

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A CARACTERIZAÇÃO DA CADEIA RESPIRATÓRIA DO FUNGO *MONILIOPHTHORA PERNICIOSA*

TONI, I.M.; THOMAZELLA, D.P.T.; PEREIRA, G.A.G.

Laboratório de Genômica e Expressão

Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil

Introdução

O fungo basidiomiceto *M. perniciosa* é o patógeno causador da doença vassoura-de-bruxa no cacauieiro (*Theobroma cacao*). Sua introdução na região sul da Bahia, principal produtora do país, proporcionou sérios prejuízos para a região e um grande obstáculo para a viabilidade econômica da cultura cacauieira no Brasil. Os sintomas da doença compreendem perda da dominância apical, clorose e hipertrofia e hiperplasia dos tecidos infectados, resultando no enfraquecimento da planta e diminuição na sua produção.

Muitos fungicidas empregados em lavouras, como as drogas a base de estrobilurinas, se baseiam na inibição de complexos específicos da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais (CTE). A estrobilurina inibiu substancialmente o crescimento do fungo em testes em laboratório, mas *M. perniciosa* mostrou-se insensível a substância em campo. Especula-se que alterações no metabolismo energético do fungo ao longo de seu desenvolvimento causem as diferenças observadas (Figura 1). A resistência ao fungicida seria explicada pela atividade de uma oxidase alternativa (Aox), cujo gene foi encontrado no genoma do fungo. Assim, visando entender o metabolismo energético do fungo ao longo de seu desenvolvimento, estabeleceu-se metodologia para propiciar análises bioquímicas dos componentes da CTE do patógeno, pois estes componentes podem ser alvos em potencial no combate à doença.



Figura 1: Representação das fases apresentadas pelo fungo *M. perniciosa* ao longo de seu desenvolvimento. Os testes em laboratório com a substância estrobilurina foram feitos em material em fase saprotrófica. Em campo, no entanto, o fungo pode ser encontrado em todos os estágios. Análises genéticas comprovaram que o fungo em fase saprotrófica apresenta expressão do gene *Aox* relevantemente menor que em fase biotrófica.

Metodologia

Abordagens testadas quanto a eficiência e credibilidade para a futura análise da cadeia de transporte de elétrons.

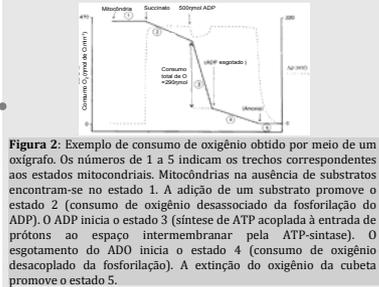
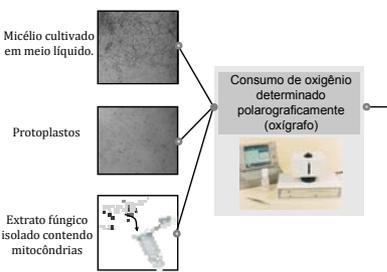


Figura 2: Exemplo de consumo de oxigênio obtido por meio de um oxígrafo. Os números de 1 a 5 indicam os trechos correspondentes aos estados mitocondriais. Mitocôndrias na ausência de substratos encontram-se no estado 1. A adição de um substrato promove o estado 2 (consumo de oxigênio desacoplado da fosforilação do ADP). O ADP inicia o estado 3 (síntese de ATP acoplada à entrada de prótons ao espaço intermembranar pela ATP-sintase). O esgotamento do ADO inicia o estado 4 (consumo de oxigênio desacoplado da fosforilação). A extinção do oxigênio da cubeta promove o estado 5.

Abordagem	Processo
Micélio	Fungo em fase saprotrófica cultivado em meio líquido <i>Malte light</i> por 7 dias a 28°C e 200 rpm
Protoplastos	Micélio cultivado conforme descrito acima → Ação por 4 horas de 20 mg/ml-1 Glucanex (NovoNordisk) e 10 mg/ml-1 BSA em tampão 10 mM fosfato de sódio e 0,8M KCl, pH 7,8
Extrato mitocondrial	Testes com diversos osmolitos (Tabela 2) → Determinação do tempo ideal de ação da enzima → Limpeza de debris e precipitação dos protoplastos → Processamento em liquidificador (4 ciclos de 15 segundos) → Limpeza de debris e precipitação do extrato mitocondrial

Tabela 2: Principais substâncias utilizadas nos ensaios de consumo de oxigênio no oxígrafo e seus similares. Estão representados inibidores e estimuladores específicos e os respectivos complexos da CTE onde atuam. As funções desses complexos também são apresentadas de forma resumida.

Inibidor específico	Estimulador específico	Componente da CTE onde atuam	Principal atividade do componente
Amital, rotenona e piercidina-A	NADH, auxiliado por malato / glutamato	NADH:ubiquinona oxidoreductase (Complexo I)	Atrai a transferência de elétrons do NADH para a ubiquinona, colaborando com a translocação de prótons
Malonato	Succinato	Succinato desidrogenase (Complexo II)	Transfere os elétrons da oxidação do succinato a fumarato para a ubiquinona, sem participar da transferência de prótons
Antimicina-A e Estrobilurina	-	ubiquinona:citocromo c oxidoreductase (Complexo III)	Reduz a ubiquinona com translocação de prótons e transfere os elétrons para o complexo IV
KCN (cianeto), CO (monóxido de carbono) e NO (óxido nítrico)	TPMD / Ascorbato	Citocromo c oxidase (Complexo IV)	É a oxidase terminal da via principal, transferindo elétrons para o oxigênio
SHAM e N-propilgalato	GMP (guanosina monofosfato)	Oxidase alternativa (AOX)	Catalisa a redução do oxigênio a água ao nível da ubiquinona, sem translocamento de prótons

Resultados

Os testes iniciais com hifas intactas do fungo geraram respostas pouco confiáveis após a exposição do material a inibidores e estimuladores de componentes da CTE (Figura 3).

