

BASSALO, MC¹ ✉ ; Oliveira, BV¹ ; Pereira, GAG¹

¹Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) – Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Agência Financiadora: FAPESP

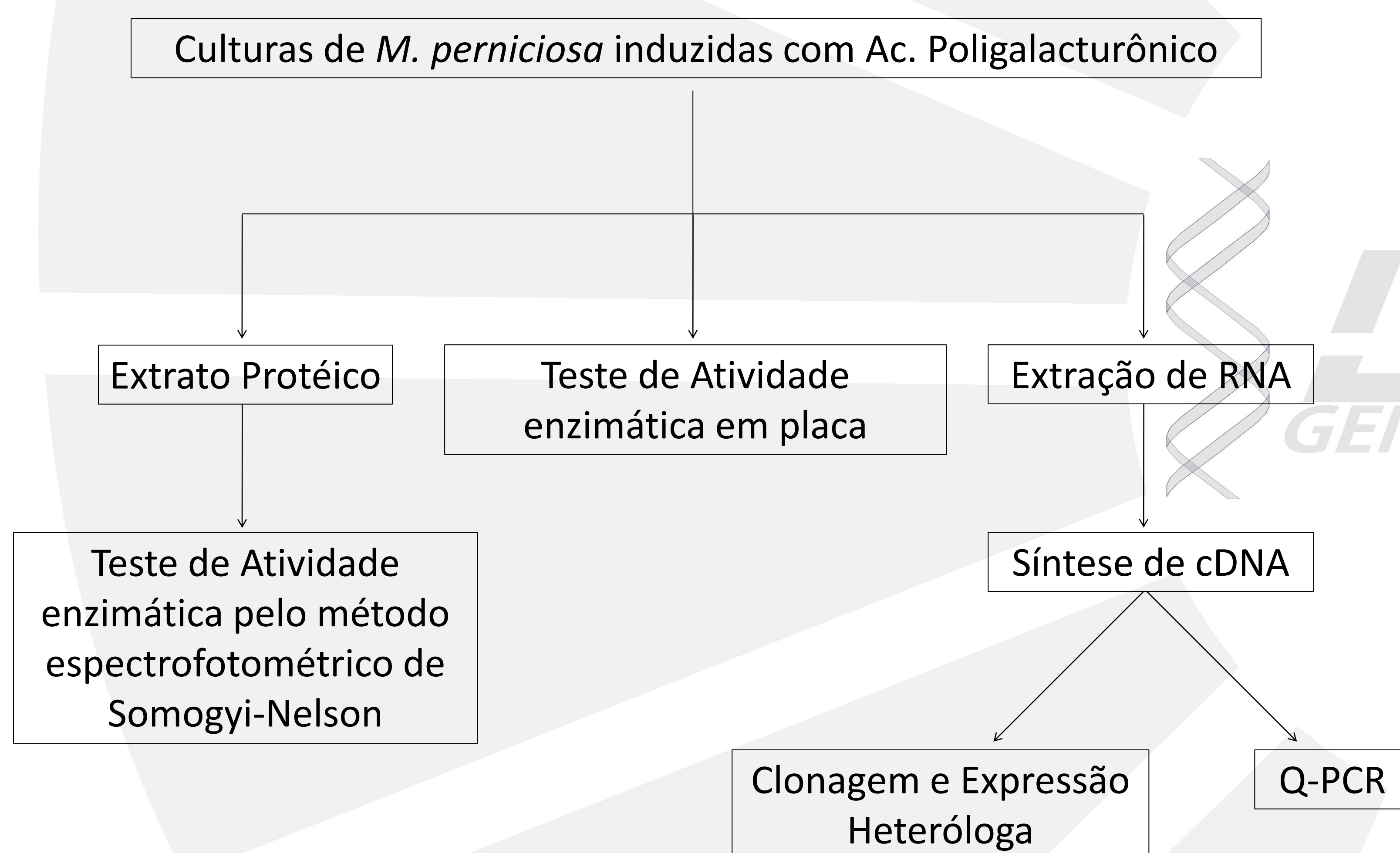
✉ mbassalo@lge.ibi.unicamp.br

INTRODUÇÃO

O fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* é o agente causador da Vassoura-de-bruxa (VB) do cacaueteiro, doença considerada como uma das principais fitopatologias do Brasil. O fungo possui um ciclo de vida com uma fase biotrófica (intercelular – pobre em glicose) e uma necrotrófica (intracelular). Para a fase biotrófica, microarranjos de DNA evidenciaram que diversos genes que codificam pectinases estão expressos, sugerindo que o fungo utilize a pectina como fonte de carbono. A degradação da parede celular é essencial para a progressão da doença para a fase necrotrófica.

