

GILVAN FERREIRA DA SILVA

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM ENDO-XILOGALACTURONANA HIDROLASE, O FATOR DE TRANSCRIÇÃO PacC E A PROTEÍNA PaIA EM *Crinipellis pernicioso*, AGENTE CAUSAL DA VASSOURA-DE-BRUXA NO CACAUEIRO (*Theobroma cacao*)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586c
2007

Silva, Gilvan Ferreira da, 1974-

Clonagem e caracterização dos genes que codificam endo-xilogalacturonana hidrolase, o fator de transcrição PacC e a proteína PalA em *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao*) / Gilvan Ferreira da Silva. – Viçosa : UFV, 2007. xi, 91f. : il. ; 29cm.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fungos - Genética. 2. Enzimas pectinolíticas.
3. *Crinipellis pernicioso*. 4. Vassoura-de-Bruxa (Fitopatologia). 5. Clonagem molecular.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.2959

GILVAN FERREIRA DA SILVA

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM ENDO-XILOGALACTURONANA HIDROLASE, O FATOR DE TRANSCRIÇÃO PacC E A PROTEÍNA PaIA EM *Crinipellis pernicios*, AGENTE CAUSAL DA VASSOURA-DE-BRUXA NO CACAUEIRO (*Theobroma cacao*)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADO: 19 de janeiro de 2007

Prof. Júlio César Mattos Cascardo
(Co-orientador)

Prof^a Elza Fernandes de Araújo
(Co-orientador)

Prof^a Célia Alencar de Moraes

Prof^a Denise Mara Soares Bazzolli

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Orientadora) - UFV

A minha querida mãe,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Para mim, talvez, esta seja a parte mais importante da tese. Não consigo imaginar a realização deste trabalho sem o alicerce que tive durante toda minha graduação e pós-graduação, onde a família, os professores e amigos foram peças fundamentais.

Por isso agradeço:

Antes de qualquer coisa, a Deus, por não somente ter me dado habilidades vitoriosas, mas também por ter me dado à oportunidade de conhecer pessoas especiais que de alguma forma me ajudaram a crescer e pular obstáculos.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela oportunidade e pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, em especial a minha mãe que sempre esteve presente, mesmo que não fisicamente, nos momentos complicados dessa história, sempre me apoiando e confortando.

Ao meu irmão Humberto e aos meus sobrinhos.

Ao Eric pela companhia durante esses quatro anos de Viçosa.

À professora Marisa não só pela orientação, mas também pelo exemplo de profissionalismo e dedicação com que conduz seu trabalho.

À professora Elza pelo apoio sempre que necessitei.

À professora Célia principalmente pelo incentivo e confiança.

Aos demais professores do Departamento de Microbiologia, que contribuíram para minha formação profissional.

Aos meus amigos funcionários do BIOAGRO Evandro, Danilo, Toninho, Raimundo, Paulo e José Reinaldo pelos serviços prestados.

Aos “GRANDES” amigos do Laboratório de Genética, aos que se foram e aos atuais pela boa convivência: João Batista, Jildete, Klédna, Rodrigo Barros, Ximena, Marcos, Ireninha, Vivi, Mariana, Janaína, Leonardo, Daniel, Júnio, Michelle, Leandro, Swiany, Maycon, Rodrigo BQI, Rafael, Guilherme e Darlene,

Em especial aos amigos Marcos Soares e Klédna, pelos bons momentos, e pelos ensinamentos, foi muito bom trabalhar com vocês, era hilário.

Com muito carinho a Swiany sempre presente e pela amiga incondicional.

A Viviane Aline que sempre foi um anjinho, uma pessoa muito especial que apesar da distância, o tempo não apagará os bons momentos, para você todo sucesso do mundo.

Gostaria de agradecer ao pessoal do laboratório de Genômica e Expressão Gênica da UESC onde fui muito bem recebido por todos no período em que passei em Ilhéus.

Agradeço a todos os membros de minha banca de defesa pela participação e valiosas sugestões a esse trabalho.

Agradecimento especial pela valiosa ajuda do Rafael pela formatação de todas as figuras da tese.

Aos Amigos dos Laboratórios de Fisiologia, em especial ao Julio, Talita e Cássia.

Aos amigos do Petróleo, Tânia pelo apoio e descontração, Bruna sempre alegre, e a Cynthia Canedo pela amizade sinceridade e ajuda durante o início do meu doutorado.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia Industrial, principalmente ao Zé Carlos.

Ao amigo Juliano Lino pela ajuda em todos os momentos.

Ao casal Elisa e Roberto pela amizade.

BIOGRAFIA

Gilvan Ferreira da Silva, filho de Raimunda Maria da Silva e João Ferreira da Silva, nasceu em 09 de dezembro na cidade Poço Verde, Estado de Sergipe.

Em março de 1995, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Sergipe, graduando-se em licenciatura em outubro de 1999.

Atuou como professor substituto de Genética e Evolução de abril de 2000 a fevereiro de 2001 na Univesidade Federal de Sergipe.

Em fevereiro de 2001 iniciou o mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade Federal de Lavras, defendendo tese em fevereiro de 2003.

Em março de 2003 ingressou no doutorado em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa.

Defendeu a tese de doutorado em janeiro de 2007, concluindo as exigências para a obtenção do título de Doctor Scientia em Microbiologia.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO.....	01
1. <i>Crinipellis perniciosa</i>	01
2. Fatores de patogenicidade e virulência.....	03
3. Pectinases em fungos fitopatogênicos.....	05
4. Proteínas inibidoras de poligalacturonase (PGIPs).....	08
5. Efeito do pH do ambiente em Fungos.....	10
6. Importância do pH na patogênese em fungos.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

CAPÍTULO 1 – Isolamento e caracterização do gene que codifica endo-xilogalacturonana hidrolase de <i>Crinipellis perniciosa</i> , agente causal da vassoura-de-bruxa no cacaueiro (<i>Theobroma cacao</i>).....	27
1. RESUMO.....	28
2. INTRODUÇÃO.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	31
3.2. Isolamento do gene que codifica a endo-xilogalacturonana hidrolase de <i>C. perniciosa</i>	31
3.3. Sequenciamento e análise das seqüências.....	34
3.4. Detecção do número de cópias do gene do <i>xghCp</i>	34
3.5. Extração de RNA total e análise por RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction).....	35

4. RESULTADOS.....	37
4.1. Caracterização da endo-xilogalacturonana hidrolase de <i>C. pernicioso</i>	37
4.2. Análise da transcrição do gene <i>xghCp</i>	42
4.3. Alinhamento das seqüências e análise filogenética.....	42
5. DISCUSSÃO.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

CAPÍTULO 2 – Caracterização dos genes relacionados ao pH: <i>pacC</i> e <i>palA</i> de <i>Crinipellis pernicioso</i> , agente causal da vassoura-de-bruxa no cacauero (<i>Theobroma cacao</i>).....	
	55
1. RESUMO.....	56
2. INTRODUÇÃO.....	57
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
3.1. Microrganismo e condições de cultivo.....	62
3.2. Clonagem dos genes <i>palACp</i> e <i>pacCCp</i>	62
3.3. Extração e caracterização dos fragmentos de DNA dos fagos recombinantes.....	64
3.4. Sequenciamento e análise das seqüências.....	66
3.5. Extração de RNA total e análise por RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction).....	67
4. RESULTADOS.....	69
4.1. Isolamento e caracterização do gene <i>palACp</i>	69
4.2. Isolamento e caracterização do gene <i>pacCCp</i>	74
5. DISCUSSÃO.....	83
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
7. CONCLUSÕES.....	90

RESUMO

SILVA, Gilvan Ferreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2007. **Clonagem e caracterização dos genes que codificam endo-xilogalacturonana hidrolase, o fator de transcrição PacC e a proteína PalA em *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa em *Theobroma cacao*.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Co-orientadores: Elza Fernandes de Araújo, Flávia Maria Lopes Passos e Júlio Cezar de Mattos Cascardo.

Crinipellis pernicioso é o agente causal da vassoura-de-bruxa no cacau, e em outras espécies do gênero *Theobroma*, causando danos na cultura do cacau e cupuaçu com grande impacto econômico. Neste trabalho, descrevem-se o isolamento e a caracterização dos genes que codificam endo-xilogalacturonana hidrolase (Xgh), PalA e PacC. O gene *xghCp* possui uma região codificadora de 1.251 pares de bases, interrompida por quatro possíveis íntrons. A proteína deduzida apresenta 417 aminoácidos, sendo codificada por um gene cópia única. A transcrição do gene foi analisada por meio da técnica de RT-PCR, sendo avaliados os efeitos do pH e das fontes de carbono glicose e pectina. A transcrição do gene não foi reprimida por glicose 1%. Em presença de pectina os transcritos do gene *xghCp* foram detectados em pHs variando de 4,0 a 8,0. Na análise filogenética da proteína deduzida, XghCp agrupou-se com endo-xilogalacturonana hidrolase de *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus niger* e duas enzimas similares a Xgh de *Aspergillus fumigatus*. O alinhamento múltiplo revelou que XghCp apresenta, na região correspondente ao sítio de ligação ao substrato de poligalacturonase, a seqüência GIK (Gy-Ile-Lys) que foi comum a todas as endo-xilogalacturonanas hidrolase analisadas. Este é o primeiro relato de endo-xilogalacturonana hidrolase em basidiomiceto. Neste trabalho também foi realizada a clonagem e caracterização dos genes *palA* e *pacC*, relacionados à transdução de sinal em resposta ao pH em *C. pernicioso*. A transcrição do gene *palACp* não é regulada por pH e a proteína deduzida apresentou o domínio conservado BRO1. A análise filogenética mostrou que esta proteína é conservada de fungos a humanos. Foram seqüenciados 4.347 pb

correspondentes ao gene *pacCCp*, que apresentou uma ORF de 2.472 pb interrompida por 8 íntrons putativos. Na região promotora, foram localizados três possíveis sítios de reconhecimento para PacCCp (5'GCCAG3'), o que sugere um sistema de auto-indução deste gene em pH alcalino. Os transcritos do gene *pacCCp* foram detectados por RT-PCR em pH 6,8 e 8,0 em 8, 18 e 32 horas após a indução. Em pH 4,0, foi observada a transcrição basal no período de 8 a 32 horas. A seqüência deduzida apresentou 824 aminoácidos, com domínios dedos de zinco extremamente conservados em leveduras e fungos filamentosos. Motivos de reconhecimento proteína-proteína YPXL/I de interação com PalA foram localizados na região C-terminal da proteína PacCCp entre os aminoácidos 637 e 742. A identificação dos genes *pacC* e *palA* sugere que *C. pernicioso*, apresenta a cascata de sinalização em resposta ao pH.

ABSTRACT

SILVA, Gilvan Ferreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January 2007. **Cloning and characterization of the genes encoding endo-xylogalacturonan hydrolase, PacC transcription factor, and PalA protein in *Crinipellis pernicioso*, witches' broom causal agent in *Theobroma cacao*.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-Advisers: Elza Fernandes de Araújo, Flávia Maria Lopes Passos and Júlio César de Mattos Cascardo.

Crinipellis pernicioso is the causal agent of witches' broom disease in cocoa plants as well as in other species of *Theobroma*, with important economic impact in both cocoa and cupuaçu crops. We report the isolation and characterization of the genes encoding endo-xylogalacturonan hydrolase (Xgh), PalA and PacC. The *xghCp* gene contains a 1,251 base pairs coding region interrupted by four putative introns. The deduced protein displays 417 amino acid residues and is coded by a single-copy gene (*xghCp*). Gene transcription has been analyzed by semi-quantitative RT-PCR, and the effects of either pH or the carbon sources glucose and citric pectin have been evaluated. Gene transcription was not repressed by 1% glucose. In the presence of pectin, *xghC* transcripts were detected from pH 4,0 to pH 8,0. Phylogenetic analysis of the deduced protein, XghCp, grouped it with endo-xylogalacturonan hydrolase of both *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*, as well as with two Xgh similar enzymes of *Aspergillus fumigatus*. Multiple alignment revealed that XghCp presents a GIK sequence (Gly-Ile-Lys), common to all endo-xylogalacturonan known hydrolases, in the region corresponding to the polygalacturonase substrate binding site. This is the first report of an endo-xylogalacturonan hydrolase in a basidiomycete. Cloning and characterization of *palA* and *pacC*, both related to signal transduction in response to pH in *C. pernicioso*, were also achieved. *palACp* transcription was not regulated by pH, and the deduced protein showed a conserved BRO1 domain. The phylogenetic analysis showed it to be a widely conserved protein, from fungi to human beings. A total of 4,347 bp corresponding to *pacCCp*, which displayed an ORF

containing 2,472 bp interrupted by 8 putative introns, has been sequenced. Three possible sites of PacC cis-elements (5'GCCAG3') have been localized in the promoter region, suggesting a self-induction system for this gene under alkaline pH. Transcripts of *pacCCp* were detected by RT-PCR at pH 6.8 and pH 8.0 at 8, 18, and 32 hours after induction. At pH 4.0, basal transcription was observed from 8 to 32 hours. The deduced sequence exhibited 824 amino acid residues with zinc fingers domains highly conserved in yeasts and filamentous fungi. YPXL/I protein-protein recognition motifs, which interact with PalA, were localized in the C-terminal region of PacCCp between amino acid residues 637 and 742. *pacC* and *palA* identification suggests that *C. perniciosus* presents a signaling cascade in response to pH, which would allow PacCCp transcription factor to act as a regulator of environmental pH controlled virulence factors.

INTRODUÇÃO

1. *Crinipellis perniciosa*

O fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (Agaricales, Tricholomataceae, Marasmeae) é o agente causal da vassoura-de-bruxa em duas culturas economicamente importantes, o cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex. Spreng). A doença representa, atualmente, um dos principais fatores limitantes à produção. Este fungo tem sido considerado o mais importante fitopatógeno do cacaueteiro, tendo evoluído concomitantemente com *T. cacao*, ambos endêmicos da Bacia Amazônica (Griffith et al., 1994; Nunes et al., 2002).

Análise filogenética utilizando as seqüências de DNA correspondentes as regiões ITS, RPB1, EF1- α , *rDNA* 28S e 18S, sugerem a inclusão de *C. perniciosa* no gênero *Moniliophthora*, passando a ser denominado *Moniliophthora perniciosa* Aime & Phillips-Mora com.nov. (Aime & Phillips-Mora, 2005).

O gênero *Crinipellis* compreende, aproximadamente, 63 espécies que são, em sua grande maioria, saprófitas. A variabilidade de hospedeiros do fungo *C. perniciosa* permite a separação dos isolados em biótipos de acordo com hospedeiro infectado. Representantes do biótipo C infectam as espécies do gênero *Theobroma* e *Herrania*, pertencentes à família *Sterculiaceae* e atualmente classificados dentro da família *Malvaceae*. O gênero *Theobroma* possui 22 espécies, onde as mais importantes são *Theobroma cacao* L e *Theobroma grandiflorum* (Willd ex. Spreng). O biótipo S agrupa os isolados que infectam as espécies da família *Solanaceae* e os isolados do biótipo B causam vassoura-de-bruxa em *Bixa orellana*. Isolados do biótipo L são saprófitas e heterotáticos, cujos basidiocarpos já foram encontrados em lianas e cipós das famílias *Malpighiaceae* e *Bignoniaceae* e em *Arrabidaea verrucosa* (cipó). O biótipo H foi o último a ser descrito e abrange isolados que infectam

representantes da família *Malpighiaceae* (Griffith & Hedger, 1994; Resende et al., 2000; Griffith et al., 2003).

O biótipo-C de *C. pernicioso* possui um ciclo de vida hemibiotrófico, com duas fases distintas de crescimento. O fungo invade os tecidos meristemáticos dos hospedeiros e permanece durante certo período como biotrófico, mas depois passa para a fase necrotrófica e cresce saprofiticamente sobre os tecidos mortos. A infecção inicia-se quando tubos germinativos dos basidiósporos penetram em tecidos meristemáticos da planta, como brotos apicais, flores e frutos. Os basidiósporos de *C. pernicioso* são capazes de infectar o tecido meristemático e penetrar diretamente por meio das hifas primárias no tecido da folha de *T. cacao* (Muse et al., 1996; Kilaru & Hasenstein, 2005).

O controle da doença tem sido feito pela eliminação dos frutos infectados por meio de podas fitossanitárias. No entanto, o controle biológico tem sido usado como uma alternativa ao controle da doença. *Trichoderma ssp* é um micoparasita capaz de competir por espaço e nutrientes. A CEPLAC/CEPEC desenvolveu um biofungicida a base de *Trichoderma stromaticum*, com eficiência de 90% na eliminação de *C. pernicioso* (Bastos, 2000). Rubini et al., (2005) avaliaram o uso potencial de endofíticos do cacauzeiro no controle biológico deste patógeno e verificaram que o fungo *Gliocladium catenulatum* é capaz de reduzir em 70% a incidência da doença em mudas de cacauzeiro.

A obtenção de clones resistentes tem sido a principal estratégia de combate à doença, porém, a variabilidade genética do patógeno pode ser um problema na seleção de plantas resistentes a um grande número de isolados. Rincones et al. (2006) analisaram a variabilidade genética de isolados pertencentes aos biótipos C, S e L, por meio do perfil de microssatélites e da avaliação dos cariótipos obtidos por meio de eletroforese em campo pulsado. Os resultados mostraram maior grau de variabilidade genética e cromossômica em isolados do biótipo C da Amazônia em comparação com os isolados na Bahia.

A possibilidade de produzir plantas geneticamente modificadas tem surgido como uma nova perspectiva ao controle da vassoura-se-bruxa, o que ressalta a importância do conhecimento da fisiologia da doença. Recentemente foi desenvolvido um transgênico de *Theobroma cacao* L. resistente a *Colletotrichum gloesporioides* (Maximova et al., 2006).

Em fevereiro de 2000, surgiu a iniciativa para realização do projeto genoma de *C. pernicioso*, financiado pelo governo da Bahia e pelo CNPq. Foi inicialmente formado um consórcio interinstitucional formado pela Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Centro de Pesquisa do Cacau (CEPLAC) e o Centro Nacional de Recursos Genéticos – EMBRAPA. O projeto genoma tem auxiliado as pesquisas e a identificação de genes com potencial papel na patogenicidade de *C. pernicioso*, abrindo assim novas perspectivas no desenvolvimento de métodos para o controle da doença.

2. Fatores de patogenicidade e virulência

A identificação de fatores de patogenicidade codificados por genes de cópia única que atuem isoladamente no ataque do patógeno, não tem tido resultados promissores. Possivelmente devido à complexidade dos eventos envolvidos no desenvolvimento da doença, tornou-se necessária uma combinação de fatores para cada hospedeiro (Rogers et al., 2000; Prusky & Yakoby, 2003). O número de genes de patogenicidade isolados está diretamente relacionado ao conceito de patogenicidade e às várias definições disponíveis na literatura. Dependendo da amplitude com que se define fator de patogenicidade esse número pode variar muito.

Genes necessários ao desenvolvimento da doença, mas não necessários para completar o ciclo de vida do patógeno *in vitro* é o conceito de genes de patogenicidade adotado por Idnurm & Howlett (2001). Essa definição é baseada no uso de técnicas de inativação gênica para avaliação dos potenciais candidatos a genes de patogenicidade. A inativação desses genes resulta na

perda de sintomas da doença. Portanto, a identificação desses genes é muito importante não somente para o conhecimento do processo da doença, mas também para detecção de alvos para controle da mesma.

Virulência é um caráter quantitativo, ou seja, uma variação positiva ou negativa, inferior ou superior nos sintomas (Casadevall & Pirofski, 1999; Wassenaar & Gaastra, 2001; Idnurm & Howlett, 2001). Wassenaar & Gaastra (2001) propuseram uma definição, baseada na função durante o processo de virulência e, assim, dividiram esses genes em três classes. Na primeira, estão classificados os verdadeiros genes de virulência, que codificam produtos diretamente prejudiciais ao hospedeiro, que não estão presentes em linhagens não patogênicas e são freqüentes alvos para o desenvolvimento da resistência pelo hospedeiro. Os fatores de virulência, codificados por genes da classe I incluem toxinas de baixa e alta massa molecular, enzimas que comprometem a integridade estrutural do tecido hospedeiro, assim como enzimas que degradam a parede celular de plantas. Genes da classe II são requeridos para ativar os verdadeiros fatores de virulência, por meio da regulação da expressão, modificação na tradução, processamento ou secreção das proteínas codificadas pelos genes de virulência da classe I. Genes da classe III codificam fatores necessários ao patógeno para enfrentar efetivamente o ambiente de hostilidade encontrado no hospedeiro, como sensores osmóticos, degradadores ou transportadores de xenobióticos e reguladores de pH, entre outros (Wassenaar & Gaastra, 2001; Prusky & Yakoby, 2003). Genes envolvidos no metabolismo básico celular não são considerados como genes de virulência, a não ser que a sua inativação resulte em atenuação dos sintomas da doença (Idnurm e Howlett, 2001).

Neste trabalho, adotou-se a classificação de Wassenaar & Gaastra (2001) para genes de virulência, assim como a de Idnurm & Howlett (2001) para genes de patogenicidade.

3. Pectinases em fungos fitopatogênicos

No processo de interação planta-patógeno, os fungos fitopatogênicos produzem várias enzimas extracelulares necessárias à penetração. A primeira barreira à penetração é a cutícula, que é degradada pela cutinase, facilitando a penetração. Ultrapassando a cutícula, a parede celular vegetal forma a segunda barreira, cuja constituição é complexa, e apresenta a pectina como um dos seus principais componentes.

A pectina é um heteropolissacarídeo complexo, que apresenta duas regiões bem definidas: a “região lisa” que constitui a cadeia primária e consiste de unidades de (α -1-4) ácido galacturônico, que pode ser acetilado em O-2 ou O-3 e metilado em O-6; as regiões na estrutura-mãe, que tem muitas cadeias laterais denominadas “regiões ramificadas”, onde duas diferentes estruturas podem ser identificadas, a xilogalacturonana e a ramnogalacturonana (de Vries & Visser, 2001). A degradação enzimática da pectina é considerada um importante aspecto na infecção. O processo de degradação envolve uma ação combinada de numerosas enzimas (Quadro 1), que são fortes candidatas a fatores de virulência da classe I (Walton, 1994; Akimitsu et al., 2004).

De acordo com o mecanismo de ação as enzimas pectinolíticas podem ser classificadas em dois grupos, descritos a seguir: (a) hidrolases, que incorporam uma molécula de água, durante a clivagem das ligações glicosídicas entre os ácidos galacturônicos, (b) liases que clivam as ligações glicosídicas via reação de β -eliminação (Jayani et al., 2005). As esterases são hidrolases e incluem as enzimas que atuam sobre os grupos metil e etil presentes na pectina. A pectinametilesterase (PME) hidrolisa as ligações éster dos grupos metil da pectina, produzindo metanol e ácido poligalacturônico, e reduzindo, assim, o grau de esterificação. Sua atividade é considerada muito importante para a completa degradação da pectina por poligalacturonase e pectato liase, uma vez que estas enzimas mostram limitada degradação de substratos metilados (Christgau et al., 1996).