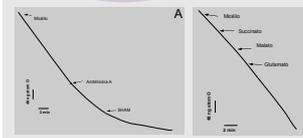


Figura 3: Gráficos representando o consumo de oxigênio de hifas após a adição das substâncias indicadas. (A) Houve uma pequena inibição provocada por Antimicina A, cujo residuo não sofreu muita interferência de SHAM. Apesar da inibição não ter sido total, dá indícios da origem mitocondrial do consumo de oxigênio. (B) O consumo de oxigênio não foi afetado por nenhum dos estimuladores acrescentados, que não permite confirmar a origem mitocondrial da respiração ou a realização de testes envolvendo potencial de membrana.

Para a análises envolvendo protoplastos foi necessário aumentar a eficiência da metodologia. O tempo ideal de ação da enzima sobre o material foi estabelecido em 3 horas (Figura 4A) e o osmolito Sorbitol (1M) em tampão Tris HCl (100mM) foi o mais adequado para manutenção das células (Figura 4B).

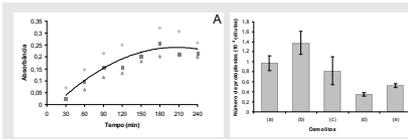


Figura 4: Testes para melhorar a eficiência de protoplastização. (A) Quantidade de protoplastos, representada pela absorbância, o longo do tempo em três amostras diferentes. Os quadradinhos representam as médias e a linha de tendência está indicada. (B) Rendimento médio de duas amostras tratadas com os seguintes osmolitos: (a)Sorbitol 0,95 M, Tris HCl 10mM, pH 7,0; (b)Sorbitol 1 M, Tris HCl 100mM, pH 5,8; (c)Sorbitol 0,6 M, Tris HCl 100mM, pH 7,0; (d)Sacarose 20%, Tris HCl 25mM, pH 7,5.

As curvas de consumo de oxigênio apresentaram insensibilidade a alguns estimuladores e inibidores (Figura 5). Também não foi possível comprovar se as taxas de consumo de oxigênio eram estritamente mitocondriais ou decorrentes da atuação de outros componentes celulares, como os peroxissomos (Figura 5B).

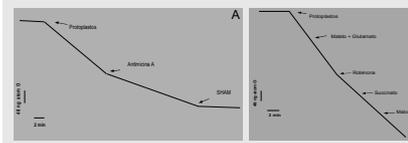


Figura 5: Gráficos representando o consumo de oxigênio de protoplastos após a adição das substâncias indicadas. (A) Houve uma inibição considerável provocada por Antimicina A e o acréscimo subsequente de SHAM inibiu totalmente o consumo de oxigênio, que dá indícios de sua origem mitocondrial. (B) O consumo de oxigênio não foi afetado pelos estimuladores acrescentados, que não permite confirmar a origem mitocondrial da respiração. A inibição parcial provocada por rotenona pode indicar a provável atividade de outros componentes celulares.

O isolamento de mitocôndrias do fungo propiciou análise dos principais controles de acoplamento e qualidade mitocondrial (razão ADP:O, controle respiratório e presença de linha de base - Figura 6). A linha e base, representada pelo estado 1 (Figura 2), apresentou um consumo médio de $1,83 \pm 0,33 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$ (n=8), que pode ser indicativo de contaminantes. O controle respiratório e a razão ADP:O foram determinadas após uma série de ensaios (Tabela 3).

Taxa de consumo de oxigênio (nmol O ₂ ·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ proteína)	Estado 3	Estado 4	Controle respiratório	Razão ADP:O
	4,52±0,72	3,22±0,89	1,43±0,13	2,71±1,05

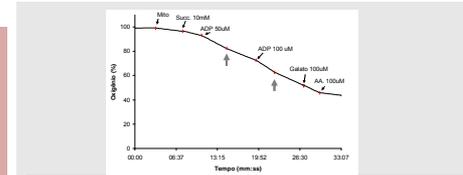


Figura 6: Modelo correspondente a um ensaio de consumo de oxigênio realizado no dia 27/03/08 com 0,91µg de proteínas. As barras vermelhas indicam a aplicação de substâncias. As setas cinzas, indicam a transição do estado 3 para o estado 4. Preparação mitocondrial (Mito), Succinato (Succ), N-propil-galato (Galato) e Antimicina A (AA). O controle respiratório é dado pela razão entre os estados 3 e 4, enquanto a razão ADP:O é dada pela proporção entre moléculas de ADP fornecidas e moléculas de Oxigênio consumidas para fosforilar esse ADP.

Conclusões

A utilização de hifas integras nos ensaios de consumo de oxigênio não foi adequada, visto que a metodologia não gerou resultados confiáveis.

A utilização de protoplastos para a caracterização da cadeia respiratória do fungo *M. perniciosa* mostra-se bastante eficiente quando se analisa a via alternativa e o complexo III, mas ensaios envolvendo substâncias como malato, glutamato, succinato, malonato, não são conclusivos.

O extrato mitocondrial atendeu aos principais critérios de qualidade utilizados em análises bioquímicas de cadeias respiratórias, como presença de linha de base, razão ADP:O, controle respiratório e formação de potencial de membrana.

Ainda há a necessidade da determinação de inibidores e estimuladores ideais e suas concentrações, para se conduzir análises criteriosas dos componentes da cadeia transportadora de elétrons de *M. perniciosa*.