Dentre as pectinases conhecidas, as endopoligalacturonases (endoPGs), capazes de degradar o domínio homogalacturano não-metilado da pectina, destacam-se por serem comprovadamente essenciais para a fitopatogenicidade de vários fungos. Além disso, são conhecidos peptídeos inibidores das endoPGs (PGIPs). A análise do genoma de *M. perniciosa* acusou 3 possíveis genes codantes para endoPGs. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo a caracterização das endoPGs de *M. perniciosa*, avaliando a sua importância na progressão da VB; além do efeito dos PGIPs sobre as mesmas.

MATERIAIS E MÉTODOS



RESULTADOS E DISCUSSÕES

-Detecção da atividade enzimática em placas

Foi verificado o crescimento do fungo tanto em pectina quanto em ácido poligalacturônico como fontes únicas de carbono (Figura 1). O crescimento em Ácido Poligalacturônico somente seria possível somente mediante a atividade de endoPGs.

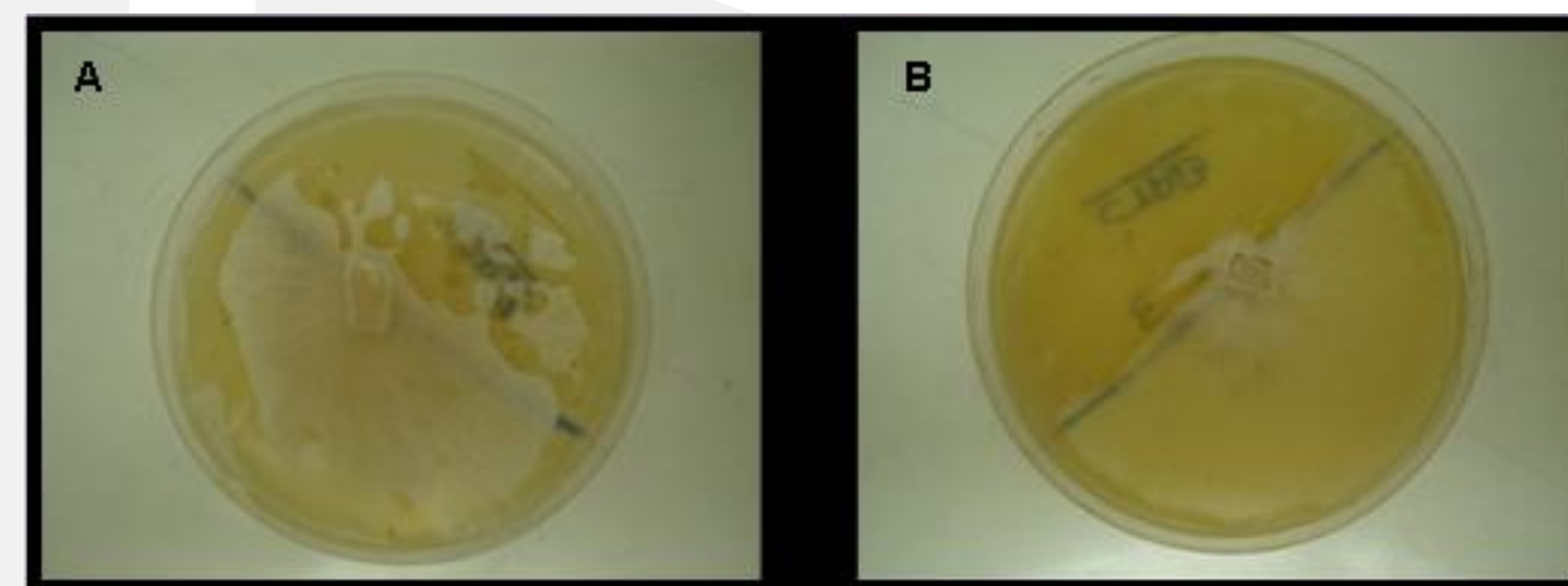


FIGURA 1 - A. Pectina como fonte única de carbono. B. Ácido Poligalacturônico como fonte única de carbono. Regiões claras evidenciam degradação dos nutrientes em questão (adição de solução 1% CTAB)

-Detecção da atividade enzimática pelo método Somogyi-Nelson

Foi verificada a degradação do substrato das endoPGs.