Recentemente foi caracterizada uma nova enzima pectinolítica denominada endo-xilogalacturonana hidrolase em *Aspergillus tubingensis* (van der Vult-Bergmans et al., 2000). A xilogalacturonana hidrolase (Xgh) é capaz de degradar xilogalacturonana (XGA), um polímero cujo esqueleto é constituído de α -D-ácido galacturônico e β -D-xilose. O XGA está presente na parede celular de várias células e em exsudatos (gomos). Embora a xilogalacturonana hidrolase possa agir como uma endo-enzima, Zandleven et al., (2005) mostraram que esta enzima também possui uma ação exolítica e que atua dos finais não-redutores para os finais redutores. Xgh pertence à família glicohidro-28, que agrupa pectinases de bactérias, fungos, plantas e insetos (Markovic, 2001).

Quadro 1 – Classificação das enzimas pectinolíticas produzidas por fungos

Enzimas pectinolíticas	
<hr/>	
Hidrolases	Endopoligalacturonase Exopoligalacturonase Ramnogalacturonase Endo-xilogalacturonana hidrolase
Liases	Endopectato liase Exopectato liase Endopectina liase Exopectina liase
Esterases	Pectinametilesterase Ramnogalacturonana acetilesterase

Fonte: Lebeda et al., 2001

Para Rogers et al. (2000), o papel das enzimas extracelulares, que degradam barreiras físicas, durante a invasão do hospedeiro, tem sido controverso. Os resultados de diferentes tipos de análises evidenciam seu papel na patogênese, incluindo a correlação entre o nível de cada enzima e virulência, evidência imunoquímica da secreção da enzima durante a infecção,

presença de mecanismos de defesa do hospedeiro pela inibição da enzima com inibidores seletivos ou aplicação de anticorpos específicos e aumento na virulência pela transferência de genes. A incapacidade em demonstrar uma drástica redução na virulência, em alguns casos, tem gerado dúvidas sobre a função das enzimas extracelulares que degradam barreiras físicas do hospedeiro. Desse modo, a inativação pode não ser capaz de revelar a contribuição dessas enzimas na patogênese, a menos que os genes que codificam todas as enzimas funcionalmente redundantes possam ser inativados.

Recentemente, a importância das enzimas pectinolíticas na virulência tem sido demonstrada. A inativação de genes, que codificam poligalacturonases e pectato liase em diferentes fungos, tem reduzido a virulência em *Aspergillus flavus* em algodão, *Botrytis cinerea* em tomate, *Alternaria alternata* em citros e *Colletotrichum gloeosporioides* em abacate (Shieh et al., 1997; ten Have et al., 1998; Prusky et al., 2001). Entretanto em *Cochliobolus carbonum*, o mutante para uma endopoligalacturonase não mostrou distinção em relação à linhagem selvagem, indicando que, neste fungo, a poligalacturonase não é requerida como fator de virulência. Possivelmente, isto ocorreu por que existem outras enzimas que degradam pectina, ou a degradação não é crucial para o desenvolvimento da doença (Scott-Craig et al., 1990).

Tem sido relatado que a inativação em um único gene pode não resultar em um efeito detectável na virulência do fungo. Em *Sclerotinia sclerotiorum* e *B. cinerea*, as poligalacturonases formam um conjunto de isoenzimas, o que possivelmente dificulta a determinação do papel de uma única enzima como fator de virulência, pois, a inativação de um gene pode ser compensada pelas demais (Wubben et al., 1999; Kasza et al., 2004). Em *Chondrostereum purpureum*, as poligalacturonases também são codificadas por uma família multigênica, cuja análise filogenética sugere a ocorrência de duplicação gênica durante o processo evolutivo (Williams et al., 2002).

A presença de família multigênica pode proporcionar uma alta capacidade adaptativa e eficiência em ampla gama de hospedeiros. O papel e a

especificidade das isoenzimas podem ser atribuídos a diferenças na seqüência ou na sua rede funcional, permitindo uma reação diferencial com vários substratos pectinolíticos em numerosas espécies (Williams et al., 2002).

A produção extracelular de pectinases é, geralmente, condicionada à repressão catabólica por meio de carboidratos prontamente metabolizáveis e em muitos casos, a expressão gênica das poligalacturonases tem sido condicionada ao pH ambiental (Cotton et al., 2003; Wubben et al., 2000). Alguns genes que codificam poligalacturonases apresentam expressão constitutiva, como os genes *pgaA* e *pgaB* de *A. niger*, e *Bcpg1* e *Bcpg2* de *B. cinerea* (Parenicova et al., 2000, Wubben et al., 2000) ou, são diferencialmente expressos dependendo do estágio de infecção e do hospedeiro (ten Have et al., 2001). Em outros casos, a expressão é regulada por sinais presentes durante a interação planta-patógeno (Yang et al., 2005).

A parede celular da planta é heterogênea e, estruturalmente, dinâmica. A composição da pectina difere entre espécies de plantas, tecidos, tipos de células e em cada diferente região em torno da parede de uma célula individual (Freshour et al., 1996).

Os basidiósporos de *C. pernicioso* são capazes de infectar o tecido meristemático e penetrar diretamente por meio das hifas primárias no tecido da folha de *T. cacao*. A penetração direta no tecido do cacauero e a degradação completa de células do mesófilo ressaltam a importância das enzimas responsáveis pela degradação da parede celular no sucesso da infecção por *C. pernicioso* (Kilaru & Hasenstein, 2005).

4. Proteínas inibidoras de poligalacturonase (PGIPs)

Proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs) são proteínas extracelulares de defesa da planta, que limitam a atividade hidrolítica das poligalacturonases (PGs), favorecendo o acúmulo de oligogalacturonídeos elicitores da resposta de defesa da planta (De Lorenzo et al., 2001; Federici et al., 2006; Di Matteo et al., 2006). Os genes *pgips* codificam proteínas, que

apresentam um peptídeo sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático. O peptídeo maduro apresenta 300 a 315 aminoácidos com vários sítios potenciais de glicosilação, sendo caracterizado pela presença de dez repetições ricas em leucina, e cada uma é originária da modificação de um bloco de 24 aminoácidos apresentando o consenso GxIPxxLxxLxxLxxLxLxxNxLx, também encontrado em várias proteínas de resistência. A interação PG-PGIP limita a atividade das PGs e favorece o acúmulo de oligossacarídeos elicitores no apoplasto. Os oligossacarídeos são, geralmente, elicitores de uma gama de respostas de defesa da planta, incluindo o acúmulo de fitoalexina, síntese de lignina e produção de espécies reativas de oxigênio (De Lorenzo et al., 2001). Estas são típicas respostas de defesa geral, ativadas pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). PAMPs são moléculas do patógeno, tais como lipopolissacarídeos, peptídeoglicanas e flagelina em bactérias, mananas em leveduras, quitina e ergosterol de fungos que atuam como elicitores de resposta de defesa (Nurnberger & Brunner, 2002, Nurnberger et al., 2004). Desse modo, estritamente os oligogalacturonídeos mesmo servindo como elicitores, não são considerados PAMPs, visto que são originados da degradação da parede celular do próprio hospedeiro (Nürnberg et al., 2004).

Em várias espécies de plantas, as PGIPs são proteínas com características bioquímicas quase idênticas e são codificadas por uma família multigênica. Esses genes são diferencialmente regulados e expressos, espacial e temporalmente, durante o desenvolvimento do organismo e em resposta as várias situações de estresse. A análise funcional de promotores tem revelado que alguns genes, que codificam PGIPs, respondem somente à injúria, enquanto outros são induzidos por injúria, ácido salicílico ou oligossacarídeos (De Lorenzo et al., 2001). Tem sido observado, também, que a adição de elicitores como oligossacarídeos funciona como indutores da expressão de genes de defesa (Poinssot et al., 2003).

O aumento na produção de PGIPs, nos diversos estádios de desenvolvimento, favorece a proteção contra o ataque de patógenos, o

contrário ocorre com o declínio, pois, os frutos maduros, nos quais tem sido observada uma menor expressão de PGIPs, são mais suscetíveis ao ataque de patógenos (De Lorenzo et al., 2001; Di et al. 2006).

Poinssot et al. (2003) verificaram que a endopoligalacturonase 1 de *B. cinerea* e o oligogalacturonídeo (OGA) ativam resposta inata em videiras, o que inclui o efluxo de cálcio, a produção de espécies reativas de oxigênio e de fitoalexinas. Todavia, a intensidade e cinética da resposta, provocadas pelo OGA, foram muito diferentes em comparação com os efeitos da poligalacturonase 1 (Pg1). Os autores concluem que a atividade elicitora da Pg1 não é devida somente a liberação de oligogalacturonídeo, mas principalmente ao reconhecimento de motivos específicos da proteína. Boudart et al. (2003), expressando quatro diferentes construções de endopoligalacturonase de *C. lindemuthianum* em plantas de tabaco, constataram que a atividade elicitora da resposta sistêmica da planta é devido a degradação de OGAs da parede celular.

5. Efeito do pH do ambiente em fungos

Os microrganismos possuem a capacidade de adaptar-se ao pH do ambiente. Um dos aspectos desta adaptação, particularmente importante para os organismos que crescem sob ampla variação de pH, é a capacidade de expressão gênica adequada a cada pH (Arst & Peñalva, 2003; Peñalva & Arst, 2004).

O fator de transcrição PacC em fungos filamentosos e seu homólogo em leveduras Rim101, possuem três dedos de zinco (Cys₂His₂) que formam um domínio de ligação ao DNA. Em *Aspergillus nidulans*, a análise funcional desses domínios mostrou que o primeiro deles não se liga ao DNA, e que é a glicina (Gln) 155 da α -hélice no dedo de zinco 3 que está, especialmente, envolvida no contato com o DNA. O primeiro dedo de zinco interage

crucialmente com o dedo de zinco 2, e este participa do contato com o hexanucleotídeo 5'GCCARG3' (Fernandez-Martinez et al., 2003).

A proteína PacC é sintetizada em sua forma inativa, denominada PacC⁷², que sofre processamento pós-traducional por meio de dois passos proteolíticos, ocorrendo a ativação sob condições de pH alcalino. O primeiro passo é dependente de pH com formação do PacC⁵³, uma forma intermediária entre a forma ativa PacC²⁷, que resulta do segundo passo proteolítico. O polipeptídeo com 27kDa contém cerca de 250 resíduos da região N-terminal de PacC, que inclui o domínio dedo de zinco. O pH do ambiente regula a sensibilidade de PacC ao processamento pela protease. A interação do domínio C, localizado entre os resíduos 529 e 678 com dois domínios anteriores, previne o processamento sob condições inapropriadas do pH. Quando o meio torna-se alcalino, ocorre uma cascata de sinalização e a proteína adquire uma conformação aberta, a qual permite a ação da protease PalB (Arst & Peñalva, 2003; Peñalva & Arst, 2004).

Dentre 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 (Espeso & Peñalva 1996; Peñalva & Arst, 2002; 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 & Arst, 2004). O fungo *A.*

nidulans tem sido usado, como organismo modelo, para o estudo desta 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 & 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; Denison, 1995; Xu & Mitchell, 2001; Vincent et al., 2003; Arst & Peñalva 2003; Herranz et al., 2005; Tilburn et al., 2005).

O fato da transdução de sinal ocorrer, apenas, em pH alcalino é bastante intrigante, pois nenhum dos seis genes *pal* tem mostrado evidência de regulação por pH. Desse modo, a resposta ao pH deve ocorrer após a transcrição (Díez et al., 2002; Espeso & Arst, 2000; Rollins, 2003; Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005).

No mutante constitutivo *pacC* Leu340Ser, a interação intramolecular que impede o processamento é interrompida, fazendo com que ocorra processamento independente do pH (Diez et al., 2002). Mutantes nulos, em qualquer um dos seis genes *pal* e em *pacC*, produzem fenótipos que mimetizam condições de crescimento em pH ácido, ou seja ocorre marcadamente ativação dos genes expressos em pH ácido e baixa ou expressão não detectável de genes regulados por pH alcalino (Caddick et al., 1986; Denison, 2000; Negrete-Urtasun et al., 1997; Peñalva & Arst, 2004).

Mutantes *pacC^c*, que mimetizam condições de pH alcalino, foram obtidos pela remoção entre 100 a 214 resíduos da porção C-terminal, incluindo a região altamente ácida, rica em repetições de glutamina. Os mutantes que mimetizam

crescimento em condições de acidez são obtidos por meio da remoção de resíduos entre 299 e 505 na região C-terminal. A remoção completa do gene é, também, caracterizada pelo fenótipo semelhante ao crescimento em pH ácido, mas leva ao baixo crescimento (Tilburn et al., 1995). Mutante *pacC*⁻ inclui mutantes com troca de fase de leitura na seqüência do gene *pacC* ou pontos de terminação, que geram proteínas truncadas na posição anterior ou dentro dos motivos dedo de zinco. Mutantes *pacC*^{+/-} são, fenotipicamente, indistinguíveis dos mutantes *pal*, e, como a proteína não é processada em pH ácido e neutro, a mutação leva a interferências na sinalização por pH, como aquelas que afetam a ligação de PalA ou PalB em PacC (Espeso et al., 1997; Vincent et al., 2003).

O mecanismo que conduz a repressão dos genes, que se expressam em ambiente ácido, ficou mais claro com os trabalhos de Espeso e Arst (2000). PacC²⁷ é um ativador de genes expressos em pH alcalinos pelo reconhecimento de *cis* elementos na região promotora desses genes. Entretanto, a repressão de genes que são normalmente expressos em pH ácido, ocorre por inibição competitiva, onde PacC previne a ligação do fator de ativação IntA pela sobreposição no sítio promotor.

6. Importância do pH na patogênese em fungos

Alguns patógenos 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. Prusky et al., (2001) sugerem que muitos patógenos aumentam sua virulência pela modulação do pH do hospedeiro. Este mecanismo asseguraria que genes, que codificam enzimas que degradam a parede celular, sejam expressos e seus produtos secretados em condições ótimas de pH para o seu funcionamento.

Muitos fungos modificam ativamente o pH do ambiente pela excreção de ácidos orgânicos, como os ácidos oxálico, cítrico e glucorônico que, efetivamente, acidificam o meio (Alkimitsu et al., 2004; Prusky & Yakoby, 2003;

Prusky et al., 2004). Enquanto outros alcalinizam o tecido do hospedeiro pela excreção de amônia. Os resultados das pesquisas de Prusky et al. (2001) sugerem que a excreção de amônia é um importante fator de virulência (Kramer-Haimovich et al., 2006).

A virulência é atribuída há dois fatores importantes, a saber: o sucesso adaptativo do patógeno às condições físicas e fisiológicas encontradas no hospedeiro; e a resistência ou tolerância às defesas impetradas pelo organismo parasitado (Wassenaar & Gaatra, 2001; Prusky & Yakob, 2003).

O pH ambiental é, comumente, dinâmico durante a interação planta-patógeno. Várias espécies de *Colletotrichum* secretam amônia em quantidades significantes, capazes de elevar o pH e aumentar a virulência (Prusky et al. 2001; Drori et al. 2003; Kramer-Haimovich et al., 2006).

A resistência dos frutos de abacate ao *C. gloeosporioides* parece estar ligada ao pH. Estudos realizados por Yakoby et al., (2000) evidenciaram que *C. gloeosporioides*, crescendo em meio indutor, foi capaz de aumentar o pH de 3,8 para 6,5. A secreção de pectato liase foi detectada, apenas, em pH acima de 5,8, enquanto a transcrição do gene *pel* foi inicialmente detectado em pH 5,0 e aumentou até pH 5,7. No que diz respeito à poligalacturonase (PG), a transcrição e a secreção foram detectadas em pH 5,0 e continuaram até pH 5,7. Esses resultados sugerem que o hospedeiro pode regular a secreção de PL e afetar a virulência, visto que cultivares resistentes produzem frutos com pH menor que 5,5, inclusive durante a maturação.

Em *Aternaria alternata*, a expressão do gene que codifica endo-1,4- β -glucanase é aumentada, quando o pH exógeno eleva-se (Eshel et al., 2002). Em *B. cinerea* e outros fitopatógenos produtores de ácido oxálico, a diminuição do pH está correlacionada ao aumento na transcrição de genes, que codificam endopoligalacturonases (Wubben et al., 2000). *Metarhizium anisopliae* regula a transcrição de genes que codificam enzimas proteolíticas e quitinolíticas em resposta ao pH ambiental. Além disso, foi verificado que ele é capaz de alcalinizar o meio pela produção de amônia, que teria função relacionada à

regulação do micro-ambiente, sendo, portanto, considerado como fator de virulência (St. Leger et al., 1998; St. Leger et al., 1999).

Em resposta ao pH, *Yarrowia lipolytica* secreta protease alcalina ou ácida (Gonzalez-Lopez et al., 2002). O pH também afetou a secreção de enzimas como lipases, celulases, amilases, pectinases e proteases, em isolados fitopatogênicos e endofíticos de *Colletotrichum* (Jr. Maccheroni et al., 2004).

A virulência de patógenos humanos como *Candida albicans* e bactérias patogênicas de animais como *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* é dependente do pH ambiental (Davis et al., 2000a; Olson, 1993; Blankenhorn et al. 1999). Do mesmo modo, fungos fitopatogênicos vêm sendo estudados no que diz respeito ao pH ambiental e seu processo funcional ligado à virulência (Manteau et al. 2003; Rollins & Dickman, 2001).

As primeiras evidências que o mecanismo de regulação dependente de pH semelhante ao descrito para *A. nidulans* também ocorria no fitopatógeno *B. cinerea*, foram apresentadas por Manteau et al., (2003). Esses autores avaliaram se o pH do tecido hospedeiro era capaz de regular a produção de fatores de patogenicidade, e com esta finalidade, estudaram dois isolados de *B. cinerea* originários de diferentes espécies de plantas. A análise da secreção dos elementos putativos de virulência foi realizada, em meio sintético tamponado em pH de 2,0 a 7,0.

Múltiplos processos são afetados pelo pH ambiental em *S. sclerotiorum*. A exposição a ambiente de pH alcalino aumentou o acúmulo de ácido oxálico, dependendo da fonte de carbono presente no meio. O desenvolvimento do esclerócio foi favorecido em pH ácido e inibido em pH neutro. Rollins e Dickman (2001) clonaram o gene *pac1*, que codifica o fator de transcrição putativo semelhante a PacC. Este fator de transcrição apresenta 3 dedos de zinco, similares em seqüência e organização aos dedos de zinco da proteína PacC de *A. nidulans*. O promotor do gene possui oito sítios consensos de ligação a Pac1, o que sugere sua auto-regulação.

Desde 1965, está estabelecido a atividade sinérgica entre a produção de ácido oxálico e poligalacturonase (Bateman & Beer, 1965, citado por Rollins,

2003), os quais são considerados essenciais à virulência de *S. sclerotiorum* e de outros patógenos produtores de ácido oxálico. Tanto a produção de ácido oxálico quanto à regulação de endopoligalacturonase são reguladas pelo pH ambiental (Rollins et al., 2001; Rollins, 2003). O ácido oxálico favorece a atividade das PGs, pela acidificação do tecido infectado e tem sido sugerido que o oxalato estabiliza o sítio ativo da enzima, aumentando a afinidade pelo substrato (Favaron et al., 2004). Há evidências de que a enzima que degrada o ácido oxálico em plantas, confere aumento da resistência contra fungos fitopatogênicos, de modo que o gene que codifica essa enzima tem sido introduzido em várias plantas transgênicas (Kesarwani et al., 2000; Lane, 2002; Lu, 2003).

No intuito de estudar, funcionalmente, o gene *pac1* de *S. sclerotiorum*, Rollins (2003) obteve, por troca gênica, mutante com perda da função. O mutante *pac1* possui crescimento micelial normal em pH ácido, entretanto, o crescimento foi inibido com o aumento do pH. A produção de ácido oxálico permaneceu responsiva ao pH alcalino, mas o acúmulo foi reduzido em 75%. No que diz respeito às endopoligalacturonases, o produto da transcrição de *pg1* foi modificado em pH ambiental maior, o que demonstra uma clara desrepressão gênica e conseqüente acumulação do transcrito de *pg1* em um pH mais elevado. No entanto, o mutante *pac1* teve reduzida atividade da endopoligalacturonase, visto que o pH não foi ideal para a atividade desta proteína. A regulação de outras enzimas, que degradam a parede celular, pode igualmente ser alterada neste mutante. Consequentemente, a virulência foi drasticamente reduzida, o que faz acreditar que o gene *pac1* é necessário a uma apropriada regulação dos processos fisiológicos importantes para a patogênese (Rollins, 2003).

No fitopatógeno *U. maydis*, foi identificado e isolado o fator de transcrição PacC codificado por uma ORF de 2.484 pb, gerando uma proteína de 827 aminoácidos com alta similaridade a PacC de *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger*. Testes de complementação evidenciaram a capacidade de restaurar a atividade de protease em mutante Rim101 de *Yarrowia lipolytica*,

confirmando a função homóloga. A mutação não afetou a transição dimórfica induzida *in vitro* pelo pH, nem a taxa de crescimento, a resistência ao sorbitol hipertônico ou ao estresse causado pelo KCl e a patogenicidade. No entanto, semelhantemente ao ocorrido como os mutantes *pacC* de outros fungos, o mutante de *U. maydis* mostrou um fenótipo pleiotrópico com alteração na morfogênese, redução na produção de protease e aumento na sensibilidade a Na^+ e Li^+ . Outras características fenotípicas não reportadas previamente, em mutantes *pacC*, como mudanças morfológicas, aumento na sensibilidade a enzimas líticas e aumento na secreção de polissacarídeos, foram também reportadas nesse mutante (Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005).

A análise da virulência em resposta ao pH de *Aspergillus*, responsável por doenças pulmonares, foi estudada por Bignell et al., (2005). Em mutantes para o fator de transcrição PacC a rota de transdução de sinal foi bloqueada ou ocorreu ausência do processamento proteolítico, atenuando, severamente, a virulência. As infecções causadas por esse mutante foram caracterizadas pelo crescimento limitado *in vivo* e redução na infiltração celular inflamatória, em contraste com a ativação constitutiva do fator PacC, que causou aumento da mortalidade devido ao crescimento invasivo. Os autores concluíram que o PacC é requerido para aumentar a virulência de *Aspergillus*. Esse foi o primeiro estudo, onde se demonstrou que a expressão gênica regulada por pH e intermediada pelo fator de transcrição PacC são essenciais à aspergilose pulmonar. Além disso, foi estabelecido que ambos, o processamento de PacC e a sinalização mediada por pH, são requeridos para promover processos integrados a patogenicidade e que a ativação constitutiva de *pacC* aumenta a virulência (Bignell et al., 2005).

O pH é um sinal de relevância fisiológica, demonstrada em candidíase vaginal onde a virulência do mutante de *Candida albicans* que perdeu a resposta regulatória ao pH é atenuada. Mutantes para o homólogo de *pacC* (*Rim101*) apresentaram significativa redução na virulência (De Bernardis et al., 1998; Davis et al., 2000b).

Em *F. oxysporum*, a expressão do gene *pacC* foi elevada em condições de crescimento em pH alcalino, mas foi quase imperceptível em condições ácidas. A obtenção de mutantes com “fenótipo ácido”, ou seja, que expressam genes que são normalmente transcritos em pH ácido, provocou reduzido crescimento em pH alcalino, aumento na atividade de protease ácida e alto nível de transcrição de genes de poligalacturonases. Os merodiplóides PacC^c apresentaram: alto nível de transcrição do gene *pac*, mesmo em pH ácido; reduzida produção de fosfatase ácida; e aumento na atividade de proteases alcalinas, conforme o esperado. O mutante PacC^{+/-} apresentou aumento na virulência, em relação ao selvagem, enquanto que o mutante constitutivo apresentou significativa redução na virulência. Desse modo, os autores propuseram que PacC atuaria como um regulador negativo de virulência, possivelmente pela repressão da transcrição de genes expressos em pH ácido e importantes na infecção (Caracuel et al., 2003).

