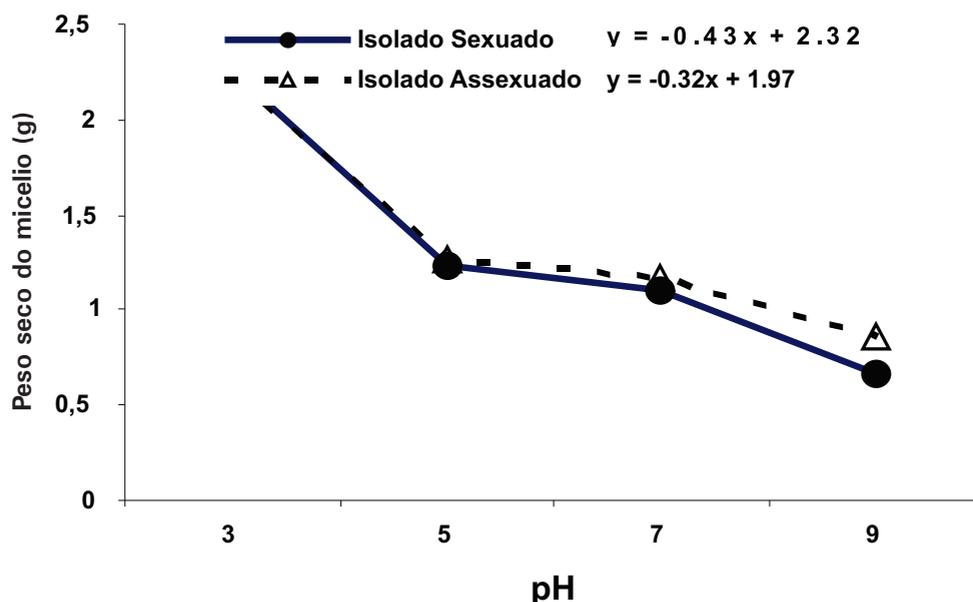


Figura 5. Gráfico da taxa de crescimento em relação à variação de pH.

Tabela 3. Média dos pHs, antes e depois do crescimento dos isolados de *M. fijiensis*, e taxa de crescimento.

pH inicial	pH final	Média de crescimento (g)
3,0	8,44	1,83
5,0	7,96	0,88
7,0	8,22	0,73
9,0	8,90	0,41

Conclusões

A presença dos nove consensos 5'GCCARG no gene *pacCMf* sugere autorregulação transcricional.

A análise da proteína deduzida, bem como os dedos de zinco altamente conservados, e o motivo YPSL na proteína PacC em *M. fijiensis* indicam que esse fator de transcrição está potencialmente ativo nesse fitopatógeno.

As alterações do pH durante o crescimento indicam que *M. fijiensis* possui habilidade de alterar as condições de pH do ambiente para adequar o seu arsenal enzimático à melhor condição de atividade.

Agradecimentos

A Deus, pela força e determinação para superar os obstáculos e atingir meus objetivos.

Ao Dr. Gilvan Ferreira da Silva, pela oportunidade, dedicação e paciência em me orientar durante esse trabalho.

À Embrapa Amazônia Ocidental, por possibilitar o desenvolvimento dos experimentos.

Ao CNPq, pela bolsa.

À minha família, pela compreensão e força que me deram nas horas críticas.

À Dra. Nelcimar Reis Sousa, pela análise de dados estatísticos.

Ao Eric, pela companhia e pelos ensinamentos laboratoriais na microbiologia.

Ao Edil, pelo auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos técnicos Jéferson Chagas da Cruz e Anthony Jasson Zubiato Augustin, pelos ensinamentos de procedimentos laboratoriais na biologia molecular.

Referências

- ARECHIGA-CARVAJAL, E. T.; RUIZ-HERRERA, J. The RIM101/*pacC* homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. **Eukaryot Cell**, v. 4, p. 999-1008, 2005.
- ARST, H. N.; PENALVA, M. A. PH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. **Trends in Genetics**, v. 19, p. 224-231, 2003.
- CADDICK, M. X.; BROWNLEE, A. G.; ARST JR., H. N. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and General Genetics**, v. 203, p. 346-353, 1986.
- DIEZ, E. et al. Activation of the *Aspergillus PacC* zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. **Embo Journal**, v. 21, p. 1350-1359, 2002.
- ESPESO, E. A. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. **Journal of Molecular Biology**, v. 274, p. 466-480, 1997.
- FERNANDEZ-MARTINEZ, J. et al. Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. **Journal of Molecular Biology**, v. 334, p. 667-684, 2003.

GASPAROTTO, L. et al. **Sigatoka-negra da bananeira**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2006. 177 p.

KUMAR, S. et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Molecular Biology and Evolution. EUA, May 7, 2007. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/msm092v1?ck=nck>>. Acesso em: 3 maio 2009.

LARKIN, M. A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics Applications Note**, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007.

NOZAWA, S. R. et al. The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene pacC-dependent pathway. **Fungal Genetics and Biology**, v. 39, p. 286-295, 2003.

PENALVA, M. A.; ARST JR., H. N. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, p. 425-451, 2004.

PEÑALVA, M. A. et al. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 291-300, 2008.

TILBURN, J. et al. Mutational analysis of the pH signal transduction component PalC of *Aspergillus nidulans* supports distant similarity to BRO1 domain family members. **Genetics**, v. 171, p. 393-401, 2005.

VINCENT, O. et al. YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, p. 1647-1655, 2003.