Amostras Utilizadas	Relação Enzima/Substrato	Quantidade de Açúcares Reduzidos Liberados
Amostra A	2:1	0,33%
Amostra B	3:1	5,31%
Controle Negativo	0:1	0,00%

-Análise da Expressão dos genes EndoPGs por Q-PCR

A partir do RNA extraído e cDNA sintetizado, foi possível amplificar a ORF das 3 seqüências codantes para endoPGs. Com a realização dos experimentos de Q-PCR, foi confirmada a expressão de todos os genes em amostras do fungo *in vitro* e *in planta*.

-Clonagem e Expressão Heteróloga da EndoPG1

A endoPG1 foi clonada no vetor pGEM T-Easy (Promega), e a confirmação do inserto foi feita pela digestão com enzimas de restrição cujos sítios flanqueiam o gene (Figura 2).

O inserto foi subclonado no vetor de expressão pETSUMO da Invitrogen (Figura 3 e 4) e confirmado por seqüenciamento.

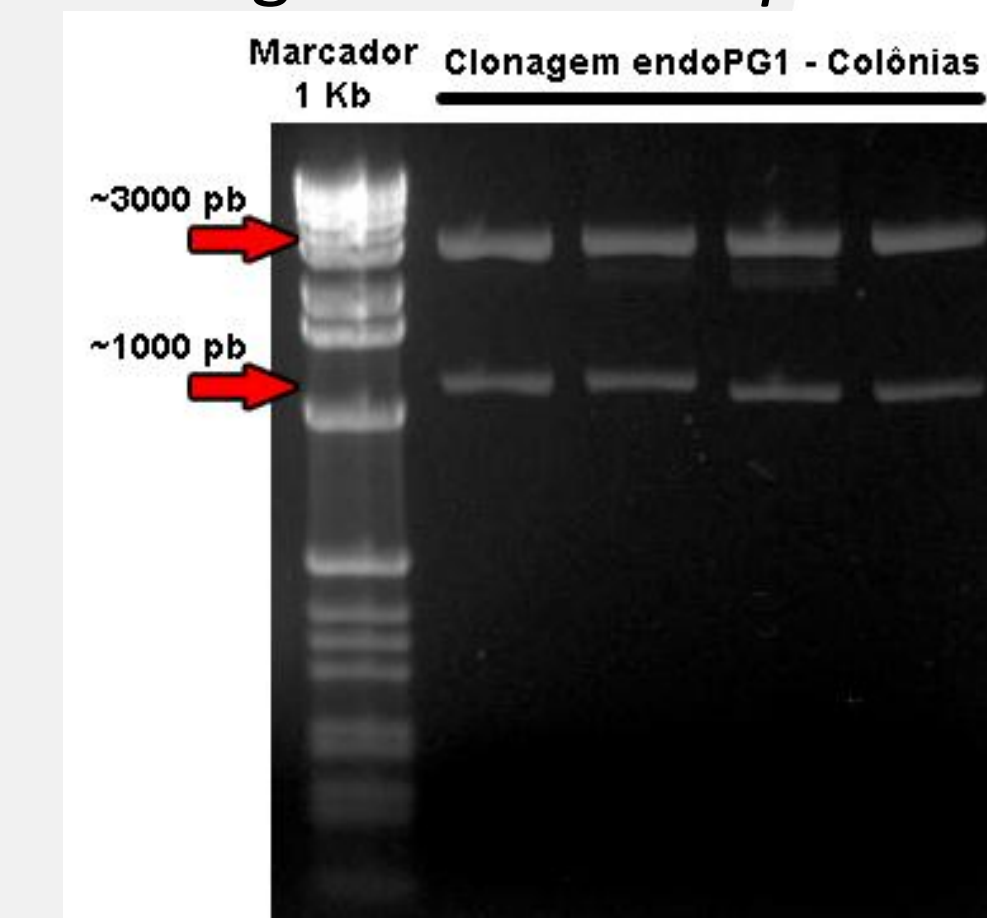


FIGURA 2 – Digestão do cassete PGEM_EndoPG1 com as enzimas BamHI e XhoI, confirmando a clonagem do gene (banda de 1000 pb)