A relação virulência versus PacC dependente da espécie de fungo analisada, pois os mutantes em *C. albicans* não são patogênicos, em *U. maydis* não há diferenças entre mutantes e selvagem no que diz respeito a patogenicidade, em *F. oxysporum* os mutantes são mais virulentos que o selvagem e em *S. sclerotiorum* e *Aspergillus*, os mutantes mostram virulência reduzida (De Bernardis et al., 1998; Davis et al., 2000a; Caracuel et al., 2003; Rollins, 2003; Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005; Bignell et al., 2005)

REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aime, M.C. and Phillips-Mora, W.: The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97 (2005) 1012-22.
- Akimitsu, K., Isshiki, A., Ohtani, K., Yamamoto, H., Eshel, D., Prusky, D.: Sugars and pH : A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants: *Physiol Mol Plant Pathol.* 65. 6. (2004) 271-75.
- Arechiga-Carvajal, E.T. and Ruiz-Herrera, J.: The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryot Cell* 4 (2005) 999-1008.
- Arst, H.N. and Penalva, M.A.: pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet* 19 (2003) 224-31.
- Bastos, C.N.: Retrospectiva e avanços no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero. *Fitopatol Bras* 25 (2000) 3005-06.
- Bateman, D.F. and Beer, S.V.: Simultaneous Production and Synergistic Action of Oxalic Acid and Polygalacturonase During Pathogenesis by *Sclerotium Rolfsii*. *Phytopathology* 55 (1965) 204-11.
- Bignell, E., Negrete-Urtasun, S., Calcagno, A.M., Haynes, K., Arst, H.N., Jr. and Rogers, T.: The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Mol Microbiol* 55 (2005) 1072-84.
- Blankenhorn, D., Phillips, J. and Slonczewski, J.L.: Acid- and base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J Bacteriol* 181 (1999) 2209-16.
- Boudart, G., Charpentier, M., Lafitte, C., Martinez, Y., Jauneau, A., Gaulin, E., Esquerre-Tugaye, M.T. and Dumas, B.: Elicitor activity of a fungal endopolygalacturonase in tobacco requires a functional catalytic site and cell wall localization. *Plant Physiol* 131 (2003) 93-101.
- Caddick, M.X., Brownlee, A.G. and Arst, H.N., Jr.: Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 203 (1986) 346-53.
- Caracuel, Z., Roncero, M.I., Espeso, E.A., Gonzalez-Verdejo, C.I., Garcia-Maceira, F.I. and Di Pietro, A.: The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* 48 (2003) 765-79.

- Casadevall, A. and Pirofski, L.A.: Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect Immun* 67 (1999) 3703-13.
- Christgau, S., Kofod, L.V., Halkier, T., Andersen, L.N., Hockauf, M., Dorreich, K., Dalboge, H. and Kauppinen, S.: Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme. *Biochem J* 319 (Pt 3) (1996) 705-12.
- Cotton, P., Kasza, Z., Bruel, C., Rasclé, C. and Fevre, M.: Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol Lett* 227 (2003) 163-9.
- Davis, D., Edwards, J.E., Jr., Mitchell, A.P. and Ibrahim, A.S.: *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun* 68 (2000a) 5953-9.
- Davis, D., Wilson, R.B. and Mitchell, A.P.: RIM101-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* 20 (2000b) 971-8.
- De Bernardis, F., Muhlschlegel, F.A., Cassone, A. and Fonzi, W.A.: The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 66 (1998) 3317-25.
- De Lorenzo, G., D'Ovidio, R. and Cervone, F.: The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 39 (2001) 313-35.
- de Vries, R.P. and Visser, J.: *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* 65 (2001) 497-522.
- Denison, S.H.: pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet Biol* 29 (2000) 61-71.
- Denison, S.H., Orejas, M. and Arst, H.N., Jr.: Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J Biol Chem* 270 (1995) 28519-22.
- Di, C., Zhang, M., Xu, S., Cheng, T. and An, L.: Role of poly-galacturonase inhibiting protein in plant defense. *Crit Rev Microbiol* 32 (2006) 91-100.
- Di Matteo, A., Bonivento, D., Tsernoglou, D., Federici, L. and Cervone, F.: Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in plant defence: a structural view. *Phytochemistry* 67 (2006) 528-33.

- Diez, E., Alvaro, J., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suarez, T., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr. and Penalva, M.A.: Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *Embo J* 21 (2002) 1350-9.
- Drori, N., Kramer-Haimovich, H., Rollins, J., Dinoor, A., Okon, Y., Pines, O. and Prusky, D.: External pH and nitrogen source affect secretion of pectate lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Appl Environ Microbiol* 69 (2003) 3258-62.
- Eshel, D., Miyara, I., Ailing, T., Dinoor, A. and Prusky, D.: pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. *Mol Plant Microbe Interact* 15 (2002) 774-9.
- Espeso, E.A. and Arst, H.N., Jr.: On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 3355-63.
- Espeso, E.A. and Penalva, M.A.: Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J Biol Chem* 271 (1996) 28825-30.
- Espeso, E.A., Tilburn, J., Sanchez-Pulido, L., Brown, C.V., Valencia, A., Arst, H.N., Jr. and Penalva, M.A.: Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol* 274 (1997) 466-80.
- Favaron, F., Sella, L. and D'Ovidio, R.: Relationships among endopolygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 17 (2004) 1402-9.
- Federici, L., Di Matteo, A., Fernandez-Recio, J., Tsernoglou, D. and Cervone, F.: Polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity? *Trends Plant Sci* 11 (2006) 65-70
- Fernandez-Martinez, J., Brown, C.V., Diez, E., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr., Penalva, M.A. and Espeso, E.A.: Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J Mol Biol* 334 (2003) 667-84.
- Freshour, G., Clay, R.P., Fuller, M.S., Albersheim, P., Darvill, A.G. and Hahn, M.G.: Developmental and Tissue-Specific Structural Alterations of the Cell-Wall Polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* Roots. *Plant Physiol* 110 (1996) 1413-1429.

- Gonzalez-Lopez, C.I., Szabo, R., Blanchin-Roland, S. and Gaillardin, C.: Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Genetics* 160 (2002) 417-27.
- Griffith, G.W. And Hedger, J.N.: The breeding biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. *Heredity* 72 (1994) 278-289.
- Griffith, G.W., Nicholson, J., Nenner, A., Birch, R.N., Hedger: J.N.: Witches' broom and frosty pods in cacao. *New Zealand J of Bot* 41 (2003) 423-435.
- Herranz, S., Rodriguez, J.M., Bussink, H.J., Sanchez-Ferrero, J.C., Arst, H.N., Jr., Penalva, M.A. and Vincent, O.: Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 12141-6.
- Idnurm, A., Howlett, J.: Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi, *Molecular Plant Pathology*, 2. 4 (2001) 241-55.
- Jayani, R. S., Saxena S.,Gupta R.: Microbial pectinolytic enzymes : A review. *Process Biochem* 40 9 (2005) 2931-44.
- Jr Maccheroni, W., Araújo, W.L., Azevedo, J.L.: Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. *Sci Agric*. 61. 3 (2004) 298-302.
- Kasza, Z., Vagvolgyi, C., Fevre, M. and Cotton, P.: Molecular characterization and in planta detection of *Sclerotinia sclerotiorum* endopolygalacturonase genes. *Curr Microbiol* 48 (2004) 208-13.
- Kesarwani, M., Azam, M., Natarajan, K., Mehta, A. and Datta, A.: Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. Molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. *J Biol Chem* 275 (2000) 7230-8.
- Kilaru, A., Hasenstein, K. H.: Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis Pernicioso* on interaction with Cacao leaves, *Biochemistry And Cell Biology*, 95, 1 (2005) 101-1017.
- Kramer-Haimovich, H., Servi, E., Katan, T., Rollins, J., Okon, Y. and Prusky, D.: Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on pelB activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. *Appl Environ Microbiol* 72 (2006) 1034-9.
- Lane, B.G.: Oxalate, germins, and higher-plant pathogens. *IUBMB Life* 53 (2002) 67-75.

- Lebeda, A., Luhova, L., Sedlarova, M., and Jancova, D.: The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108 (2001) 89-111.
- Lu, G., Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* resistance um oilseed crops, *African J Biotechnol*, 2. 12 (2003) 509-16.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., Legendre, L.: Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol Ecol* 43 (2003) 359-66.
- Markovic, O. and Janecek, S.: Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. *Protein Eng* 14 (2001) 615-31.
- Maximova, S.N., Marelli, J.P., Young, A., Pishak, S., Verica, J.A. and Gultinan, M.J.: Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Planta* 224 (2006) 740-9.
- Muse, R.B., Collin, H.A., Isaac, S., Hardwick, K.: Effects of the fungus *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches'broom disease, on cell and tissue cultues of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Plant Pathol* 45 (1996) 145 -54.
- Negrete-Urtasun, S., Denison, S.H. and Arst, H.N., Jr.: Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J Bacteriol* 179 (1997) 1832-5.
- Nozawa, S.R., Ferreira-Nozawa, M.S., Martinez-Rossi, N.M. and Rossi, A.: The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene *pacC*-dependent pathway. *Fungal Genet Biol* 39 (2003) 286-95.
- Nunes, A. M. L., Bergamin Filho, A., Amorim, L., Nunes, M. A. L., Dias, C. T. S.: Análise da curva de progresso temporal da vassoura-de-bruxa do cupuaçuzeiro. *Fitopatol Bras* 27 (2002) 344-48.
- Nurnberger, T. and Brunner, F.: Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* 5 (2002) 318-24.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L.: Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198 (2004) 249-66.

- Olson, E.R.: Influence of pH on bacterial gene expression. *Mol Microbiol* 8 (1993) 5-14.
- Parenicova, L., Benen, J.A., Kester, H.C. and Visser, J.: *pgaA* and *pgaB* encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *Biochem J* 345 Pt 3 (2000) 637-44.
- Penalva, M.A. and Arst, H.N., Jr.: Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66 (2002) 426-46.
- Penalva, M.A. and Arst, H.N., Jr.: Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* 58 (2004) 425-51.
- Poinssot, B., Vandelle, E., Bentejac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thevenot, P. and Pugin, A.: The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol Plant Microbe Interact* 16 (2003) 553-64.
- Prusky, D., McEvoy, J.L., Leverentz, B. and Conway, W.S.: Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 14 (2001) 1105-13.
- Prusky, D., Mcevoy, J. L., Saftener, R., Conway, W. S., And Jones, R.: Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium spp.* on apple and citrus fruit. *Bioch Cell Biol.* 94. 1 (2004) 44-51.
- Prusky, D., And Yakoby, N.: Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Mol Plant Pathol* 4. 6. (2003) 509-516.
- Resende M.L.V., Nojosa, G.B.A., Silva L.H.C.P., Niella G.R., Carvalho G. A. Santiago, D. V.R., Bezerra J.L.: *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patogenênico ao cacauero. *Fitopatol. Bras.* 25 (2000) 88-91.
- Rincones, J., Mazotti, G.D., Griffith, G.W., Pomela, A., Figueira, A., Leal, G.A., Jr., Queiroz, M.V., Pereira, J.F., Azevedo, R.A., Pereira, G.A. and Meinhardt, L.W.: Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. *Mycol Res* 110 (2006) 821-32.
- Rogers, L.M., Kim, Y.K., Guo, W., Gonzalez-Candelas, L., Li, D. and Kolattukudy, P.E.: Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97. 17 (2000), . 9813-8.

- Rollins, J.A.: The *Sclerotinia sclerotiorum* *pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 16 (2003) 785-95.
- Rollins, J.A. and Dickman, M.B.: pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a *pacC/RIM1* homolog. *Appl Environ Microbiol* 67 (2001) 75-81.
- Rubini, M.R., Silva-Ribeiro, R.T., Pomella, A.W., Maki, C.S., Araujo, W.L., Dos Santos, D.R. and Azevedo, J.L.: Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int J Biol Sci* 1 (2005) 24-33.
- Scott-Craig, J.S., Panaccione, D.G., Cervone, F. and Walton, J.D.: Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. *Plant Cell* 2 (1990) 1191-200.
- Shieh, M.T., Brown, R.L., Whitehead, M.P., Cary, J.W., Cotty, P.J., Cleveland, T.E. and Dean, R.A.: Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls. *Appl Environ Microbiol* 63 (1997) 3548-52.
- St Leger, R.J., Joshi, L. and Roberts, D.: Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl Environ Microbiol* 64 (1998) 709-13.
- St Leger, R.J., Nelson, J.O. and Screen, S.E.: The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology* 145 (Pt 10) (1999) 2691-9.
- ten Have, A., Breuil, W.O., Wubben, J.P., Visser, J. and van Kan, J.A.: *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet Biol* 33 (2001) 97-105.
- ten Have, A., Mulder, W., Visser, J. and van Kan, J.A.: The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* 11 (1998) 1009-16.
- Tilburn, J., Sanchez-Ferrero, J.C., Reoyo, E., Arst, H.N., Jr. and Penalva, M.A.: Mutational analysis of the pH signal transduction component *PaIC* of *Aspergillus nidulans* supports distant similarity to BRO1 domain family members. *Genetics* 171 (2005) 393-401.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M.A. and Arst, H.N., Jr.: The *Aspergillus* *PacC* zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *Embo J* 14 (1995) 779-90.

- van der Vlugt-Bergmans, C.J., Meeuwsen, P.J., Voragen, A.G. and van Ooyen, A.J.: Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme. *Appl Environ Microbiol* 66 (2000) 36-41.
- Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr. and Penalva, M.A.: YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 1647-55.
- Walton, J.D.: Deconstructing the Cell Wall. *Plant Physiol* 104 (1994) 1113-8.
- Wassenaar, T.M. and Gaastra, W.: Bacterial virulence: can we draw the line? *FEMS Microbiol Lett* 201 (2001) 1-7.
- Williams, H.L., Tang, Y. and Hintz, W.E.: Endopolygalacturonase is encoded by a multigene family in the basidiomycete *Chondrostereum purpureum*. *Fungal Genet Biol* 36 (2002) 71-83.
- Wubben, J.P., Mulder, W., ten Have, A., van Kan, J.A. and Visser, J.: Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* 65 (1999) 1596-602.
- Wubben, J.P., ten Have, A., van Kan, J.A. and Visser, J.: Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Curr Genet* 37 (2000) 152-7.
- Xu, W. and Mitchell, A.P.: Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J Bacteriol* 183 (2001) 6917-23.
- Yakoby, N., Kobilier, I., Dinooor, A. and Prusky, D.: pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. *Appl Environ Microbiol* 66 (2000) 1026-30.
- Yang, Z., Rogers, L.M., Song, Y., Guo, W. and Kolattukudy, P.E.: Homoserine and asparagine are host signals that trigger in planta expression of a pathogenesis gene in *Nectria haematococca*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 4197-202.
- Zandleven, J., Beldman, G., Bosveld, M., Benen, J. and Voragen, A.: Mode of action of xylogalacturonan hydrolase towards xylogalacturonan and xylogalacturonan oligosaccharides. *Biochem J* 387 (2005) 719-25.

CAPÍTULO I

**Isolamento e caracterização do gene que codifica
endo-xilogalaturonana hidrolase de *Crinipellis perniciosa*, agente causal
da vassoura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao*)**

1. RESUMO

O gene que codifica a enzima endo-xilogalacturonana hidrolase de *Crinipellis pernicioso* (*xghCp*), foi clonado e caracterizado. A região codificadora corresponde a um fragmento de DNA de 1.251 pb e está interrompida por quatro possíveis íntrons. A proteína deduzida que apresenta 417 aminoácidos, denominada XghCp, é codificada por um gene cópia única. A análise do transcrito foi realizada pela técnica de RT-PCR, sendo avaliados os efeitos do pH e das fontes de carbono glicose e pectina. A transcrição do gene não foi reprimida por glicose 1% de 8 até 32 horas. Em presença de pectina cítrica os transcritos do gene *xghCp* foram detectados em pH variando de 4,0 a 8,0. Na análise filogenética da proteína deduzida, XghCp agrupou-se com endo-xilogalacturonana hidrolase de *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus niger* e duas enzimas similares a Xgh de *Aspergillus fumigatus*. O alinhamento múltiplo revelou que XghCp apresenta, na região correspondente ao sítio de ligação ao substrato, a seqüência GIK (Gly-Ile-Lys) que foi comum a todas as endo-xilogalacturonanas hidrolase analisadas. Este é o primeiro relato da presença de um gene, que codifica endo-xilogalacturonana hidrolase em um basidiomiceto.

2. INTRODUÇÃO

A vassoura-de-bruxa do cacau (*Theobroma cacao* L.) tem como agente causal o basidiomiceto *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, um patógeno hemibiotrófico, que infecta várias espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania*, ambos membros da família Sterculiaceae. Esta doença constitui um grande problema fitossanitário com conseqüentes danos socioeconômicos, nas regiões de cultivo do cacau (Griffith et al., 2003).

Os basidiósporos de *C. perniciosa* são capazes de infectar o tecido meristemático e penetrar, diretamente, por meio das hifas primárias, no tecido da folha de *T. cacao* (Kilaru & Hasenstein, 2005). A penetração direta no tecido do cacau e a degradação completa de células do mesófilo (Kilaru & Hasenstein, 2005) tornam evidente a importância das enzimas responsáveis pela degradação da parede celular, no sucesso da infecção por *C. perniciosa*. Em fungos fitopatogênicos uma das enzimas necessárias à penetração é a cutinase, que é uma lipase capaz de degradar a cutícula a fim de facilitar a penetração no hospedeiro (Varley et al., 1992; Li et al., 2003). A segunda barreira no processo de penetração do patógeno é a parede celular vegetal, que apresenta uma constituição complexa, tendo como principal componente a pectina.

A pectina constitui, aproximadamente, 45% da casca do fruto de *T. cacao*, mas além dessa fração, o exocarpo apresenta 34% de celulose e polímeros hemicelulósicos, contendo galactoglucomanana (7- 10%), xiloglucana fucosilada (5-7%) e xilogalacturonana (4%). Nas sementes, entretanto, a pectina constitui até 60% da parede celular (Redgwell & Hansen, 2000; Redgwell et al., 2003).

A degradação enzimática da parede celular vegetal é considerada como um importante aspecto na infecção. O processo de degradação envolve uma ação combinada de numerosas enzimas, como a pectina metilesterase, pectina e pectato liases, endo- ou exo-poligalacturonases e endo-xilogalacturonana hidrolase. Em fitopatógenos, as enzimas que degradam da parede celular são

consideradas fortes candidatas a fatores de virulência (Walton, 1994; Akimitsu et al., 2003).

A xilogalacturonana hidrolase (Xgh) é uma pectinase capaz de degradar xilogalacturonana (XGA), um polímero cujo esqueleto é constituído de α -D-ácido galacturônico e β -D-xilose. O XGA está presente na parede celular de várias células e em exsudatos (gomas). Embora a xilogalacturonana hidrolase possa agir como uma endo-enzima, Zandleven et al., (2005) mostraram que esta enzima também possui uma ação exolítica e que atua dos finais não-redutores para os finais redutores. Xgh pertence à família glicohidro-28, que agrupa pectinases de bactérias, fungos, plantas e insetos (Markovic, 2001). Até o momento, somente para o gênero *Aspergillus* havia sido descritas enzimas capazes de degradar o substrato XGA (Kester et al., 1999; Sakamoto et al., 2002; Martens-Uzunova et al., 2006).

Em patógenos, a inativação dos genes que codificam enzimas hidrolíticas, que degradam a parede celular de plantas, tem revelado que essas enzimas podem ser componentes essenciais da virulência (Vorwerk et al., 2004). Além disso, na degradação da parede pode ocorrer a liberação de oligossacarídeos, que são potenciais elicitores da resposta de defesa da planta (Federici et al., 2006).

Considerando-se a importância que as enzimas pectinolíticas podem ter como fatores de virulência, o objetivo deste trabalho foi o isolamento e caracterização do gene *xghCp*, que codifica a putativa endo-xilogalacturonana hidrolase de *C. perniciosa*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo e condições de cultivo

Foi utilizado o isolado de *C. pernicioso*, identificado como CP02 pertencente ao biótipo C, isolado em Itabuna/BA. O isolado foi cultivado em meio BDA (batata dextrose ágar) a 27°C, durante 8 dias.

3.2. Isolamento do gene que codifica a endo-xilogalacturonana hidrolase de *C. pernicioso*

Com o objetivo de localizar genes que codificam pectinases, foi realizada uma busca no banco de seqüências do projeto genoma da vassoura-de-bruxa (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura). Para a realização deste trabalho, entre as seqüências encontradas, foi escolhida uma seqüência de 1.788 pb, que apresentava 47% de identidade e 60% de similaridade com o gene que codifica a proteína endo-xilogalacturonana hidrolase de *Aspergillus tubingensis*. Baseando-se nessa seqüência e utilizando o programa *Primer3* (Rozen & Skaletsky, 2000) foram desenhados dois oligonucleotídeos iniciadores capazes de amplificar um fragmento de 894 pb. Os oligonucleotídeos foram nomeados: ENDOX1 e ENDOX2 (Tabela 1).

O DNA total do isolado CP02 foi extraído conforme descrito por Specht et al., (1982). Um fragmento de 894 pb foi amplificado do DNA total por PCR, utilizando-se o termociclador PTC-100 (MJ Research). A reação de amplificação foi preparada em uma mistura de reação de 25 µL, com Taq DNA polimerase-pht (Phoneutria), contendo 1x tampão IB (500mM de KCl, 100mM de Tris-HCl pH 8,4, 1% de Triton X-100) sendo seguida as recomendações do fabricante. Reações sem DNA foram utilizadas na avaliação da amplificação inespecífica.

O programa utilizado para a amplificação, teve um total de 39 ciclos, com desnaturação de 30 segundos a 94°C; anelamento durante 30 segundos a 55°C; e extensão de 1 minuto a 72 °C. Após a reação de PCR, 5 µL da mistura foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0%. O produto de amplificação foi clonado no vetor pGEM T-Easy (Promega), conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

Utilizando como sonda o fragmento do gene *xghCp* clonado em pGEM-T, realizou-se o isolamento de gene completo do banco genômico de *C. perniciosus* construído no bacteriófago λEMBL3 (Stratagene) por Santos (2006). Para detecção dos fagos recombinantes, aplicou-se a metodologia de hibridização de DNA em placas de lise, descrita por Benton & Davis (1977), sendo usada a sonda marcada com o Kit “Gene Images Random Prime Labelling Module” (Amersham Pharmacia Biotech). Para detecção dos fragmentos, que hibridizaram com a sonda, foi utilizado o Kit “CDP-Star™ Detection Module” (Amersham Pharmacia Biotech). As hibridizações foram realizadas à temperatura de 65°C durante 16 horas, sendo a membrana lavada duas vezes em SSC 2X, SDS 0,1% a 60°C durante 20 minutos e uma vez em SSC 1X, SDS 0,1% a 65°C durante 10 minutos. Para confirmação dos sinais positivos, diluições de cada fago recombinante isolado foram utilizadas na realização de novas hibridizações sob as mesmas condições. Em seguida, as membranas foram colocadas em contato com filme XOMAT K (Kodak) e reveladas após exposição durante 24 horas.

A extração de DNA dos fagos recombinantes positivos foi realizada, conforme descrito por Felipe et al. (1992). Os DNAs extraídos foram clivados com as enzimas de restrição *Sal* I, *Kpn* I e *Sac* II. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, transferidos para membrana de náilon (Duralon-Stratagene) e hibridizados com a mesma sonda e sob as mesmas condições utilizadas na seleção dos fagos. Um fragmento de DNA hibridizado de aproximadamente 3 kb, obtido pela clivagem com *Sal* I, foi clonado no vetor pBluescript II KS+ (Stratagene®), previamente clivado com a mesma enzima.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores usados para a amplificação do gene endo-xilogalacturonana de *C. perniciosa*.

Oligonucleotídeos	Seqüências (5' - 3')
ENDOX1	CCCCGTCTGCACTAAAGAAGCGAG
ENDOX2	CACCCTTGACAATGACGTT
ENDOX F1174	GATTCCACGAAAGCCACTGG
ENDOX F1308	ACACAAGTTCCTGATGACCGG
ENDOX R1383	CGTCGTTCCGCGAATATTCT
EndoX R 272	GCACATCCTGTCTAGTCATCTA
EndoX F NotI	GCGGCCGCATGGCACTTTTCAGAGCGCTC
EndoX R NotI	GCGGCCGCAATCCACAACCTCATCCAGACGC
CPRDNA1	ACTGCGAGTGAAGAGGGAAA
CPRDNA2	AACCGCCGTATACGACAAAG

3.3. Seqüenciamento e análise das seqüências

Para o seqüenciamento de DNA, foi utilizando o seqüenciador MegaBACE 500 DNA Analysys System (Amersham Pharmacia Biotech Limited), empregando-se o método de terminação de cadeia por dideoxinucléotídeos (Sanger et al., 1977). As seqüências resultantes de DNA foram analisadas por meio da ferramenta BLAST- Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul et al., 1997). Subseqüentes análises da seqüência de DNA e da proteína foram realizadas, utilizando-se o programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994), enquanto, para a análise filogenética utilizou-se o programa MEGA3 (Kumar et al., 2004).

Os códigos de acesso das seqüências, utilizadas nas análises, foram: Xgh *A. tubingensis* (CAB65657); Xgh *A. fumigatus* Af293 (XP_747488); Exopg *A. tubingensis* (Q00293); Exopg *A. niger* (ABD61562,); Exopg *A. fumigatus* Af293 (XP_747778); Exopg *Botryotinia fuckeliana* (AAF05088); Exopg *Cochliobolus carbonum* (Q00359); ExopgA *A. niger* (ABD61563); Exopg *F. oxysporum f. sp* (BAD97415); Xgh *A. fumigatus* Af293(EAL85450); XghA *A. niger* (ABD61571); EndopgA *A. niger* (CAB72125); Endopg5 *B. fuckeliana* (AAC24955); Endopg *Phytophthora parasitica* (AAW22993); Endopg *Sclerotinia sclerotiorum* (Q12708) e XghCp *Crinipellis pernicioso* (ainda não depositada no NCBI).

3.4. Detecção do número de cópias do gene *xghCp*

Alíquotas de 4 µg de DNA genômico foram digeridas com as enzimas de restrição *Bgl* II, *Hind* III, *Sac* I e *Sal* I que não clivam o gene *xghCp*. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e transferidos para membrana de náilon (Duralon - Stratagene®), conforme protocolos gerais (Sambrook et al., 1989).

A hibridização foi realizada à temperatura de 65°C. O plasmídeo contendo o gene *xghCp* foi utilizado como sonda. A marcação foi feita com [α -³²P] d-ATP, utilizando-se o “Random Primer IT II Labeling Kit” (Stratagene). As lavagens das membranas foram feitas a 65 °C, em SSC 1X, SDS 0,1%, seguindo-se uma segunda lavagem em SSC 0,1X, SDS 0,1%. Cada lavagem foi feita durante 20 minutos. As membranas foram expostas a filmes XOMAT K (Kodak) durante 3 horas à temperatura de -80 °C.

3.5. Extração de RNA total e análise por RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction)

Discos de micélio de *C. perniciosa* do isolado CP02 foram inoculados em BDA a 27 °C durante 10 dias. Após esse período, 10 discos de micélio de 7 mm foram cortados em pequenos fragmentos e transferidos para Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio mínimo tamponado em pH 6,8 (KH₂PO₄ 6,8 g, K₂HPO₄ 8,6 g, KNO₃ 6,0 g, KCl 0,52 g; FeSO₄ 0,01 g; ZnSO₄ 0,01 g; glicose 10 g; água destilada 1 L), sendo , então, incubados a 27°C, em agitação a 250 rpm, durante um período de 8 dias, a fim de obter a massa micelial. Os micélios foram lavados, recuperados, e transferidos para meios contendo 1% de pectina cítrica, glicose, pectina + glicose ou extrato da polpa de cacau.

Para avaliação do efeito do pH na expressão do gene *xghCp*, o micélio foi transferido para meios contendo 1% de pectina cítrica, preparados em tampão citrato pH 4,0, citrato-fosfato pH 6,8 e tampão fosfato de sódio pH 8,0, os quais foram incubados durante períodos de 8, 18 e 32h. O RNA total foi extraído, conforme o protocolo disponível no endereço eletrônico www.tigr.org/tdb/potato/microarray_SOPs.shtml, sendo, então, checados em gel de agarose 1%, enquanto sua pureza e quantificação foram determinadas a 260 nm, utilizando-se o Programa RNA Quantify and Purity Check do espectrofotômetro Pharmacia Biotech. Ultraspec^R 3000.

Cinco µg de RNA total foram tratados com DNase RQI RNase Free (Promega) conforme recomendações do fabricante. Após o tratamento, foi

realizada uma reação de PCR com os oligonucleotídeos CPrDNA1 e CPrDNA2 (Tabela 1) para detecção de DNA genômico. Nas reações de transcrição reversa, para síntese das primeiras fitas de cDNA, empregou-se o kit ImProm™ II (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. A identificação dos transcritos do gene *xghCp* foi realizada por RT-PCR.

Para estabelecer os parâmetros de amplificação para o RT-PCR semiquantitativo, foi utilizada como controle uma parte do gene do *rDNA* 28S de *C. pernicioso*. Para isto, foram feitas reações de PCR a fim de detectar os ciclos correspondentes à fase de amplificação logarítmica do *rDNA*. Para estas análises utilizou-se 1 µL de cDNA, bem como os oligonucleotídeos CPrDNA1 e CPrDNA2 (Tabela 1) que amplificam um fragmento de 495 pb do gene *rDNA* de *C. pernicioso*. As condições de amplificação foram: 1 minuto à temperatura de 94°C, 1 minuto a 57°C e 1 minuto a 72°C, sendo as alíquotas retiradas com 20, 22, 24, 26 e 40 ciclos. A partir destas análises, todas as reações foram feitas com 25 ciclos de amplificação. Para análise da expressão do gene *xghCp*, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ENDOX1 e ENDOX2 (Tabela 1), que amplificam um fragmento de 894 pb, contendo dois íntrons. O tamanho esperado para o produto de amplificação foi de 786 pb, utilizando-se o cDNA como molde. As condições de amplificação foram: 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 55°C; 1 minuto a 72°C com 39 ciclos para RT-PCR e 25 para RT-PCR semiquantitativo. Os fragmentos de DNA foram analisados em gel de agarose 1,5 %. Para realização das análises de intensidade dos fragmentos de DNA amplificados, o programa ImageJ (Abramoff et al., 2004), disponível no site <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, foi utilizado.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da endo-xilogalacturonana hidrolase de *C. perniciosus*

O gene *xghCp* foi clonado e seqüenciado, utilizando-se oligonucleotídeos específicos (Tabela 1). A análise da seqüência com a utilização da ferramenta Blast revelou uma ORF de 1.251 pb, interrompida por 4 possíveis íntrons (Figura 1).

A proteína deduzida apresentou 417 aminoácidos (Figura 2), com ponto isoelétrico (pI) de 8,70 e massa molecular de 43.7088 kDa, com identidade de 50% e similaridade de 64% com endo-xilogalacturonana hidrolase de *A. tubingensis* (CAB65657) e 51% e 65% de identidade e similaridade, respectivamente, com a endo-xilogalacturonana hidrolase A de *A. niger* (ABD61571).

A região 5' não codificadora possui 204 pb, contendo um típico TATA box (TATAAA) de eucariotos na posição -44, uma seqüência CCAAT na posição -155, a qual é frequentemente observada em promotores de fungos. A seqüência 5' CATAATGGC em torno do códon de iniciação ATG, é semelhante à seqüência Kozak (CAMMATGNC) encontrada em fungos filamentosos e em genes de eucariotos. Na região 3' não codificadora (470pb), não foi encontrado um típico sítio de poliadenilação (AATAAA), mas foram detectadas seqüências similares nas posições 71 (AATGA), 111 (AATTA) e 251(ATAA). Duas seqüências apresentando o consenso (CWTS), envolvido na terminação da tradução e proposto como sítio de poliadenilação, foram detectadas nas posições 31 e 41 após o sítio de terminação da tradução. Uma seqüência correspondente ao possível sítio de clivagem TAGT foi encontrada na posição 278 (Figura 1). Tanto o sítio de poliadenilação quanto o sinal de clivagem são requeridos para o processamento do mRNA, e a perda desses motivos sugere diferenças na maquinaria de processamento (Unkles, 1992).

A seqüência de aminoácidos RIK (Arg-Ile-Lys) considerada uma assinatura e encontrada em todos as endopoligalacturonases de fungos e exopoligalacturonases de plantas, não foi encontrada em *XghCp*. Esta seqüência também não foi localizada na endo-xilogalacturonana hidrolase de *A.*

tubingensis (CAB65657), *A. fumigatus* Af293 (XP_747488) e *A. niger* (ABD61571), sugerindo que embora XghCp apresente 51% de similaridade com exopg de *Aspergillus terreus* (XP_001209838), ela não pertence à classe das exopoligalacturonases.

Os sítios ativos de poligalacturonases de fungos apresentam seqüência de aminoácido consenso CXGGHGXSIGSVG, que foi encontrado em XghCp localizada entre os resíduos 242-254, com modificações para CTG[S/G]HGLS[V/I]GS[L/M][A/G].

Foram detectados três potenciais sítios de N-glicosilação, apresentando a seqüência consenso (NXS/T) nas posições Asn¹⁶¹ (Asn-Leu-Ser), Asn¹⁸⁹ (Asn-Ala-Thr) e Asn²⁹⁵ (Asn-Val-Thr), este último, apresentou liminar acima de 0,5 (NetNGlyc 1.0 Server – prediction) e é conservado tanto em endo-xilogalacturonana hidrolase de *A. tubingensis* quanto em exopoligalaturonase semelhante a Xgh de *A. fumigatus* Af293 (Figura 2).

O número de cópias de *xghCp* foi determinado por hibridização do DNA genômico digerido com quatro enzimas diferentes: *Bgl* II, *Hind* III, *Sac* I, *Sal* I. Uma única banda foi observada após a hibridização, em todas as digestões, indicando a presença de uma única cópia no genoma. Na clivagem com *Hind* III uma banda menos intensa é observada, possivelmente devido à clivagem parcial (Figura 3).

-204 tacggaagatatctatccatctatctttacatcgtgtcggacaattgcaacggcccacgg

-144 **cgccct**ctctttccgtaccaccaccaccagacgactactatacacaactctggaagaattc

-84 aggaaataatgggtagatgactagacaggatgtgctatg**tataaa**ggtagctttccacagg

-24 tgatgtttcttctcactagcc**cataATGGC**ACTTTTCAGAGCGCTCCGACTCGTCGCGATC

M A L F R A L R L V A I

37 CTTTCATTCCTTCCCTCGTCTCAGGATCCCCGTCTGCACTAAAGAAGCGAGCAACATGT

L S F L S L V S G S P S A L K K R A T C

97 ACCGTCATCTGCAGGACTGCAGGTACCGATGACGTTCCAGCTATCGAAAATGCAATT

T V S S A G T A G T D D V P A I E N A I

361 AAGTCTTGTGGCAACGGGGGAATCATTGTCTATCCGCCGGCAAACCTACATGATTCGC

K S C G N G G I I V L S A G K T Y M I R

421 TCGACATGGATTGCACCGGTGTTCCAGGATGTGAAGTTCAGATTGAAGGCACCCTGAAA

S T L D C T G C S G C E V Q I E G T L K

481 CTATCGGATGACACGAATTTCTGGAATGGCGTCAGGGCAGCCATACTTCTGACGAATCTG

L S D D T N F W N G V R A A I L L T N L

541 AACGGTGCAACCGTCCATTCCAAGACTGGCTCTGGCGTGTGTGACGGAAATGGGGTACCC

N G A T V H S K T G S G V V D G N G V P

601 TTCTGGCAA**gtagt**gttctgtgctccatag**gtctac**ctttctcaccttgatgtc**cag**AG

F W Q E

661 TTTGCTTCGGATAACACCTTCAAACGCCCTACGTTGATGTATATTTCCGGCGGTTCTAAC

F A S D N T F K R P T L M Y I S G G S N

721 ATTGTTGTGGAGAATCTCTTTCAAGAACCGCCAAATGTCTTCCATTCTGTACCAGAT

I V V E N L S F K N A P N V F H S V T D

781 GGTGCTACGAACGTAATTTATCGCGGACTCAAGCTGAACCGCAGCCGAAAGATGGGGCC

G A T N V I Y R G L K L N A T P K D G A

841 GTCCCGAAAAATACAGAT**gtccct**tttcaactttttgtgt**gcctcaa**atgctcatg

V P K N T D

901 cgcttat**tag**TTTCGATGTCCGAAATCCACCTATGTGACTATCAGCAACCCAACGTT

G F D V G K S T Y V T I S N T N V

961 GTCAATCAGGATGACTGTGTTGCTTTCAAACCTGGTTGTAATATGTACTGTACCAGAT

V N Q D D C V A F K P G C N Y V T V T D

1021 ATCACTTGCACCGGATCCCATGGGCTTTCCGTCGGTAGCCTTGCAAAGGCAGCAACGAC

I T C T G S H G L S V G S L A K G S N D

1081 **gttgta**gtctcttcgcttttgagttctccc**actgtag**cttgacgggtctgta**cag**GTC

V

1141 ACCAACGTCATTGTCAAGGGTGTACGATGATTGATTCACGAAAGCCACTGGGATCAA

T N V I V K G A T M I D S T K A T G I K

1201 CTCTACGACGGTGTCTCGGGCCATGGCGTAGCCACGGTCCGAAATGTTACTTTCCAAGAT

L Y D G A S G H G V A T V R N V T F Q D

1261 GTCACTTACAGAATTGCGAGTACGCCCGCACATCCAGACCTGCTACCGGTTCATCAGGA

V T L Q N C E Y A A H I Q T C Y R S S G

1321 ACTTGTGTCCCCAGCAAGCACAACTTGACCAAGTTTACTGGAAGAATATTCGCGGAACG

T C V P S K H N V D Q V Y W K N I R G T

1381 ACTTGTGTCCCCAGCAAGCACAACTTGACCAAGTTTACTGGAAGAATATTCGCGGAACG

T C V P S K H N V D Q V Y W K N I R G T

1441 AC**gtaggt**ctttgatttccttgaattaccttgc**cccta**ctctttttcac**cag**TGCT

T A

1501 ACGAAGTTTGACCCAACAGTTGCGAATATGAACTGCCCCAGTTCTGGAACGTGTAATATC

T K F D P T V A N M N C P S S G T C N I

1561 TTTTTCAGGACTTTACTGTCAAGGCACCGTCTGGCAAGGCAAATGTTGTTGTTTCAGCT

F F Q D F T V K A P S G K A N V L C S A

1621 GTTGACAGTAGTTGGGTGTTAGCTGTAGCGGAAGCGCTCGGAT**TGA**gttggtgattca

V D S S L G V S C S G S A S G *

1681 tacagattactttcccgc**catc**gttctc**catc**tgattttctgtaaactctcgtgtg**aa**

1741 **tgac**caccatggatgactcaaagcgggtgaatgccgacc**aatta**ctgtcgttctcctcgtgaa

1801 tgttggtcccattgtgctcaagctgggaggaaggcgaacgagttcagattcatgat

1861 cgttgattgatatggccccgaagtagggcttctatgacgatgacgagcgtgat**ggat**

1921 **aa**gttcggtgactcagacatcctcaaggatat**tagt**tcggcaatgctttctaccacc

1981 cattcagtttcatgtttccaggcctcaaaaaagattcagcccaccactgtacgaggaggt

2041 acattntgacaagcacatttctgaactccaattcgggtggtataaacattgacctacact

2101 ttatccatagcatacaaaacacatcatttatgtacct

Figura 1. Sequências de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene que codifica endoxilogalacturonana hidrolase de *C. pernicioso*. As regiões 5' e 3' não codificadoras e os íntrons foram colocados em letras minúsculas. Os sítios putativos CAAAT box , sítio rico em GC e TATA box estão em negrito e sublinhados na região 5'. Os possíveis sítios de poliadenilação estão em negrito e sublinhados na região 3'. O códon de parada está sinalizado com um asterisco, enquanto o sítio de clivagem do peptídeo sinal TAGT está em caixa cinza. A sequência consenso CWTS está representada em caixa cinza, em negrito e sublinhada. A sequência consenso interna de cada íntron está em negrito e sublinhada. A sequência semelhante a Kozak em torno do códon de iniciação está em cinza.

A

```

1      MALFRALRLV AILSFLSLVSG SPSALKKRA TCTVSSAGTA GTDDVPAIEN AIKSCGNGGI
61     IVLSAGKTYM IRSTLDCTGC SGCEVQIEGT LKLSDDTNFW NGVRAAILLT NLANGATVHSK
121    TGSGVVDGNG VPFWQKFASD NTFKRPTLMY ISGGSNIVVE NLSFKNAPNV FHSVTDGATN
181    VIYRGLKLNA TPKDGAVPKN TDGFDVGKST YVTISNTNVV NQDDCVAFKP GCNYVTVTDI
241    TCTGSHGLSV GSLAKGSNDV TNVIVKGATM IDSTKATGIK LYDGASGHGV ATVRNVTFQD
301    VTLQNCEYAA HIQTCYRSSG TCVPSKHNVD QVYWKNIRGT TCVPSKHNVD QVYWKNIRGT
361    TATKFDPTVA NMNCPSSGTC NIFFQDFTVK APSGKANVLC SAVDSSLGVS CSGSASG

```

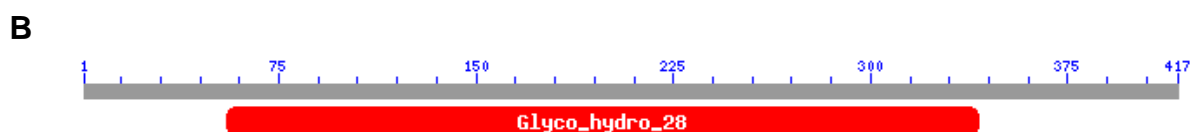


Figura 2. (A), proteína deduzida endo-xilogalacturonana hidrolase de *C. pernicioso*. Possíveis sítios de N-glicosilação estão em caixas cinza e negrito. A seqüência correspondente ao peptídeo-sinal é indicada em negrito e sublinhada; a seqüência GIK, que é uma assinatura das XGH, é apresentada em negrito e sublinhada. Seqüência relacionada ao consenso CXGGHGXSIGSVG, correspondente ao sítio ativo de poligalacturonase, está sublinhada. (B), esquema representando o domínio glicohidro 28, pertencente a família glicosil hidrolase 28, encontrado também em poligalacturonases.

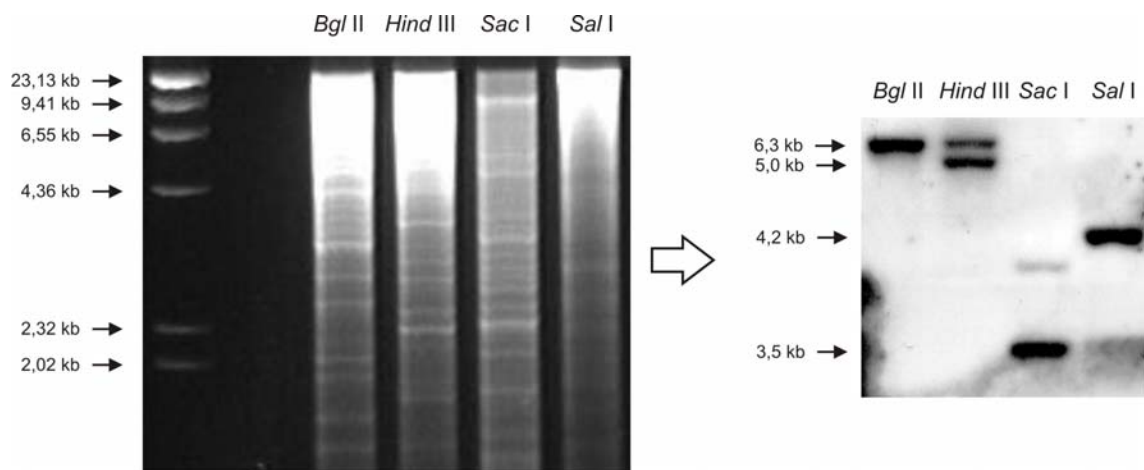


Figura 3 Análise do número de cópias do gene *xghCp*. DNA genômico do isolado CP02 foi digerido com as enzimas *Bgl* II, *Hind* III, *Sac* I, *Sal* I, e os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% preparado em TBE 1X e transferidos para membrana de nylon (Stratagene) conforme o método de Sambrook et al. (1989). A hidridização foi realizada com [³²P] dATP marcado. Os fragmentos de DNA do marcador λ *Hind* III são indicados em kilobase (kb) à direita e o tamanho aproximado das bandas é indicado, ao lado, pelas setas.

4.2. Análise da transcrição do gene *xghCp*

Na análise da transcrição gênica por PCR semiquantitativa é medido o acúmulo do produto de PCR, formado durante a fase exponencial da reação, por meio da interrupção da PCR após um determinado número de ciclos. Foi analisada a transcrição do gene *xghCp*, em glicose e na mistura glicose com pectina no pH 6,8, e em pectina cítrica nos pHs 4,0, 6,8 e 8,0. Um gene transcrito constitutivamente pela célula foi usado como controle. A razão dada por meio da relação do gene *xghCp* pelo gene controle é apresentada, esquematicamente, na Figura 4.

O gene, que codifica a endo-xilogalaturonana hidrolase de *C. pernicioso*, foi transcrito em todas as fontes de carbono e pHs analisados. Os resultados mostram que não houve repressão por glicose à concentração de 1% (Figura 4).

4.3. Análise filogenética e alinhamento das seqüências

A seqüência de aminoácidos da proteína XghCp possui um alto grau de similaridade com as enzimas endo-xilogalacturonana hidrolase e exopoligalacturonase. Alinhamento múltiplo da seqüência deduzida do gene *xghCp* com outras Xgh e Exopgs é mostrado na Figura 5. A seqüência RIK conservado em todas as poligalacturonases, apresenta-se modificado nas Xghs, em que o resíduo R (arginina) é substituído por G (glicina). A arginina (R²⁵⁶) e a lisina (K²⁵⁸) estão envolvidas na ligação ao substrato na proteína EndopgII de *A. niger* (Armand et al., 2000). Apesar de existir um pequeno número de seqüências de Xgh depositadas no banco de dados (NCBI), a seqüência GIK pode ser considerada a assinatura para a endo-xilogalacturonana hidrolase (Figura 5). Conforme se observa na Figura 6, a análise filogenética por meio do método de agrupamento de vizinhos (Neighbour-Joining–NJ), reúne, em ramos separados, todas as exopoligalacturonases, endopoligalacturonases e endo-xilogalacturonana hidrolase, incluindo a XghCp.