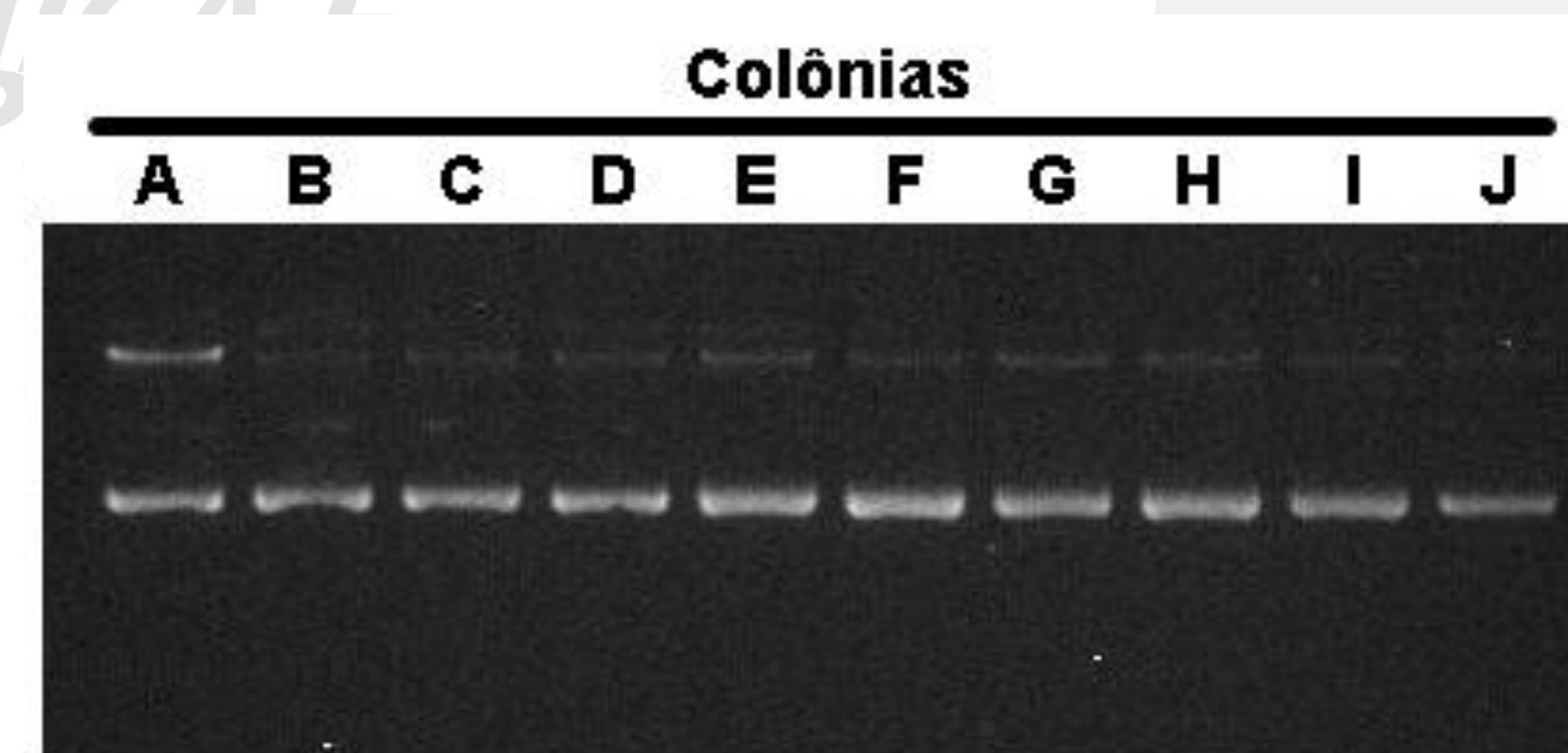


FIGURA 3 – Mini-preparação do DNA plasmidial de colônias contendo a endoPG1 subclonada no vetor pETSUMO