<i>ExoPG-C-carbonum</i>	158	GOAWYDLYAKDIYILRPIILFGLIGAKNAKISDLKFRYSPQWYTLVAN	SSQVVFSSNIDIF	216
<i>ExoPG-B-fuckeliana</i>	170	GOTWYDYYASNIYALRPVLIIGIDGLKDSILSDLVLRYSPOYYNFIAN	SSNVVYNNINIA	228
<i>ExoPGA-A-niger</i>	153	GOYWWSAMAEDSSVMRPLLGTDGLHHAATISGLTMLNSPNWFNLIAN	STDILISNMTML	211
<i>ExoPG-F-oxysporum</i>	164	GOAYWEEMAIVNKTLRLPILLTIEDAHGLTMSNLRMRNPNWFNLIIN	STDVLIISDLELE	222
<i>EndoPG5-B-fuckeliana</i>	124	GASYWDGEGSNGGKTKPKFFVAHSLISSTIENLYFYNPPQVMSINSATDLTVSGVTIN		182
<i>EndoPG-Sclerotinia-s</i>	130	GAKYWDGKGTNGGKTKPKFFVAHSLKGGSSINNVKILNSPQVQVFSINSASGLTSGITID		189
<i>EndoPGA-A-niger</i>	116	GAKWWDGEGTNGGKTKPKFFVAHDLDDSKIISGLYIKNTPVQAIISVESDNLVI	EDVTID	173
<i>EndoPG-P-parasitica</i>	142	GAWYWP	---	197
<i>Clustal Consensus</i>	8	13

		250	260	270	280	290	300		
<i>Xgh-A-tubingensis</i>	195	ANSKS	-DNPPKNTDGFDIGESTYVT	ITEVTVVNDDD	CVAFK	PSSNYVTVD	243	
<i>Xgh-A-niger</i>	195	ANSKS	-DNPPKNTDGFDIGESTYVT	ITEVTVVNDDD	CVALK	PSSNYVTVD	243	
<i>Xgh-A-fumigatus</i>	198	ATSNS	-QNPPKNTDGFDIGASTHVT	ISSVSVTNDDD	CVAFK	PGSNYVTVE	246	
<i>XghB-A-fumigatus</i>	198	ATSNS	-QNPPKNTDGFDIGASTHVT	ISSVSVTNDDD	CVAFK	PGSNYVTVE	246	
<i>Xgh-C-perniciosa</i>	190	ATPKD	-GAVPKNTDGFDFVKGSTYVT	ISNTNVVNQDD	CVAFK	PGCNYVTVT	238	
<i>ExoPG-A-tubingensis</i>	211	GYSKS	-DNEAKNTDGDWDTYRSNNIV	IQNSVINNGDD	CVSFK	PNSTNILLVQ	259	
<i>ExoPG-A-niger</i>	211	GYSKS	-DNEAKNTDGDWDTYRSNNIV	IQNSVINNGDD	CVSFK	PNSTNILLVQ	259	
<i>ExoPG-A-fumigatus</i>	212	GYSKS	-KNEAKNTDGDWDTYRSNNIV	IQNSVINNGDD	SRNKLLEYAD	CVSFK	PNSTNILLVQ	270
<i>ExoPG-C-carbonum</i>	217	GDSKS	-KNPAKNTDGDWDTYRSNNIV	IQNSVINNGDD	CVSFK	PNSTNILLVQ	265	
<i>ExoPG-B-fuckeliana</i>	229	GGSSS	-KNPAKNTDGDWDTYRSNNIV	IQNSVINNGDD	CVSFK	PNSTNILLVQ	277	
<i>ExoPGA-A-niger</i>	212	VESEI	SDAPAKNTDGDWDTYRSNNIV	IQDSRIIVNTDD	CVSFK	PNSTQIVIQ	261	
<i>ExoPG-F-oxysporum</i>	223	AKSLN	-GVKIANSDGDWDTYRSNNIV	IQNSVIDNTDD	CVSFK	PNSTNVVVMQ	271	
<i>EndoPG5-B-fuckeliana</i>	183	AQDGD	DSLGHNTDGFDIGSSTTIT	TGANVYNQDD	CVAINSG	-TGITFS	231	
<i>EndoPG-Sclerotinia-s</i>	190	NSAG	-NSLGHNTDGFDFVGSSTDTIT	ISGANVQND	CVAINSG	-TGITFT	236	
<i>EndoPGA-A-niger</i>	174	NSDGD	-SEGGHNTDGFDIGESTYVT	TGATVKNQDD	CVAINSG	-ENIYFS	221	
<i>EndoPG-P-parasitica</i>	198	SRAGN	-GSAKNTDGFDFLSRNNHVT	TNNRVYNQDD	CLAMQSS	-SNTVFS	244	
<i>Clustal Consensus</i>			

		310	320	330	340	350	360	
<i>Xgh-A-tubingensis</i>	244	TISCT	GSHGISVGS	SLGK	SSDSS	VKNIVYTGATMIN	STKAAGIKTYP	SG 291
<i>Xgh-A-niger</i>	244	TISCT	GSHGISVGS	SLGK	SSDSS	VKNIVYTGATMIN	STKAAGIKTYP	SG 291
<i>Xgh-A-fumigatus</i>	247	DVTCT	GSHGISVGS	SLGK	SGPDV	VQNILAHRITMI	ESTKAAGIKTYP	SG 294
<i>XghB-A-fumigatus</i>	247	DVTCT	GSHGISVGS	SLGK	SGPDV	VQNILAHRITMI	ESTKAAGIKTYP	SG 294
<i>Xgh-C-perniciosa</i>	239	DITCT	GSHGLSVGS	SLAK	GSDN	VTVVIVK	GATMIDSTKATGIKLYD	GA 285
<i>ExoPG-A-tubingensis</i>	260	NLHCN	GSHGISVGS	SLGQY	KDEVD	IVENVYVYNI	SMFNASDMARIKVWPGTPSALSADLQ	318
<i>ExoPG-A-niger</i>	260	NLHCN	GSHGISVGS	SLGQY	KDEVD	IVENVYVYNI	SMFNASDMARIKVWPGTPSALSADLQ	318
<i>ExoPG-A-fumigatus</i>	271	NLHCN	GSHGISVGS	SLGQY	KDEVD	IVENVLYVNI	SMYNASDGMARIKVWPGVSSAMSEDLQ	329
<i>ExoPG-C-carbonum</i>	266	NLFCN	GSHGISVGS	SLGQY	PGEVD	IVENILVRNI	SMSNASDGMARIKVWPGVSSAMSEDLQ	324
<i>ExoPG-B-fuckeliana</i>	278	NLFCN	GSHGISVGS	SLGQY	PGEVD	IVENVYVYNTSLH	NATDGMARIKVWVPNTASALSADLQ	336
<i>ExoPGA-A-niger</i>	262	NLDCT	GSHGISVGS	SLGQY	QGETD	IVENLYIYNI	SMTDASDGMARIKVWPGVVPADTSQSTS	320
<i>ExoPG-F-oxysporum</i>	272	NLFCN	GSHGISVGS	SLGQY	KGETD	IVENLYIYNI	SMSNASDGMARIKVWPGVETAFQILLN	330
<i>EndoPG5-B-fuckeliana</i>	232	GGVCS	GGHGLSVGS	SVGG	RDDNI	IVETVLFENSE	IKASQNGIRIKTISG	278
<i>EndoPG-Sclerotinia-s</i>	237	GGTCS	GGHGLSVGS	SVGG	RSDNV	SDVIESSTVKN	SANGVRIKTVLD	283
<i>EndoPGA-A-niger</i>	222	GGTCS	GGHGLSVGS	SVGG	RDDNT	VKNVTFIDSTVSD	SENGVRIKTVLD	268
<i>EndoPG-P-parasitica</i>	245	NNYCS	GGHGLSVGS	SVGG	PEQNVNTT	VGLLVK	DNTIVNSTNGIRIKTIIG	294
<i>Clustal Consensus</i>		

		370	380	390	400	410	420		
<i>Xgh-A-tubingensis</i>	292	GDHGT	STVSNVTF	NDFDFTVD	NSDYAFQIQ	SCYGEDDDYCEEN	P 333	
<i>Xgh-A-niger</i>	292	GDHGT	STVSNVTF	NDFDFTVD	NSDYAFQIQ	SCYGEDDDYCEEN	P 333	
<i>Xgh-A-fumigatus</i>	295	NGHGL	STVKNVTF	SDFNVR	GCDYAFQIES	CYGESESYCESN	P 336	
<i>XghB-A-fumigatus</i>	295	NGHGL	STVKNVTF	SDFNVR	GCDYAFQIES	CYGESESYCESN	P 336	
<i>Xgh-C-perniciosa</i>	286	SGHGV	ATVRNV	TQDVTTLQ	NVEYAAH	IQTCYRSSGTCVPS	SKHNVDQVYWKNI	RGTTCP 344	
<i>ExoPG-A-tubingensis</i>	319	GGGGSGS	VKNIT	YDALTALID	NVDWAIEIT	QCYGQKNLTL	LCNEY	P 361
<i>ExoPG-A-niger</i>	319	GGGGSGS	VKNIT	YDALTALID	NVDWAIEIT	QCYGQKNLTL	LCNEY	P 361
<i>ExoPG-A-fumigatus</i>	330	GGGGLGS	VKNV	TYNQMYIE	NVDWAIEVT	QCYGQKNLTL	LCNEY	P 372
<i>ExoPG-C-carbonum</i>	325	GGGGSGA	VKNV	TYDGMIVK	NVDYAEIT	QCYGQKNLTL	LCNQF	P 367
<i>ExoPG-B-fuckeliana</i>	337	GGGGSGR	VNNIT	YDTMYID	NVDYAEIV	DCYQGNLTL	CLEF	P 379
<i>ExoPGA-A-niger</i>	321	GGG	-LGRV	RNVTEHMQSE	NNDHISV	QCYSKKNQTM	CDSY	P 362
<i>ExoPG-F-oxysporum</i>	331	GGGGL	GRV	RNVTYDTFYHE	NNDNAIT	ITQCYGQKNLTL	CNEF	P 373
<i>EndoPG5-B-fuckeliana</i>	278	---	DTGT	VSGITYSGIT	LSGITYDGI	TVNQADYG	-TSGEPTN	316
<i>EndoPG-Sclerotinia-s</i>	283	---	ATGS	VSGVTYKIDIT	LSGITYSGV	IEQDYENG	SPTGKPTS	323
<i>EndoPGA-A-niger</i>	268	---	ATGT	VEDITYSNIQ	LSGIDYGI	IEQDYENG	DPTGTFSN	308
<i>EndoPG-P-parasitica</i>	294	---	LKGL	VNTVYTN	NRLVNVKHA	IVMHS	DYNTKGGYSGIP	S 334
<i>Clustal Consensus</i>			

Continuação

		430	440	450	460	470	480	
<i>Xgh-A-tubingensis</i>	334	GNAKLTD	IVVSSF	SGTTS	SDKYDP	PVVANLDC	GADGTCG	ISISGFDVKAPSGKSEVLCANT 392
<i>Xgh-A-niger</i>	334	GNAKLTD	IVVSSF	SGTTS	SDKYDP	PVVANIDCG	SDGTCG	ISISGFDVKAPSGKSEVLCANT 392
<i>Xgh-A-fumigatus</i>	337	GNAILQG	IVVKGFS	SGTTS	SGKYDP	PVVANLNC	GARGTCD	VMSAFSVKAPSGKATVLCANT 395
<i>Xgh-B-A-fumigatus</i>	337	GNAILQG	IVVKGFS	SGTTS	SGKYDP	PVVANLNC	GARGTCD	VMSAFSVKAPSGKATVLCANT 395
<i>Xgh-C-perniciosa</i>	345	SKHNVDQ	VYWKNI	RGT	TATKFD	PVANMNC	PSSGTCN	IFFODFTVKAPSGKANVLCASV 403
<i>ExoPG-A-tubingensis</i>	362	S	S	S	S	S	S	S
<i>ExoPG-A-niger</i>	362	S	S	S	S	S	S	S
<i>ExoPG-A-fumigatus</i>	373	SNLTISD	IHFKNFR	GTTSG	KRDPNV	GTIVC	SSPNV	CSDIYAENIDVKS
<i>ExoPG-C-carbonum</i>	368	SNLTISD	ITIKNF	GTTSG	KYDPRV	GYVVC	SSPKV	CSDISIENIDVKS
<i>ExoPG-B-tuckelliana</i>	380	S	S	S	S	S	S	S
<i>ExoPGA-A-niger</i>	363	SKLVI	IEDVLF	KDFK	GTTSK	KYDPE	IGELT	CSSPDVCHNITVQDINVT
<i>ExoPG-F-oxysporum</i>	374	ANLTI	EDVTM	KNEW	GT	VSTKY	DPRAG	SLVCSAPDRCSNI
<i>EndoPG5-B-tuckelliana</i>	316	-GVAISK	FILEN	ITGT	VES	-TATN	ILIE	CGSGSCTDWTWTDVSV
<i>EndoPG-Sclerotinia-s</i>	323	-GVPIT	GTVLS	NVHGT	VSS	-SATN	VYV	LCAK-C
<i>EndoPGA-A-niger</i>	308	-GVTIS	SDVTLE	ITG	SVDS	-DAVE	IYL	CGDGS
<i>EndoPG-P-parasitica</i>	335	S	L	V	N	I	T	N
<i>Clustal Consensus</i>		:	:	:	:	:	:	:

		490	500	
<i>Xgh-A-tubingensis</i>	393	P	S	D
<i>Xgh-A-niger</i>	393	P	S	D
<i>Xgh-A-fumigatus</i>	396	P	S	S
<i>Xgh-B-A-fumigatus</i>	396	P	S	S
<i>Xgh-C-perniciosa</i>	404	D	S	S
<i>ExoPG-A-tubingensis</i>	421	V	D	E
<i>ExoPG-A-niger</i>	421	V	D	E
<i>ExoPG-A-fumigatus</i>	432	V	D	K
<i>ExoPG-C-carbonum</i>	427	A	E	G
<i>ExoPG-B-tuckelliana</i>	439	V	N	E
<i>ExoPGA-A-niger</i>	423	M	G	N
<i>ExoPG-F-oxysporum</i>	434	I	D	T
<i>EndoPG5-B-tuckelliana</i>	373	S	G	G
<i>EndoPG-Sclerotinia-s</i>	376	-	-	-
<i>EndoPGA-A-niger</i>	364	-	-	-
<i>EndoPG-P-parasitica</i>	388	N	V	Q
<i>Clustal Consensus</i>		:	:	:

Continuação

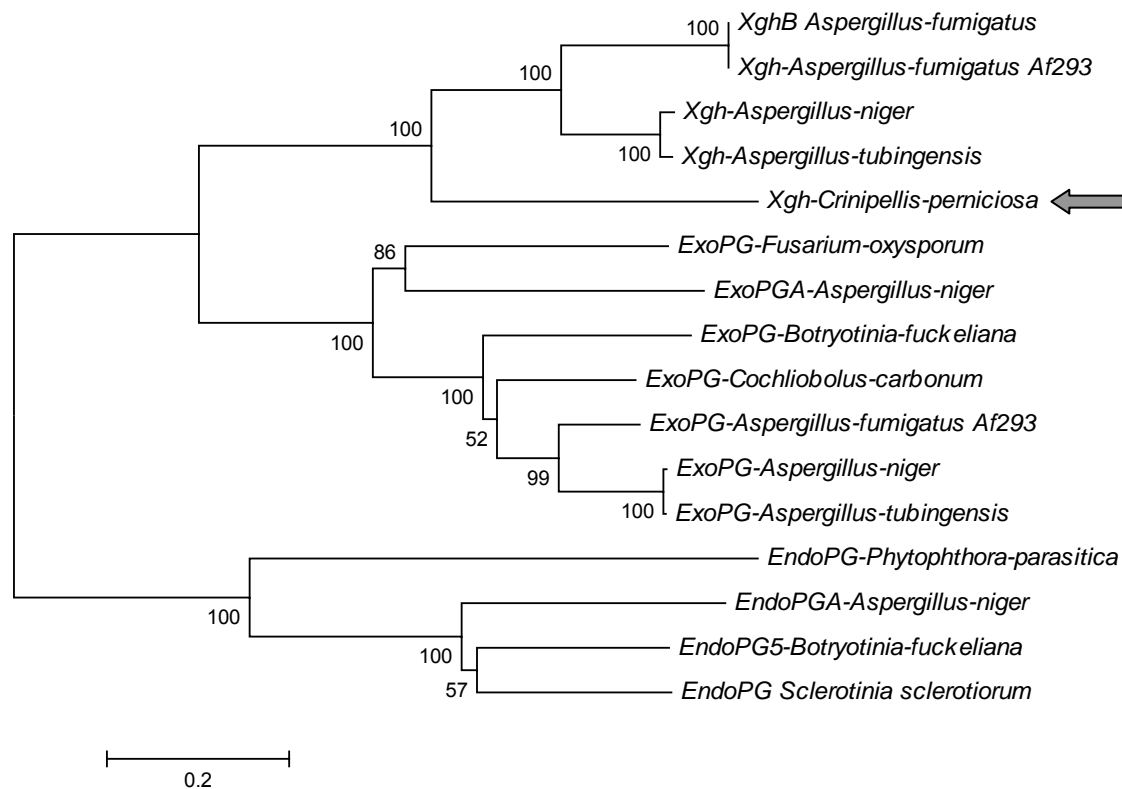


Figura 6. Análise filogenética da proteína deduzida XghCp, realizada por meio do método de agrupamento de vizinhos (NJ), utilizando o programa MEGA 3.1. O comprimento dos ramos horizontais é proporcional à distância genética. Os valores de “bootstrap” de 5000 réplicas são indicados na parte superior de cada ramo e a distância dos ramos na parte inferior. Os organismos e os números de acesso utilizados foram: Xgh de *Aspergillus tubingensis* (CAB65657); Xgh de *Aspergillus fumigatus* Af293 (XP_747488); Exopg de *A. tubingensis* (Q00293); Exopg de *Aspergillus niger* (ABD61562); Exopg de *A. fumigatus* Af293 (XP_747778); Exopg de *Botryotinia fuckeliana* (AAF05088); Exopg de *Cochliobolus carbonum* (Q00359); ExopgA de *A. niger* (ABD61563); Exopg de *Fusarium oxysporum* f. sp (BAD97415); Xgh de *A. fumigatus* Af293 (EAL85450); XghA de *A. niger* (ABD61571); EndopgA de *A. niger* (CAB72125); Endopg5 de *B. fuckeliana* (AAC24955); Endopg de *Phytophthora parasitica* (AAW22993); Endopg de *Sclerotinia sclerotiorum* (Q12708) e XghCp de *Crinipellis perniciosa* (ainda não depositada no NCBI).

5. DISCUSSÃO

A ruptura da cutícula mediante a penetração direta de *C. pernicioso* no tecido do cacaueteiro, bem como a conseqüente degradação completa das células do mesófilo, ressalta a importância das enzimas pectinolíticas responsáveis pela degradação da parede celular da planta. Além disso, a degradação da parede pode levar à liberação de oligossacarídeos, que são potenciais elicitores da resposta de defesa da planta (Federici et al., 2006). Neste trabalho, foi descrita a clonagem e caracterização do gene *xghCp*, que codifica uma endo-xilogalacturonana hidrolase de *C. pernicioso*. Somente uma cópia foi detectada, após a hibridização, sugerindo que não existem outras seqüências homólogas a *xghCp*. Geralmente, os fungos possuem múltiplas formas de pectinases, como as poligalacturonases devido à presença de múltiplos genes ou até mesmo modificações pós-traducionais de uma mesma proteína (Wubben et al., 1999). Após análise do banco de dados do projeto genoma da vassoura-de-bruxa, observou-se que o fungo *C. pernicioso* possui, pelo menos, quatro poligalacturonases, duas endopoligalacturonases e duas exopoligalacturonases. Destas já foram clonadas e caracterizadas uma exopg e uma endopg (dados não publicados). Tem sido proposto que múltiplas formas dessas enzimas fornecem, ao patógeno, um aumento na eficiência da degradação, possibilitando a colonização de uma ampla gama de hospedeiros, visto que a constituição da pectina da parede celular varia, amplamente, entre as espécies, e entre diferentes tecidos do mesmo hospedeiro. Portanto, múltiplas formas garantem, ao patógeno, a habilidade de obtenção de nutrientes dos diferentes tecidos, o que assegura sua melhor adaptação e sucesso na infecção (Williams et al., 2002; Gotesson et al., 2002).

Análise filogenética da seqüência de aminoácidos deduzida indica que *XghCp* é semelhante a outras *Xgh* e *Exopgs*, conforme apresentado na Figura 6. O alinhamento múltiplo mostra que seqüência RIK, conservado em todas as

poligalacturonases, apresenta-se modificado nas Xghs, em que o resíduo R (arginina) é substituído por G (glicina). A arginina (R²⁵⁶) e a lisina (K²⁵⁸) estão envolvidas na ligação ao substrato na proteína EndopglI de *A. niger* (Armand et al., 2000). Embora um pequeno número de seqüências Xgh estejam depositadas no banco de dados (NCBI), a seqüência GIK pode ser considerada a assinatura para a endo-xilogalacturonana hidrolase (Figura 5). Mesmo ocorrendo uma alta similaridade com Exopgs de fungos, Xghs não contêm motivos conservados em regiões características, indicando ser uma nova enzima (Markovic & Janecek, 2001; van der Vlugt-Bergmans et al., 2000). A análise filogenética, realizada com a utilização do método de agrupamento de vizinhos (neighbour-joining – NJ), reúne em ramos separados todas as exopoligalacturonases, endopoligalacturonases e endo-xilogalacturonana hidrolases incluindo a putativa XghCp.

Foram detectados três potenciais sítios de N-glicosilação, apresentando a seqüência consenso (NXS/T) nas posições Asn¹⁶¹ (Asn-Leu-Ser), Asn¹⁸⁹ (Asn-Ala-Thr) e Asn²⁹⁵ (Asn-Val-Thr), sendo que, este último apresenta limiar acima de 0,5 (NetNGlyc 1.0 Server – prediction) e é conservado tanto em endo-xilogalacturonana hidrolase de *A. tubingensis* quanto em exopoligalacturonase semelhante a Xgh de *A. fumigatus* Af293. A glicosilação é uma importante modificação pós-traducional e representa um processo primordial para formação das proteínas secretadas e de membrana, além de poder afetar expressão e função (Kasturi et al., 1997). Assim como a maioria das poligalacturonases, possivelmente XghCp atue extracelularmente na parede celular do hospedeiro. Por este motivo, foram analisadas possíveis seqüências de endereçamento. Estas são constituídas de domínios polipeptídicos presentes em proteínas secretadas, denominadas peptídeo-sinal (SP), o qual é necessário para a entrada da pré-proteína no lúmen do RE. Seqüência da região N-terminal da Xgh de *C. perniciosus* apresenta 21 peptídeos ricos em resíduos hidrofóbicos correspondente ao SP.

A produção extracelular de pectinases é, geralmente, condicionada à repressão catabólica por meio de carboidratos prontamente metabolizáveis. Em muitos casos, a expressão gênica das poligalacturonases tem sido condicionada ao pH ambiental (Cotton et al., 2003; Wubben et al., 2000).

Entretanto, algumas poligalacturonases apresentam expressão constitutiva, como os genes *pgaA* e *pgaB* de *A. niger* e *Bcpg1* e *Bcpg2* de *Botrytis cinerea* (Parenicova et al., 2000, Wubben et al., 2000) ou diferencialmente expressa dependendo do estágio de infecção e do hospedeiro (ten Have et al., 2001). Em outros casos, a transcrição é regulada por sinais presentes durante a interação planta-patógeno (Yang et al., 2005).

O o transcrito do gene *xghCp* foi detectado por RT-PCR, em pH 4,0, 6,8 e 8,0, nas fontes de carbono pectina cítrica, glicose e na mistura glicose com pectina. Os resultados mostram que não houve repressão por glicose na concentração de 1%. Em *Fusarium moniliforme*, glicose 0,2% aumentou a produção de poligalacturonase, e em concentração cinco vezes maior, inibiu completamente sua secreção (Niture et al., 2006). Os transcritos foram detectados em pectina pH 4,0, 6,8 e 8,0 (Figura 4).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramoff, M. D., Maqelhages P.J., Ram, S.J.: Image processing with image J. *Biophotonics Int.* 11 (2004) 36-42.
- Akimitsu, K.A., Peever, T.L. and Timmer, L.W.: Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Mol Plant Pathol* 4 (2003) 435-46.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 3389-402.
- Armand, S., Wagemaker, M. J. M., Sanchez-Torres, P., Kester, H. C. M., van Santen, Y., Dijkstra, B. W., Visser, J., and Benen, J. A. E. The active site topology of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II as studied by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 275 (2000) 691-6.
- Benton W.D., Davis R.W.: Screening of lambda gt recombinant clones by hibridization to single plaques in situ. *Science* 196 (1977) 180-183.
- Cotton, P., Kasza, Z., Bruel, C., Rasclé, C. and Fevre, M.: Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol Lett* 227 (2003) 163-9.
- Federici, L., Di Matteo, A., Fernandez-Recio, J., Tsernoglou, D. and Cervone, F.: Polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity? *Trends Plant Sci* 11 (2006) 65-70.
- Felipe, M.S.S., Azevedo, M.A, Vainstein, M.H, Scharank, A. : *Biologia Molecular de fungos filamentosos: construção de banco genômico e de cDNA. Manual Técnico.* In. Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz". (1992) p.99.
- Gotesson, A., Marshall, J.S., Jones, D.A. and Hardham, A.R.: Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. *Mol Plant Microbe Interact* 15 (2002) 907-21.
- Griffith, G.W., Nicholson, J., Nenninger, A., Birch, R.N., Hedger: J.N.: Witches' broom and frosty pods in cacao. *New Zealand J Bot* 41 (2003) 423-35.
- Kasturi, L., Chen, H. and Shakin-Eshleman, S.H.: Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify

- Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem J* 323 (Pt 2) (1997) 415-9.
- Kester, H.C., Benen, J.A. and Visser, J.: The exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis* is also active on xylogalacturonan. *Biotechnol Appl Biochem* 30 (Pt 1) (1999) 53-7.
- Kilaru, A., Hasenstein, K. H.: Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis Perniciosa* on interaction with Cacao leaves. *Biochem Cell Biol* 95 (2005) 1010-17.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M.: MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5 (2004) 150-63.
- Li, D., Ashby, A.M. and Johnstone, K.: Molecular evidence that the extracellular cutinase Pbc1 is required for pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on oilseed rape. *Mol Plant Microbe Interact* 16 (2003) 545-52.
- Markovic, O. and Janecek, S.: Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. *Protein Eng* 14 (2001) 615-31.
- Martens-Uzunova, E.S., Zandleven, J.S., Benen, J.A., Awad, H., Kools, H.J., Beldman, G., Voragen, A.G., Van den Berg, J.A. and Schaap, P.J.: A new group of exo-acting family 28 glycoside hydrolases of *Aspergillus niger* that are involved in pectin degradation. *Biochem J* 400 (2006) 43-52.
- Niture, S.K., Kumar, A.R., Parab, P.B. and Pant, A.: Inactivation of polygalacturonase and pectate lyase produced by pH tolerant fungus *Fusarium moniliforme* NCIM 1276 in a liquid medium and in the host tissue. *Microbiol Res* (2006).
- Parenticova, L., Benen, J.A., Kester, H.C. and Visser, J.: pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *Biochem J* 345 Pt 3 (2000) 637-44.
- Redgwell, R.J. and Hansen, C.E.: Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *Planta* 210 (2000) 823-30.
- Redgwell, R. J., V. Trovato, and D. Curti.: Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions. *Food Chemistry* 80 (2003) 511-16.

- Redgwell, R., V. Trovato, S. Merinat, D. Curti, S. Hediger, and A. Manez.:2003. Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides. *Food Chemistry* 81 (2003) 103-12.
- Rozen, S. and Skaletsky, H.: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132 (2000) 365-86.
- Sakamoto, T., Bonnin, E., Quemener, B. and Thibault, J.F.: Purification and characterisation of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. *Biochim Biophys Acta* 1572 (2002) 10-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.:Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).
- Sanger, F., Nicklen, S. and A.R., Coulson: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5463-7.
- Santos, J. K., Isolamento, caracterização e regulação de genes que codificam pectato liase em *Crinipellis pernicioso*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao*). 2006. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa. 121p
- Specht, C.A., DiRusso, C.C., Novotny, C.P. and Ullrich, R.C.: A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal Biochem* 119 (1982) 158-63.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 4673-80.
- ten Have, A., Breuil, W.O., Wubben, J.P., Visser, J. and van Kan, J.A.: *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. *Fungal Genet Biol* 33 (2001) 97-105.
- Unkles,S.E.:Gene organization in industrial filamentous fungi, In *Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi*. Ed J.R. Kinghorn & G. Turner, Chapman & Hall, London. (1992) pp. 28-53.
- van der Vlugt-Bergmans, C.J., Meeuwssen, P.J., Voragen, A.G. and van Ooyen, A.J.: Endo-xylogalacturonan hydrolase, a novel pectinolytic enzyme. *Appl Environ Microbiol* 66 (2000) 36-41.
- Varley, D.A., Podila, G.K. and Hiremath, S.T.: Cutinase in *Cryphonectria parasitica*, the chestnut blight fungus: suppression of cutinase gene

expression in isogenic hypovirulent strains containing double-stranded RNAs. *Mol Cell Biol* 12 (1992) 4539-44.

Vorwerk, S., Somerville, S. and Somerville, C.: The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci* 9 (2004) 203-9.

Walton, J.D.: Deconstructing the Cell Wall. *Plant Physiol* 104 (1994) 1113-8.

Williams, H.L., Tang, Y. and Hintz, W.E.: Endopolygalacturonase is encoded by a multigene family in the basidiomycete *Chondrostereum purpureum*. *Fungal Genet Biol* 36 (2002) 71-83.

Wubben, J.P., Mulder, W., ten Have, A., van Kan, J.A. and Visser, J.: Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* 65 (1999) 1596-602.

Wubben, J.P., ten Have, A., van Kan, J.A. and Visser, J.: Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Curr Genet* 37 (2000) 152-7.

Yang, Z., Rogers, L.M., Song, Y., Guo, W. and Kolattukudy, P.E.: Homoserine and asparagine are host signals that trigger in planta expression of a pathogenesis gene in *Nectria haematococca*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 4197-202.

Zandleven, J., Beldman, G., Bosveld, M., Benen, J. and Voragen, A.: Mode of action of xylogalacturonan hydrolase towards xylogalacturonan and xylogalacturonan oligosaccharides. *Biochem J* 387 (2005) 719-25.

CAPÍTULO II

Caracterização dos genes relacionados ao pH: *pacC* e *paIA* de *Crinipellis perniciosa*, agente causal da vassoura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao*)

1. RESUMO

O fungo *Crinipellis pernicioso* é o agente causal da vassoura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao*), que é a doença mais devastadora encontrada nesta cultura. Além do cacauero, *C. pernicioso* é capaz de infectar outras plantas hospedeiras, tendo sido descritos diferentes biótipos. Durante o desenvolvimento da doença, diferentes enzimas são produzidas, sendo que o controle da síntese e secreção envolve tanto proteínas receptoras, que são capazes de detectar as características do ambiente em que o fungo se encontra, quanto reguladores específicos capazes de ativar ou desativar a transcrição de genes, cujos produtos são necessários ao desenvolvimento da doença. Neste trabalho foi realizada a clonagem e caracterização dos genes *palA* e *pacC*, relacionados à transdução de sinal em resposta ao pH em *C. pernicioso*. A transcrição do gene *palACp* não é regulada por pH e a proteína deduzida apresentou o domínio conservado BRO1. A análise filogenética mostrou que esta proteína é conservada de fungos a humanos. Foram seqüenciados 4.347 pb correspondentes ao gene *pacCCp*, que apresentou uma ORF de 2.472 pb interrompida por 8 íntrons putativos. Na região promotora, foram localizados três possíveis sítios de reconhecimento para PacC (5'GCCAG3'), o que sugere um sistema de auto-indução deste gene em pH alcalino. Os transcritos do gene *pacCCp* foram detectados por RT-PCR em pH 6,8 e 8,0 em 8, 18 e 32 horas após a indução. Em pH 4,0, foi observada a transcrição basal no período de 8 a 32 horas. A seqüência deduzida apresentou 824 aminoácidos, com domínios dedos de zinco extremamente conservados em leveduras e fungos filamentosos. Motivos de reconhecimento proteína-proteína YPXL/I de interação com PalA foram localizados na região C-terminal da proteína PacCCp entre os aminoácidos 637 e 742. A identificação dos genes *pacCCp* e *palACp* sugere que *C. pernicioso* apresenta a cascata de sinalização em resposta ao pH.

2. INTRODUÇÃO

Crinipellis perniciosa é o agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro (*Theobroma cacao*). Este fungo apresenta ciclo de vida hemibiotrófico, que se caracteriza por uma fase biotrófica monocariótica, seguindo-se uma fase necrotrófica dicariótica. Além do cacauzeiro, *C. perniciosa* é capaz de infectar outras plantas hospedeiras, tendo sido descritos diferentes biótipos. O biótipo C infecta espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania* sendo o principal responsável por perdas econômicas na cultura do cacau; o biótipo S está associado a sintomas de vassoura-de-bruxa em várias espécies da família *Solanaceae*; e o biótipo L é saprófita sendo encontrado em lianas, mais especificamente na espécie *Arbidaea verrucosa* (Griffith & Hedger, 1994; Griffith et al., 2003).

Os microrganismos possuem a capacidade de adaptar-se ao pH do ambiente. Um dos aspectos dessa adaptação, particularmente importante para os organismos que crescem sobre ampla variação de pH é a capacidade de expressão gênica adequada ao ambiente (Arst & Peñalva 2003; Peñalva & Arst, 2004).

Em fungos filamentosos, o *pacC* é o principal gene responsável pela regulação em resposta ao pH. A proteína PacC liga-se ao DNA no cis-elemento 5'-GCCAAG-3', que está presente, em número variável, nas regiões promotoras de todos os genes regulados por esta proteína. As análises de mutantes específicos demonstraram a importância do cis-elemento, em que a substituição de bases resultou em substancial ou completa perda de ligação, exceto a adenina 5 (parcialmente trocada por G). Um T, precedendo o hexanucleotídeo, aumentou a ligação (Espeso et al., 1997).

A proteína PacC é sintetizada em sua forma inativa denominada PacC⁷², que sofre processamento pós-traducional por meio de dois passos proteolíticos para ativação em condições de pH alcalino. O primeiro passo é dependente do pH com formação do PacC⁵³, uma forma intermediária entre a forma ativa PacC²⁷ resultante do segundo passo proteolítico. O polipeptídeo com 27 kDa

contém cerca de 250 resíduos da região N-terminal de PacC que inclui os três dedos de zinco (Arst & Peñalva 2003; Peñalva & Arst, 2004).

A proteína PacC atua em resposta a uma cascata de sinalização, em que os componentes são codificados por seis genes, *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH*, *palI*, destes, os dois últimos são proteínas transmembrana capazes de perceber o pH externo. Os produtos dos genes *palC* e *palF* ainda não possuem um papel claro na cascata de sinalização. A transdução de sinal, mediada por pH, culmina na clivagem do fator de transcrição PacC para a sua forma ativa, e para que isto ocorra, a proteína PalA liga-se a dois motivos YPXL/I localizados em cada lado da região de sinalização para a protease. Adicionalmente, PalA interage com Vps32/Snf7 e recruta a proteína PalB, que é uma cisteína protease (Caddick et al., 1986; Denison et al., 1995; Xu & Mitchell, 2001; Arst & Peñalva, 2003; Vincent et al., 2003; Herranz et al., 2005; Tilburn et al., 2005).

PalA, Bro1 e Alix (ALG-2) são membros de um grupo de proteínas, caracterizadas por possuir o domínio BRO1. Eles são componentes de rotas de transdução de sinal que é encontrado de fungos a mamíferos. Uma característica comum a PalA, Bro1 e seus homólogos é a habilidade para interagir com proteínas do ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required of Transport). O homólogo humano de Bro1 tem um papel-chave no desenvolvimento de retrovirus, porque ele interage com HIV-1 e outras proteínas retrovirais, as quais contêm o motivo YPXL (Kim, et al., 2005; Odorizzi, 2006; Hurley & Emr, 2006).

O fato da transdução de sinal ocorrer, apenas, em pH alcalino é bastante intrigante, uma vez que nenhum dos seis genes *pal* tem mostrado evidência de regulação por pH; assim sendo, a resposta ao pH deve ocorrer após a transcrição (Díez et al., 2002; Espeso & Arst, 2000; Rollins, 2003; Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005).

Muitos fungos modificam ativamente o pH do ambiente pela excreção de ácidos orgânicos, como os ácidos oxálico, cítrico e glucônico, que efetivamente acidificam o meio. Outros alcalinizam o tecido do hospedeiro pela secreção de amônia (Akimitsu et al., 2004; Prusky & Yakoby, 2003; Prusky et al., 2004). Os

resultados das pesquisas de Prusky et al. (2001) sugerem que a excreção de amônia é uma importante condição para a virulência.

Os fungos fitopatogênicos vêm sendo estudados no que diz respeito ao pH ambiental e seu processo funcional ligado à virulência. Em *Botrytis cinerea*, é requerida a expressão coordenada de uma grande quantidade de enzimas, que são necessárias à degradação da camada protetora das células da planta e à defesa química, como as poligalacturonases, pectina metilesterase, proteases e lacases (Manteau et al., 2003; Rollins & Dickman, 2001). Os genes que codificam estas enzimas normalmente estão sujeitos ao controle em resposta ao pH.

Para estudar, funcionalmente, o gene *pac1* de *Sclerotinia sclerotiorum* (homólogo a *pacC/Rim101*) Rollins (2003) obteve, por troca gênica, mutantes com perda da função. Os mutantes *pacC1* apresentaram crescimento micelial normal em pH ácido; entretanto, esse crescimento foi inibido com o aumento do pH. A produção de ácido oxálico permaneceu responsiva ao pH alcalino e a acumulação foi intensamente alterada.

No fitopatógeno *Ustilago maydis* foi isolado um mutante *pacC⁻*, que mostrou um fenótipo pleiotrópico com alteração na morfogênese, redução na produção de protease e aumento na sensibilidade a Na⁺ e Li⁺. Outras características fenotípicas não reportadas, previamente, em mutantes *pacC*, tais como mudanças morfológicas, aumento da sensibilidade a enzimas líticas e aumento da secreção de polissacarídeos, foram também reportadas nesse mutante (Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005).

Bignell et al. (2005) estudaram a virulência em resposta ao pH na patogênese de doenças pulmonares causadas por *Aspergillus*. Mutantes para o fator de transcrição PacC tiveram a rota de transdução de sinal bloqueada ou ausência do processamento proteolítico, atenuando severamente a virulência. As infecções, causadas por esse mutante, são caracterizadas pelo crescimento limitado *in vivo* e redução na infiltração celular inflamatória, em contraste com a ativação constitutiva do fator PacC que causa aumento na mortalidade devido ao crescimento invasivo. Os autores concluíram, portanto, que o PacC é

requerido para aumentar a virulência na patogênese pulmonar. Esse foi o primeiro estudo, demonstrando que a expressão gênica regulada por pH e intermediada pelo fator de transcrição PacC são essenciais para a aspergilose pulmonar. Além disso, estabeleceu que ambos, o processamento de PacC e a sinalização mediada por pH são requeridos para promover processos integrados a patogenicidade e que a ativação constitutiva de *pacC* aumenta a virulência.

O pH é um sinal de relevância fisiológica demonstrada em candidíase vaginal, em que a virulência do mutante de *Candida albicans*, que perdeu a resposta regulatória ao pH, é atenuada e mutantes para o homólogo de *pacC* (*Rim101*) apresentam significativa redução na virulência (De Bernardis et al., 1998; Davis et al., 2000).

Em *Fusarium oxysporum*, a expressão do gene *pacC* foi elevada em condições de crescimento alcalino e quase imperceptível em condições ácidas. A obtenção de mutantes com “fenótipo ácido”, ou seja, que expressam genes que são normalmente transcritos em pH ácido, resultou em baixo crescimento em pH alcalino, aumento na atividade de protease ácida e alto nível de transcrição de genes de poligalacturonases. Os merodiplóides PacC^c apresentaram alto nível de transcrição do gene *pacC*, mesmo em pH ácido, reduzida produção de fosfatase ácida e aumento na atividade de proteases alcalinas, conforme esperado. O mutante PacC^{+/-} apresentou um aumento na virulência, em relação ao selvagem, enquanto o mutante constitutivo apresentou significativa redução na virulência. Desse modo, os autores propuseram que PacC atuaria como um regulador negativo de virulência, possivelmente por meio da repressão da transcrição de genes expressos em pH ácido, importantes na infecção (Caracuel et al., 2003).

A relação virulência versus PacC depende da espécie de fungo analisada, devido a seguinte razão: os mutantes em *C. albicans* não são patogênicos; em *U. maydis*, não há diferença entre os mutantes e o selvagem no que diz respeito a patogenicidade; em *F. oxysporum*, os mutantes são mais virulentos do que o selvagem e em *S. sclerotiorum* e *Aspergillus*, os mutantes

mostram virulência reduzida (De Bernardis et al., 1998; Davis et al., 2000; Caracuel et al., 2003; Rollins, 2003; Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005; Bignell et al., 2005).

Devido à importância da cascata de sinalização em resposta ao pH em diferentes fungos patogênicos, este trabalho teve como objetivos isolar e caracterizar os genes que codificam PacC e PalA em *C. perniciosus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo e condições de cultivo

O isolado de *Crinipellis pernicioso* utilizado neste trabalho foi CP02 (biótipo C, Itabuna-Ba, Este isolado foi cultivado em BDA (batata dextrose ágar) a 27°C, por 8 dias.

3.2. Clonagem dos genes *palACp* e *pacCCp*

Seqüências presentes no banco de dados do projeto genoma da vassoura-de-bruxa (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura) com homologia aos genes que codificam o fator de transcrição PacC e a proteína PalA foram utilizadas para desenhar oligonucleotídeos iniciadores. Por meio do programa *Primer3* (Rozen & Skaletsky, 2000) foram desenhados dois pares oligonucleotídeos iniciadores que amplificam fragmentos de 278 pb (*pacCCp*) e de 2300 pb (*palACp*). Os produtos das amplificações foram clonados no vetor pGEM T-Easy (Promega) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Os fragmentos de DNA clonados foram seqüenciados para confirmação da identidade e utilizados para o isolamento dos respectivos genes do banco genômico construído em lambda EMBL3 (Stratagene) por Santos (2006). A metodologia de hibridização de DNA em placas de lise, descrita por Benton e Davis (1977) foi utilizada para a detecção e isolamento dos fagos recombinantes. As sondas utilizadas foram marcadas com o Kit “Gene Images Random Prime Labelling Module” (Amersham Pharmacia Biotech). Para detecção dos fragmentos que hibridizaram com as sondas foi utilizado o Kit “CDP-Star™ Detection Module” (Amersham Pharmacia Biotech). As hibridizações foram realizadas à temperatura de 65°C durante 16 horas e as membranas foram lavadas duas vezes em SSC 2X, SDS 0,1% a 60°C durante 20 minutos cada e uma vez em SSC 1X, SDS 0,1%, a 65°C durante 10 minutos. Para confirmação dos sinais

positivos, diluições de cada fago recombinante isolado foram utilizadas na realização de novas hibridizações sob as mesmas condições. As membranas foram colocadas em contato com filme XOMAT K (Kodak) e reveladas após 24 horas em exposição.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores usados no estudo do gene *pacC* de *C. perniciosus*

Oligonucleotídeos	Seqüências (5'- 3')
Pac F	GGGCGCAAGAGTACCAATAA
Pac R	TCCTGAGGACGCTTGAAAGA
Pac2F	CCTTTTCATATCCATTTCTCACT
Pac2R	AGGATTCATCCTTCTCTTTGTCAT
PacR 130	GATATTACCAGCGTTGGGAA
PacR 1201	AGGACATTTTGATGGCAAGTGC
PacF 2005	CATCATTACCCTCACCAATCTCCA
PacF 1398	GCGTGGATGACTTTTTTACAGA
Pac F 3085	TCCACGTCTTCTCTACAATCAC
PacF 3480	GGTGGGACATATGGAGCTCATT
CPRDNA1	ACTGCGAGTGAAGAGGGAAA
CPRDNA2	AACCGCCGTATACGACAAAG

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores usados no estudo do gene *palA* de *C. perniciosus*

Oligonucleotídeos	Seqüências (5'- 3')
palA F	ACGTCGGACCAGAAACATTCAT
palA R	TCAAACATGACGGGTTGA
palA 89F	CCAGAGGATGAAGAAAGACCAC
palA 890R	GCTCCGTAAAATATCACCTGCT
palA R1	TGAATACAATTGATGCCCTTTTGA
palA R2	CTTGACAGCCTTCATTCCGAAC
CPRDNA1	ACTGCGAGTGAAGAGGGAAA
CPRDNA2	AACCGCCGTATACGACAAAG

3.3. Extração e caracterização dos fragmentos de DNA dos fagos recombinantes

A extração de DNA dos fagos recombinantes positivos foi realizada, conforme descrito por Felipe et al. (1992). Os DNAs extraídos foram clivados com as enzimas de restrição *Apa* I, *Sac* I, *Sac* II para *pacCCp* e *Apa* I, *EcoR* I, *Hind* III e *Kpn* I para *palACp*. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, transferidos para membrana de náilon (Duralon-Stratagene) e hibridizados com a mesma sonda utilizada na seleção dos fagos. Os fragmentos de DNA correspondentes aos genes foram clonados no vetor pBluescript II KS+ (Stratagene®), previamente clivado com a mesma enzima. Para completar a seqüência do gene *pacC* foi usado PCR inverso (IPCR) utilizando os oligonucleotídeos PacR 130 e PacF 3085 (Tabela 1). O DNA do fago foi clivado com *Sac* II e circularizado, usando-se T4 ligase (Figura 1). A amplificação foi realizada com PCR Kit Advantage 2 da Clontech, segundo as recomendações do fabricante. Um fragmento de aproximadamente 4,3 kb foi seqüenciado utilizando os oligonucleotídeos PacF 3085 e 3480 (Tabela 1).