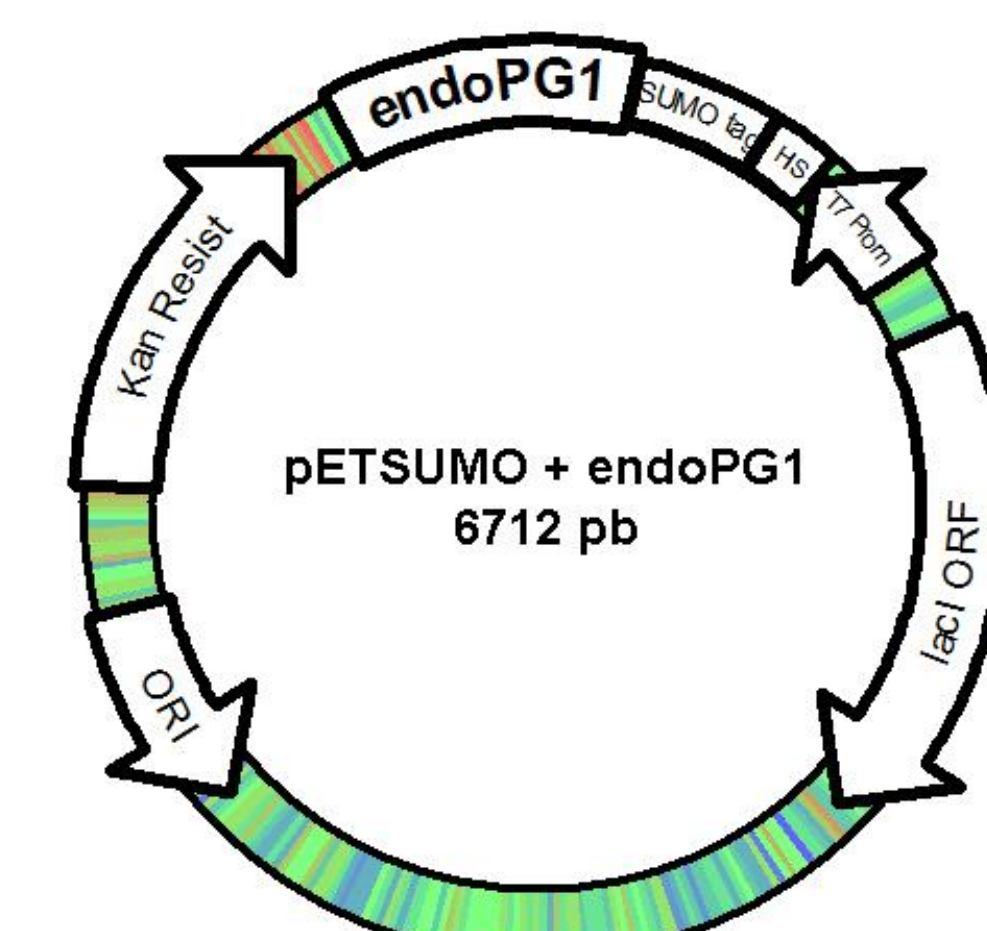


FIGURA 4 – Subclonagem da endoPG1 no vetor pETSUMO

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O fungo *Moniliophthora perniciosa* de fato possui endoPGs, visto que tanto os genes relacionados estão expressos quanto as enzimas estão ativas e funcionais.

Além disso, o fato de o fungo ter crescido em meio contendo Ácido Poligalacturônico como fonte única de carbono é um forte indício de que essas enzimas são essenciais para o crescimento do fungo em sua fase biotrófica, sendo um potencial alvo para bloquear a patogenicidade de *M. perniciosa* e controlar a Vassoura-de-bruxa.

Os próximos passos para o desenvolvimento do projeto são a clonagem das endoPGs 2 e 3, e a expressão heteróloga de todas elas seguida de sua caracterização.