O gene *palACp* foi clonado por PCR inverso a partir do DNA do fago *palACp* digerido com *Hind* III. O DNA foi ligado usando T4 ligase a 16°C e utilizado como molde em PCR, usando os oligonucleotídeos *palAR1* e *palAR2* (Figura 2 B). A amplificação foi realizada com PCR Kit Advantage 2 da Clontech segundo recomendações do fabricante. Um fragmento de aproximadamente 2,3 kb foi clonado no vetor pGEM T-Easy (Promega), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

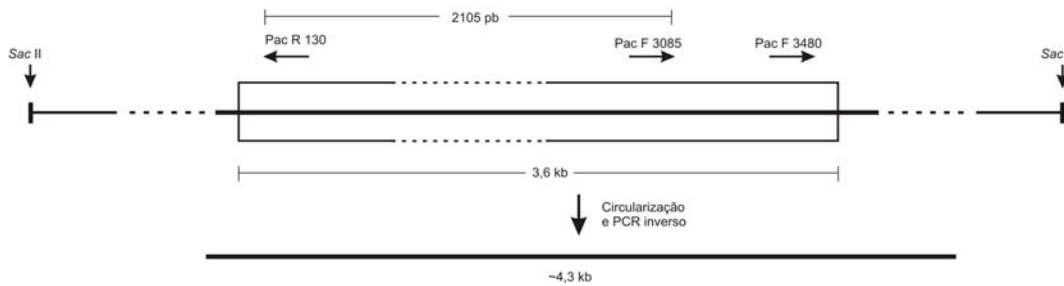


Figura 1. Esquema do PCR inverso usado para amplificar parte do gene *pacCCp*. Os oligonucleotídeos PacR 130 R1 e PacF 3085 foram usados para amplificação das extremidades do gene *pacCCp*, a partir do DNA do fago circularizado após clivagem com *Sac* II.

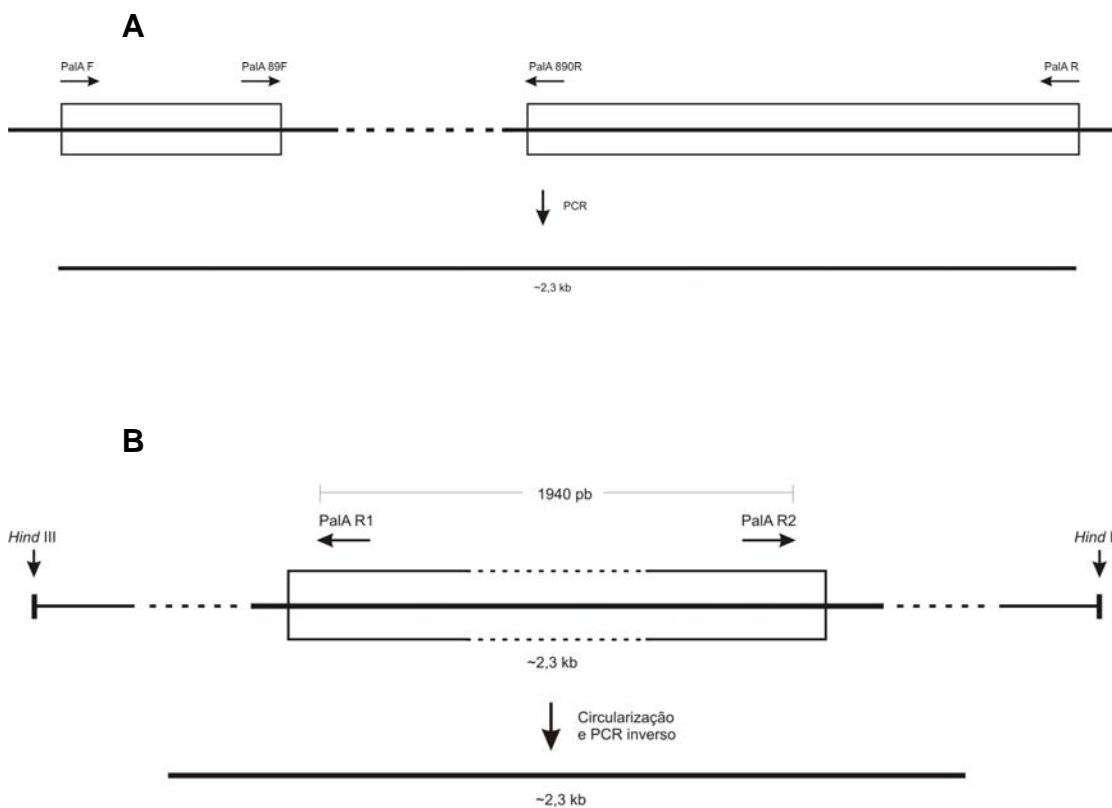


Figura 2. Esquema da amplificação de parte do gene *palACp*. **A.** Os retângulos representam os dois fragmentos do gene *palACp*, encontrados no banco de dados do projeto genoma da vassoura-de-bruxa. As setas mostram as direções de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores, empregados na clonagem e sequenciamento de parte do gene *palACp* (Tabela 2). **B.** Esquema do PCR inverso. Os oligonucleotídeos *palA* R1 e *palA* R2 (Tabela 2) foram usados para amplificação das extremidades do gene *palACp*, a partir do DNA do fago circularizado, após clivagem com *Hind* III.

3.4. Sequenciamento e análise das seqüências

O seqüenciamento de DNA foi realizado, utilizando-se o seqüenciador MegaBACE 500 DNA Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech Limited) pelo método de terminação de cadeia por dideoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977). As seqüências de DNA resultantes foram analisadas por meio da ferramenta BLAST Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul et al., 1997). Subseqüentes análises das seqüências de DNA e das proteínas foram realizadas no programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994), enquanto a análise filogenética foi realizada no programa MEGA3 (Kumar et al., 2004).

Os códigos de acesso das seqüências utilizadas na análise da proteína PalA foram: Rim20p *Yarrowia lipolytica* (XP_503059); Rim20p *Debaryomyces hansenii* (XP_460839); Rim20p *Candida albicans* (AAD51716); PalA *Aspergillus oryzae* (BAD83606); PalA *Aspergillus terreus* (XP_001214761); PalA *Aspergillus fumigatus* Af293(XP_752184); PalA *Aspergillus nidulans* (XP_408488); PalA *Magnaporthe grisea* (XP_368411); PalA *Neurospora crassa* (XP_959867); PalA *Cryptococcus neoformans* (XP_571758); PalA *Ustilago maydis* (XP_401494); ALIX (Apoptosis-linked gene 2 interacting protein X) *Caenorhabditis elegans* (NP_001022713); ALIX *Caenorhabditis elegans* (NP_001022714); PrCD (programmed cell death) *Aedes aegypti* (EAT36654); PrCD *Danio rerio* (NP_998525); PrCD *Xenopus laevis* (Q9W6C5); PrCD *Gallus gallus* (XP_418826); PrCD *Mus musculus* (AAH26823); ALG2 *Mus musculus* (Q9WU78); ALG2 *Rattus norvegicus* (XP_001076624); ALG2 *Rattus norvegicus* (XP_343495); PrCD *Canis familiaris* (XP_858504); PrCD *Canis familiaris* (XP_534215); PrCD *Pan troglodytes* (XP_001169526); ALG2 *Homo sapiens* (AAF08220); PrCD *Homo sapiens* (NP_037506); A LG-2 *Dictyostelium discoideum* (XP_643566); BRO1 *C. neoformans* (XP_571916); BRO1 *U. maydis* (Q4PHA8); BRO1 *Emericella nidulans* (AAR02857); Bro1 *A. fumigatus* (EAL93470); e PalA de *Crinipellis perniciososa* (ainda não depositada no NCBI).

Os códigos de acesso, utilizados na análise da proteína PacC, foram: proteína hipotética de *Coprinopsis cinerea* (EAU92749); PacC *Cryptococcus neoformans* (XP_572292); PacC *Ustilago maydis* (CAG34353); Rim 101 *Kluyveromyces lactis* (XP_453982); Rim 101 *Saccharomyces cerevisiae* (NP_011836); PacC *Acremonium chrysogenum* (Q96X49); PacC *Gibberella moniliformis* (Q873X0); PacC de *Neurospora crassa* (Q7RVQ8); PacC *Fusarium oxysporum* (Q870A3); PacC *Emericella nidulans* (Q00202); PacC *Sclerotinia sclerotiorum* (Q9P413); PacC *Aspergillus oryzae* (Q9HFB3); PacC *Gibberella fujikuroi* (Q8J1U9); PacC *Trichophyton rubrum* (Q9C1A4); PacC *Aspergillus niger* (Q00203); PacC *Botryotinia fuckeliana* (AAV54519); PacC *Aspergillus giganteus* (Q5XL24); PacC *Penicillium chrysogenum* (Q01864); PacC *Aspergillus fumigatus* Af293 (XP_754424) e PacC de *C. perniciosus* (ainda não depositada).

3.5. Extração de RNA total e análise por RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction)

Discos de micélio de *C. perniciosus* do isolado CP02 foram inoculados em BDA a 27 °C por 10 dias. Após esse período, 10 discos de micélio de 7 mm foram cortados em pequenos fragmentos e transferidos para Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio mínimo tamponado em pH 6,8 (KH₂PO₄ 6,8 g, K₂HPO₄ 8,6 g, KNO₃ 6,0 g, KCl 0,52 g; FeSO₄ 0,01 g; ZnSO₄ 0,01 g; glicose 10 g; água destilada 1 L) e incubados a 27°C, com agitação a 250 rpm, durante um período de 8 dias, a fim de obter massa micelial. Após esse período, os micélios foram lavados, recuperados, e transferidos para meios contendo 1% de pectina, glicose, pectina + glicose ou extrato da polpa de cacau.

Para avaliação do efeito do pH na transcrição dos genes *paACp* e *pacCCp*, foi realizada a transferência do micélio para meios contendo 1% de pectina cítrica, preparados em tampão citrato pH 4,0, citrato-fosfato 6,8 e tampão fosfato de sódio pH 8,0. O RNA total foi extraído nos tempos de 8, 18 e

32h após a transferência, de acordo com o protocolo disponibilizado no endereço eletrônico www.tigr.org/tdb/potato/microarray_SOPs.shtml. O RNA total extraído foi checado em gel de agarose 1% e sua pureza e quantificação foram determinados a 260 nm, utilizando-se o Programa RNA Quantify and Purity Check do espectrofotômetro Pharmacia Biotech. Ultraspec^R 3000.

A identificação dos transcritos dos genes foi realizada por RT-PCR. Foram realizadas as reações de transcrição reversa, para síntese das primeiras fitas de cDNA, empregando-se o kit ImPromTM II (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Em cada reação de RT, utilizaram-se 5 µg de RNA total, previamente, tratado com Dnase RQI Rnase Free (Promega).

A amplificação da região correspondente ao *rDNA* 28S de *C. pernicios*a, foi utilizada como controle, sendo as reações realizadas com 1 µL de cDNA e os oligonucleotídeos CPRDNA1 e CPRDNA2 (Tabela 1), que amplificam um fragmento de 495 pb. As condições de amplificação foram: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C e 1 minuto a 72°C.

A análise da transcrição do gene *pacCCp* foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos Pac2F e Pac2R (Tabela 1), que amplificam um fragmento de 901 pb do DNA genômico interrompido por 2 íntrons, gerando um produto de 786 pb do cDNA. A análise da transcrição de *paIACp*, em diferentes pHs, foi realizada por utilizando-se os oligonucleotídeos paIA89R e paIAR (Tabela 2), que amplificam 1.856 pb do DNA genômico e 1.361 pb do cDNA. As condições de amplificação foram: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 68°C com 39 ciclos para o RT-PCR. Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e caracterização do gene *palACp*

Duas seqüências correspondentes ao gene, que codifica a proteína PalA de *C. perniciosus*, foram localizadas no banco de dados do projeto genoma da vassoura-de-bruxa. A primeira seqüência, apresentando 932 pb, codifica à porção amino terminal da proteína PalA de *Cryptococcus neoformans* (69 ao 207aa) e a segunda com 1751 pb é referente aos aminoácidos 248 a 699. Um fragmento de aproximadamente 2,3 kb do gene *palACp* (Figura 2) foi amplificado com os oligonucleotídeos palAF e palAR (Tabela 2), desenhados a partir das seqüências clonadas no vetor pGEM T-Easy (Promega) (Figura 2A). Este plasmídeo recombinante foi utilizado no isolamento dos fagos de um banco genômico. Três fagos positivos foram clivados com as enzimas *Apa* I, *EcoR* I, e *Hind* III e revelaram o mesmo perfil de bandas. O gene completo foi obtido por PCR inverso, utilizando-se os oligonucleotídeos palAR1 e palAR2 (Tabela 2 e Figura 2B). A seqüência do gene *palACp*, obtida até o momento, possui 12 íntrons putativos (Figura 3) e a proteína deduzida 627 aa, que apresenta o domínio BRO1 (Figura 4).

Pesquisa em banco de dados de proteínas, com a seqüência de aminoácidos deduzida da proteína PalACp, revelou alta similaridade com a proteína Rim20 de leveduras, PalA e BRO1 de fungos filamentosos ascomicetos e basidiomicetos, bem como os homólogos ALIX (Apoptosis-Linked gene 2 Interacting protein X) e ALG2 (Apoptose Linked Gene-2) de mamíferos.

A análise filogenética da proteína deduzida separou basidiomicetos e ascomicetos, dentro deste, levedura e fungos filamentosos foram separados em diferentes clusters. Como se observa na Figura 6, a análise filogenética separa, claramente, os grupos distintos, conforme mostrado, na seta ao lado da árvore, que também indica o aumento da complexidade evolutiva dos grupos de *Candida albicans* ao *Homo sapiens*.

A transcrição do gene *paIACp* foi avaliada em pH 4,0, 6,8 e 8,0 durante 32 horas (Figura 5). O transcrito foi detectado tanto em pH ácido quanto alcalino, não demonstrando regulação em resposta ao pH.

1 AAGACAGCTTTCCCTGCTTATGACTCTAGAGGATCCCAGTCAATCAATTAGAAAACCTGAC
61 TTCTGCCAGGTATCACGCCAGCTAACTTCTGTTCTCGCAAATGCCAGCCGAT~~**gtgcg**~~
121 ~~**tg**~~ggaatatacgtcggaccagaaacattcatatataagagaaatc~~**tag**~~ATTTCGATTGGATA
181 TTGCATATGCACCCGATTCTCGCCGTCAGCGCTACCCATAACACTAAGAAACCTCGTTT
241 TCGAAAGGGCATCAATTGTATTCAATCTAGCCGCATTGTATTCTCAACTAGCGGCGGCGG
301 AAGATCGCTCCCATGGAGATGGAATCAAACGCGCTGGAGGGTGTATCAG~~**gtgagct**~~gaa
361 ctatthttatcaccctctttcaatatccacattcgtgttact~~**cag**~~AACGCGTCAGGGTCTT
421 TACAATACTTGAGGACTGAGGTGCTTCCAAAGCTCATATTCTCCCCAGAGGATGAAGAAA
481 GACCACTAGACCTATCTGTCCCTTCGTTTCATGCCTTGGAAATGGTTCCTTGCTTGCTCAGG
541 CTCAAGAGTGTACTGGCAGAAGGCACGACTCGGTATTCAATTCGCCCCGTCATTTACGCG
601 agcggaaacggcactgacaaatgctctgtcactttcacagataactacaaaaat~~**gctctgaa**~~
661 taccaaacttgagccagtgtacgtcctatgcccaggttaacttgacatatgactggaatg
721 ttttaaaa~~**aag**~~GCGTCTAAACTGTATCAAACGCGATGGCGGCCATCCgagaggcttcccc
781 TCCAGTCAAACACCTTTTTCCAAACGTAAGTGCAGGATGCCCGTCTCATCTGGGATTCTTA
841 acagtgtttgacagGATTGGCTGGCACATATCGAAGCGAAGCAGCACCACCTTTGAAGCGG
901 TCGCCCTTTATCGCAAAGTAGAGACGAACTAGAGACTAGCAGGtgatattttacggagc
961 ccttacgtgctgtagtattgatggaacttattagGTACGGCTACGAATTGGCATATCTGG
1021 CACAAGCGCTTTCTGGGGCCAAGAAGGCATATGATATAGCTCGCAAAGGGAAAGTATCAC
1081 CAGCCGTTCTACACGACGTACAG~~**gtgtga**~~tgatttcttaaacgcccgcctttgcggcacg
1141 atgtatctcatactttttttta~~**tag**~~GTATTTCTTGAAGCTGTACAAAAGGACGTTACAAG
1201 AGCTGAGCGTGACAACGATTTAATATATCATCAAGATGTTCCCTGCGTCGTCCGTGCTCCC
1261 ACAGATTGCGCACGCCACAGTCGCTCAGATCACTGTACCAAAGGAGCTAGTCAATCCCAA
1321 TGAAATCGTCGCTAATGAAGACATGTTGTTCTCGGAGTTATTAGGCTGGGGTGCTCGTGA
1381 AGCTATCA~~**gtaagc**~~gcctcaggtgtcctcatctttatggctaactagcgtcccggaaatt
1441 c~~**tag**~~ATATCTACAACGACAGGAGGAAGAATCTAATTCAGGATGAATTGGTACAGTGCTCC
1501 CGCGAAGCTCGAGATCAAGCGGACC~~**agtgagt**~~aattcagatgtattcattttttgcaacac
1561 taatgctatgatt~~**aag**~~AACGTTGCGCGAGCTCAACCTTCCCAGCATCACTAGAAGCCTTAG
1621 AACGTCCATTGGATTACCACCCAGCCTTCTTAAGAAAGCAGAAGAGGTCCGGCTTGAGA
1681 ATGGGCCAGTGAAGATCGAAGCTGCGATCAAGGACCTGCGTAGGTTGGCTCGTCAAACA
1741 ACAAAATTTGACGAGGTGGG~~**gcacac**~~atthttatactgcgtcatttcgccactgatatc
1801 ctgg~~**tag**~~GCAATGGATATTCTTGACCATGAAGCCTCGGAGGATGAGAACACCCGGGCCAC
1861 TATTTCACTCGACCGACCGCTTCTCACGAAG~~**gcaaat**~~gttcacttgattgagaaggaaaa
1921 gcggtatcgccgcatacttgaacaagcccga~~**gag**~~AGTGACGAGACTGTTCGAACAAAATG
1981 GGATCAATGGGAGCAGAATATTACAGAG~~**gttgac**~~gtgggaagaggtcaattcatcgctttg
2041 tccgctaattgga~~**aag**~~ACTTATTTCCCCAACAGGCTGACCTCGAGGCTTCCATACCTTCGA
2101 CTACTATTTCCGCCGGTAGCTCCCTCGCTTCTGATAGTACGGGGAAGCGCGCAAGAAATT
2161 TGAGAGTACTACTCGAACAGCTTGACAGCCTTCAATCCGAACGCGAGGACATTGTCAGGC
2221 GTGCTCAGAAGCTAGCTGAAGTAGATGACATCCAACCCCGGATCGCCAAGGCAGCTGCGG
2281 GCTTTGCACGTTTAGCTGAAGTTCAACCCGTCATGTTTGAAGACATCTCAGACGAGGGAC
2341 TCTCAAATACGACAAATTCATGAAATGGATCAAGGAACACAGCCTCGTCAGGAGGAAC
2401 TACTCAACGCGATCAAG~~**gtgagat**~~gcatctcatttcagaatgatgtgtatattaattgag
2461 gcgatca~~**tag**~~GCGGAAAATGAGTCGTTCTTCAATCACGAAAGGACGATGATAACGTCAA
2521 AGACAGAGAACGTGCATTACAGTCTCTTGATATTTCTGATACCATAAGTACCAGGAGATCAT

Figura 3. Seqüência parcial do gene *palACp*. Os íntrons estão em letras minúsculas e as seqüências consensos em negrito e sublinhado.

A

```

1      RQLSLLMTLE DPSQSIRKLT SARYHAQLTS VLAKLPADIR LDIAYAPVFS PSALPITLRN
61     LVFERASIVF NLAALYSQLA AAEDRSHGDG IKRAGGLYQN ASGSLQYLRT EVLPKLIKIFSP
121    EDEERPLDLS VPFVHALEWF LLAQAQECYW QKARLGIHSP RHLRERNSTD KCLSLSQITT
181    KMRLNCIKTR WRPSDWLAHI EAKQHHEAV ALYRKSDEL ETSRYGYELA YLAQALSGAK
241    KAYDIARKGK VSPAVLHDVQ VFLEAVQKDV TRAERDNDLI YHQDVPASSV LPQIAHATVA
301    QITVPKELVN PNEIVANEDM LFSELLGWGA REAINIYNDR RKNLIQDELV QCSREARDQA
361    DQTLRELNLP ASLEALERPI GLPPSLLKKA EEVRENGPV KIEAAIKDLR RLARQNNKIL
421    DEVGQWIFLT MKPRRMRTPG PLFHSTDRLL TKVTRLFEQN GINGSRILQN LFPQQADLEA
481    SIPSTTISAG SSLASDSTGK RARNLRVLE QLDSLHSERE DIVRRAQKLA EVDDIQPRIA
541    KAAAGFARLA EVQPVMFEDI SDEGLSKYDK FMKWIKELQP RQEELLNAIK AENESFLQSR
601    KDDDNVKDRE RALQSLDISY HKYQEII

```

B

Figura 4. **A.** Seqüência parcial de aminoácidos deduzida da proteína PalACp. **B.** Esquema mostrando o domínio conservado BRO1, que compreende os resíduos de 1-364 com “score” de 39,896.

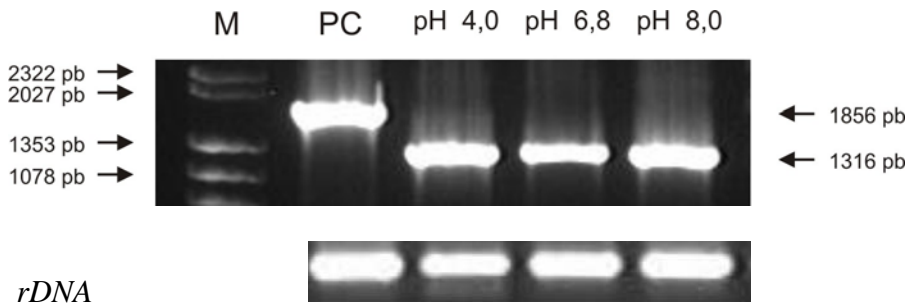


Figura 5. Análise da transcrição do gene *palACp* pela técnica RT-PCR. O fungo foi cultivado em meio de cultura, apresentando pH, 4,0, 6,8, ou 8,0, durante 32 horas. M representa marcador DNA PhyX-174 digerido com *Hae* III e DNA lambda *Hind* III. PC representa a amplificação do DNA genômico, que foi usado como controle positivo. A região correspondente ao *rDNA* 28S foi usada como controle para amplificação do cDNA.

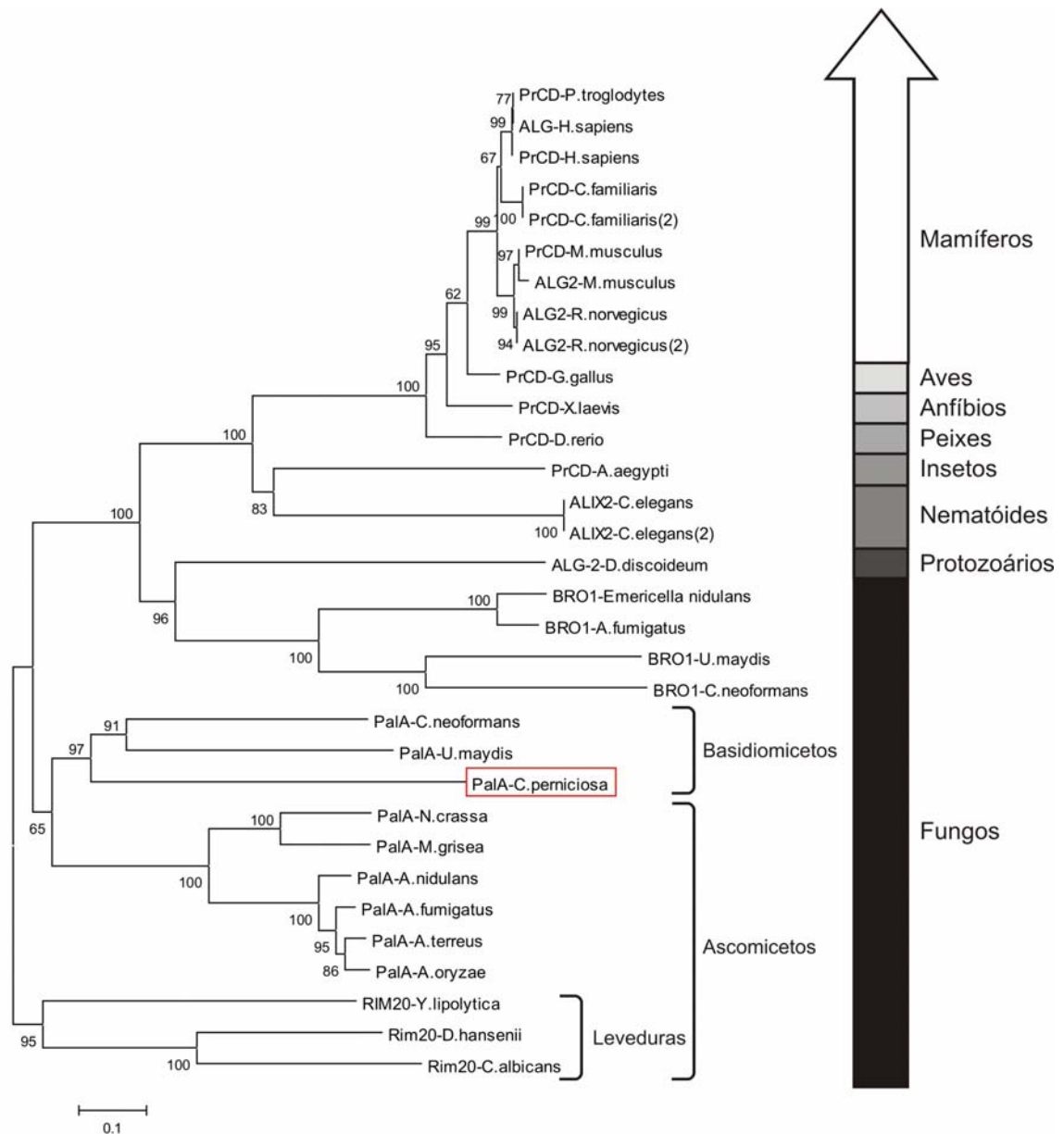


Figura 6- Análise filogenética de PalACp, pelo método da Evolução Mínima (ME) utilizou-se o programa MEGA 3.1 com bootstrap de 1000 réplicas. Os códigos de acesso das seqüências, utilizadas na análise da proteína PalA foram: Rim20p *Yarrowia lipolytica* (XP_503059); Rim20p *Debaryomyces hansenii* (XP_460839); Rim20p *Candida albicans* (AAD51716); PalA *Aspergillus oryzae* (BAD83606); PalA *Aspergillus terreus* (XP_001214761); PalA *Aspergillus fumigatus* Af293(XP_752184); PalA *Aspergillus nidulans* (XP_408488); PalA *Magnaporthe grisea* (XP_368411); PalA *Neurospora crassa* (XP_959867); PalA *Cryptococcus neoformans* (XP_571758); PalA *Ustilago maydis* (XP_401494); ALIX (Apoptosis-linked gene 2 interacting protein X); *Caenorhabditis elegans* (NP_001022713); ALIX *Caenorhabditis elegans* (NP_001022714); PrCD (programmed cell death) *Aedes aegypti* (EAT36654); PrCD *Danio rerio* (NP_998525); PrCD *Xenopus laevis* (Q9W6C5); PrCD *Gallus gallus* (XP_418826); PrCD *Mus musculus* (AAH26823); ALG2 *Mus musculus* (Q9WU78); ALG2 *Rattus norvegicus* (XP_001076624); ALG2 *Rattus norvegicus* (XP_343495); PrCD *Canis familiaris* (XP_858504); PrCD *Canis familiaris* (XP_534215); PrCD *Pan troglodytes* (XP_001169526); ALG2 *Homo sapiens* (AAF08220); PrCD *Homo sapiens* (NP_037506); ALG-2 *Dictyostelium discoideum* (XP_643566); BRO1 *C. neoformans* (XP_571916); BRO1 *U. maydis* (Q4PHA8); BRO1 *Emericella nidulans* (AAR02857); Bro1 *A. fumigatus* (EAL93470); e PalA de *Crinipellis perniciosa* (ainda não depositada no NCBI).

4.2. Isolamento e caracterização do gene *pacCCp*

O gene *pacCCp* foi isolado de um banco genômico construído no fago lambda EMBL3 por meio de triagem, usando-se uma sonda homóloga, obtida pela amplificação de um fragmento de 278 pb correspondente ao domínio dedo de zinco. Um fragmento de 3,6 kb, obtido após a clivagem de um fago recombinante com a enzima *Sac I*, foi clonado no vetor pBluescript II KS+ e seqüenciado, utilizando-se oligonucleotídeos específicos (Tabela 1). O seqüenciamento deste revelou que a porção C-terminal da proteína PacC e a região 3' não codificante do gene não tinham sido clonadas. Para obtenção da seqüência completa, realizou-se PCR inverso (Figura 1).

O fragmento de DNA seqüenciado apresenta 4.347 pb, com uma ORF de 2472 pb interrompida por 8 íntrons putativos (Figura 8). A proteína *PacCCp* deduzida possui 824 aminoácidos, com ponto isoelétrico (pI) de 9,46 e massa molecular de 91,634 kDa, com identidade (35%) e similaridade (44%) com PacC do basidiomiceto *Cryptococcus neoformans* (XP_572292) e 44% e 53% de identidade e similaridade, respectivamente, com uma proteína putativa do também basidiomiceto *Coprinopsis cinerea okayama* (EAU92749).

A região 5' não codificadora possui 1018 pb, contendo um típico TATA box (TATAAA) de eucariotos nas posições (-34 e - 482), e três seqüências CCAAT box em (-110, -192 e -225), que é freqüentemente observada em promotores de fungos. A seqüência 5'ACTCATGGA3' em torno do códon de iniciação ATG, difere da seqüência Kozak (CAMMATGNC), encontrada em fungos filamentosos e em genes de eucariontes. Na região promotora, foram encontrados três possíveis sítios para o fator de transcrição PacC (Figura 8). Na região 3' não codificadora (403 pb), foi encontrado um típico sítio de poliadenilação (AATAAA) 155 pb após o códon de terminação. Esta distância é compatível com aquela encontrada em outros fungos filamentosos. Duas seqüências apresentando o consenso (CWTS) envolvido na terminação da tradução, também propostas como sítios de poliadenilação, foram detectadas

na posição 58 e 136 após o códon de terminação. A seqüência correspondente ao possível sítio de clivagem TAGT foi encontrada na posição 392 (Figura 8).

O alinhamento múltiplo da proteína deduzida PacC de *C. pernicioso* com PacC de fungos filamentosos e da proteína homóloga Rim101p de leveduras indica que a identidade foi maior na região correspondente aos três dedos de zinco (C₂H₂), que se apresenta, extremamente, conservada em todos os organismos analisados (Figura 10). O aminoácido triptofano (W), localizado entre as duas cisteínas no primeiro e no segundo dedo de zinco, é conservado entre todos os organismos estudados. A glicina (Q) e as duas lisinas (K) que precedem a histidina (H) do terceiro dedo de zinco, também são conservadas em todos os organismos e são importantes na localização nuclear (Fernández-Martínez et al., 2003).

Para investigar o efeito do pH na transcrição do gene *pacCCp*, o micélio de *C. pernicioso* foi cultivado em meio mínimo, contendo glicose 1%, em pH 6,8 durante 7 dias e transferido para meio tamponando em pH 4,0, 6,8, e 8,0 e incubado durante 8, 18 e 32 horas. A detecção dos transcritos foi realizada por RT-PCR, utilizando os oligonucleotídeos Pac2F e Pac2R, que amplificam um fragmento de 901 pb a partir do DNA genômico e 786 pb do cDNA (Figura 10). Os transcritos foram observados em pH 6,8 e 8,0, em 8, 18 e 32 horas, e em pH 4,0, foi observada expressão basal em 8 a 32 horas.

Para examinar a relação filogenética com outros fatores de transcrição PacC/Rim101 de fungos filamentosos e leveduras, análise filogenética foi realizada baseada no método da evolução mínima, que separa claramente PacCCp e PacC de outros fungos em grupos distintos (Figura 11). A proteína PacCCp ficou agrupada, juntamente com as demais proteínas de basidiomicetos analisadas e, conforme esperado, é mais proximamente relacionada à proteína de *Coprinopsis cinerea*. Os fungos *C. pernicioso* e *C. cinerea* pertencem a ordem agaricales.

-1018 cccgggaccggaagacttccgccccttgtagcctcccggggggaaattccggaaatcct
-958 ctgcgaaagttgcccctgggaaccgtcctacgcaaaacaagagacgtgaacaagttgctg
-898 naacgcgaccggganaccaagaggaatgaatggccgaaaaatagtccaaattccctgggg
-838 ttttcttcgggggtacaacgcacgagaaaagttcttctctggattaacggtgggaactgaaa
-778 attcggatgaacgatagtttaagacgaggatgtggactgttcttagcagagctggat
-718 taagagagaaaagaatggcgaagaaaatagacgcacgagtggttacaccattgaGCCAGG
-658 cagagaagatgcttagacctattcaatgaaccgattaatgggcacgaagaggggaaggca
-598 aaaaagagacatacagcatgctccgcaacagaaagctgcagtcagcGCCAGGggatcag
-538 caatgttaaaagttaatttgatagatggcaggagaaagagagaaacagagtataagttt
-478 tagcctcatgatgaccggtcgatgaccgtccatcaaaagggatggtacaaggccggttcc
-418 agaggtaccggtggaccaggaaatcgaaaacgtgactctgctggaggccgcgtcaatggc
-358 ggatgctgatgtcgaatcctttttgtcgtcgtcgtcgggctcgtatccagacaggacatg
-298 acgaagcctgagaGCCAAGgtgggtctcacaagaagctcaactcaatacagatgtatca
-238 attatccacaaatcacggcttttccggacctcattaagactacaatccaacaaccgcatc
-178 atgaggtatcgcttcggagtaccactctttgaattggttggtatttgattgaaaacctg
-118 ttacaaattacagaggaactatacagctctgtgacgtttgcagaacactaggacgcgtgct
-58 cccgattccaacgctggtaatatctttctgcaaatccaaactgcccgaccgactcAT
1 M
3 GAGCTTGTTCATGTTAGAGGCATTGTGTCAGGCGCCTGAgtcctactgtcgttgccgctat
2 S L L H V R G I V R R L S
64 tccagtttgaaggtggagggcagCTGTGTAAGTTGATCGGCCCCAGAGAATTTGTCCTTCA
15 A E V D R P R E F V L Q
114 gttttctttgggattccaagactatttccggctacactaataaagGGTCCCAGCTCCTTT
25 V P A P L
174 GCACTTGCCATCAAAATGTCTCCGCTGCCCTCCCCTCCGCTCTCCCCGTACCACGACTC
30 H L P S K C P P L P S R P S P P Y H D S
234 TGATAAGAGGCATGTCATAACTAATCCTTTTCATATCCATTTCTACTCTTGCCCTCAGT
51 D K R H V I T N P F H I H F S L L P S V
294 CCACCACCATCAGCGTTCACTCGCCATGCACAAATGTCTCTGGCAAGAATGCACTCAGTC
71 H H H Q R S L A M H K C L W Q E C T Q S
354 TTTACAGATCCCAGACGCTCTACAACCATCTTTGCAATGATCACATTGGGCGCAAGAG
91 F T D P E T L Y N H L C N D H I G R K S
414 TACCAATAATCTTTGCTTGACTTGTCAGGTGGAAGGATTGCTCCACAACCTTGCGAAAACG
111 T N N L C L T C R W K D C S T T C A K R
474 TGACCATATTACCAGTCATCTCCGAGgtatgtcggttctcttctttgttctggcactcgc
131 D H I T S H L R
534 acctcattccaatacccagTTCATACCCCTCTCAAGCCCCATATCTGTGAGgtacgactt
139 V H T P L K P H I C E
594 tggctctcgtcgtcgccgatggtcctctcaatatgtcttactctcccgtgtcagGTCTGCA
150 V C K
654 AAAAGTCTTTCAAGCGTCTCAGGACTTGAAGAAACACGAAAAGATCCATACAGAGGAAC
154 K S F K R P Q D L K K H E K I H T E E H
714 ATCATGCGCAGCACAAACATTCCAAAGCCATTACTGTCGTCGACCCTGCTTACGTTTCCC
174 H A Q H K H S K A I T V V D P A Y V S R
774 GAGTAAGAGGCGATGCAGGCGGCAAGCCTATATCCTCCCAGAACCTTAGGGTTCCTGTTC
194 V R G D A G G K P I S S Q N L R V P V R
834 GCGCTGCTTCCCATTGTCGTCAGCTCCGATAGTAAGTCTATCATCATCATCATCGTCA
214 A A S H S S S S S D S K S I I I I I I V I
894 TCATTGTACCTTTGATACGAAGATAACATATCTTTTTTTCTTTTTTGCAGGTTCCCCTTCC
234 I V P L I R R Y I S F F L F A G S H F L

954 TTTTACCAACCCCTTCCCCAGAACTTGCCCCCGCGCATCATTACCCTCACCAATCTCCAA
 254 L P T P S P E L A P A H H Y P H Q S P T
 1014 CCATTGCCGATGTTTCGCTTCATAGTCACCTTCCAACCTGGGAGGTCTTGAGCAACCAG
 274 I A D V S L H S H L P T W E V L E Q P V
 1074 TCTCTGCCGGCTTAAAGCGATCATATGATCAGACTACAGCGTGGATGACTTTTTTCACAG
 294 S A G L K R S Y D H D Y S V D D F F T D
 1134 ATATGACAAAGAGAAGGATGAATCCTTCTTACGACTCACGTAAGtagggtctctctcctcg
 314 M T K R R M N P S Y D S R K
 1194 ataggttacgtgataggtccgcgagtagttagTCATTTCCTTTTCCTTACAGGAATGGCA
 328 H F F S F T G M A
 1254 GAGCGCCTCAATAACCTTGCCATCCTCCCCATGGTAATGGCGGCAATAATCCGACCGGA
 337 E R L N N L A Y P P H G N G G N N P T G
 1314 ACCTTTAATCCCCGCTCTGTTTCGCTCGATATTCGGACTCCCGAGGAACCTCGCTGCTGTG
 357 T F N P R S V S L D I R T P E E L A A V
 1374 AACCAGTTTCTAGTCACCCTCGGAAGAGACGTCTCAGGAACGGTTCGCTCCACTCACTCT
 377 N Q F L V T L G R D V S G T V R S T H S
 1434 CATCATCATCATGGCCATTAGCTTCAGTACCCAATATTCGCCCCGACTACTTTGATCCA
 397 H H H H G H S A S V P N I P P D Y F D P
 1494 GCCATCCTAAGTCAACTGGGTCTCACTGGCATGCCGGGCATTTCTCCGGCCGATGACTTT
 417 A I L S Q L G L T G M P G I S P A D D F
 1554 GCGAGTACCGCCTACGCCACGAATCAATCCTCTCATCAGTATTATGCCAATCAACGACAC
 437 A S T A Y A T N Q S S H Q Y Y A N Q R H
 1614 CAATCTTCCTATGGTGCTTCCATGTATCGCGATGTAGGCTTCGGTCCGCAGCAGCAGCAT
 457 Q S S Y G A S M Y R D V G F G P Q Q Q H
 1674 GGACCAGATGCCATGCGTTCGCTCATCTGTCCATCATCAACATAAATATAGCCAACCGCCT
 477 G P D A M R R S S V H H Q H K Y S Q P P
 1734 TCCTCCATGTCCTCGAACGGATACTCCTCGCACACAACAGCGGTATCACCACCACCT
 497 S S M S S N G Y S S H H N S G Y H H Q P
 1794 ACACCACCCTCGATGCTAGCACAGGCTCACCGCATTCTTCATCGTCTGCGTCTGCTCCTG
 517 T P P S M L A Q A H R I L H R L R R L L
 1854 TCGCTACGACACCACCGCAAATGTCACTTTCCATGCCGGCGACCATGTCCAGCATGGGTC
 537 S L R H H R K C H F P C R R P C P A W V
 1914 CTTCCCCAGACAGTGCAGTGGCATTTCGATTATCTCAGACCATCGAGAGGCCCTGGTCCG
 557 L P Q T V Q W H S I I S D H R E A P G P
 1974 GTGATCGGTCTCGTACCTGGCGATTACACCAGCCCCGAGTATGAGGCCTATCGTTCCGTTG
 577 V I G L V P G D Y T S P S M R P I V P L
 2034 AAAACTGCACCCACTTCTTCTGCTTCCACGTCTTCTCTACAATCACCTGCTCAGAGTCGA
 597 K T A P T S S A S T S S L Q S P A Q S R
 2094 AGGAGTCTCACGCCACGCCTACTCCGGCCGCTTCGACGTCAAGTCCAAATCGTTCGTCG
 617 R S L T P T P T P A A S T S V S K S S S
 2154 CTTTATCCGCTTCTTAGTTCGGGTGACGAGCAGTACAAGCTTCCTCCGCTGCAGTCGAGG
 637 L Y P L L S S G D E Q Y K L P P L Q S R
 2214 TATAGGTCCCATCACCGGCAACTCGAGGGAGAGCACACCGGGCGGAGCTCATCGTCA
 657 Y R S P S P A N S R E S T P G A S S S S
 2274 TCATCGCGCTTCGACGTCAAGTGTCCAATCgtcgtcgctttatccgcttcttagttcggg
 677 S S R F D V S V Q I
 2334 tgacgagcagtagaacCTTCCCTCCGCTGCAGTGCAGGTATAGGTCCCCATCACCGGCCAA
 687 L P P L Q S R Y R S P S P A N
 2394 CTCTGAGGGAGAGCACACCGGGCGGAGCTCATCGTCATCATCGTTCGAGCGGATCTGCAGC
 702 S R E S T P G A S S S S S S S S G S A A
 2414 GATTTTTAGAGTTGAGCTAGAAGATGATAACTTTGACACgtggtaaccagtgaaagatatg
 722 I F R V E L E D D N F D
 2474 aggagggccacactttgacgatccttgtgctgtttctgaacgtataaaccgattgga
 2534 gaaaacttgagCTGTCTCTGGTTCAAACATGTCTCGTACCCTGGTCTACTGATAAGTTCCG
 734 S C L W F K H V S Y P G L L I S S
 2594 gtgacaagagtcagcttacactaacttgaagaaggtaacattgagcttgagcttgagCT
 751 A

2654 TGCTCGTCGCCCGATTGGCGTCGCTATGGTGAGAGTAACAGCAAGAGGCCAGATGTTGGA
 752 A R R P I G V A M V R V T A R G Q M L D
 2714 TGACAAGCCAAGTAAGGACCATGAATCATCGACCGCAGAAATTGTCGTATGGGTTCGAGGC
 772 D K P S K D H E S S T A E I V V W V E A
 2774 CGAAGACCACTCCATGCTGGTGACGGTCGCAAATCCAAGGCGCGATCCTCGCTGCGCTGA
 792 E D H S M L V T V A N P R R D P R C A D
 2834 TCTCGGCTCTCGTGCTAACAATAAGCACCCCTTCGGAATTTTGAatgcacatacagtatac
 812 L G S R A N N K H P S E F *
 2894 cccaacagtccatatgtatgtaaagtantattattaccataatatatagttggcca**ctt**
 2954 **ggtg**ccgaaaaacgcattagaaaaccggtacaatccccgaattggtaacaaacacc**ga**
 3014 **agg**aaagag**ATAAA**cggc**AATAA**cgactggctattggtcaaccgaagtaagggcgcaaac
 3074 gggnaaccacacattgaacataaannttggccgggacaccaaattccacaagtaaagc
 3134 acatgagaatcccacaatgggtgaaagggaaacccaaaataaccaagaganaaacaggac
 3194 aacaaagtgggcccacaacaaggtcnaaacgagtttaagaanatatcaacagtaacaagac
 3254 acaagcggtgagcnaactaagcacana

Figura 7. Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene, que codifica PacC de *C. pernicioso*. As regiões 5' e 3' não codificadoras e os íntrons foram colocadas em letras minúsculas. As seqüências putativas CAAAT box e TATA box estão em negrito e sublinhadas na região 5'. Os sítios de ligação ao fator PacC estão em negrito e letras maiúsculas. Os possíveis sítios de poliadenilação estão em letras maiúsculas e negrito na região 3'. O códon de parada está sinalizado com um asterisco. O consenso CWTS, envolvido na terminação da tradução, está representado em caixa cinza.

A

```

1      MSLHLVHVGIV RRLTAEVDRP REFVLQVPAP LHLPSKCPPL PSRPPSPYHD SDKRHVITNP
61     FHIHFSLLPS VHHHQRSLAM HKCL QECTQ SFTDPETLYN HLCNDHIGRK STNNLCLTCR
121    WKDCSTTCAK RDHITSHLRV HTPLKPHICE VCKKSFKRP DLKKHEKIHT EEHHAQHKHS
181    KAITVVDPAY VSRVRGDAGG KPISSQNLRV PVRAASHSSS SSSKSIIII IVIIVPLIRR
241    YISFFLFAGS HFLLPPTSPE LAPAHHPHQ SPTIADVSLH SHLPTWEVLE QPVSAGLKRS
301    YDHDYSVDDF FDTMTKRRMN PSYDSRNHFF SFTGMAERLN NLAYPPHGNG GNNPTGTFNP
361    RSVSLDIRTP EELAAVNQFL VTLGRDVSGT VRSTHSHHHH GHSASVPNIP PDYFDPAILS
421    QLGLTGMPGI SPADDFASTA YATNQSSHQY YANQRHQSSY GASMYRDVGF GPQQQHGPDA
481    MRRSSVHHQH KYSQPPSSMS SNGYSSHHNS GYHHQPTPPS MLAQAHRILH RLRRLLSLRH
541    HRKCHFPCRR PCPAWVLPQT VQWHSIISDH REAPGPVIGL VPGDYTSPSM RPIVPLKTAP
601    TSSASTSSLQ SPAQSRRLT PTPTPAASTS VSKSSSLYPL LSSGDEQYKL PPLQSRYSRP
661    SPANSRESTP GASSSSSRF DVSQILPPL QSRYSRSPSA NSRESTPGAS SSSSSSSGSA
721    AIFRVELEDD NFDTCWFKH VSYPGLLISS LARRPIGVAM VRVTARGQML DDKPSKDHE
781    STAEIVVWVE AEDHSMVTV ANPRRDPRCA DLGSRANKH PSEF*

```

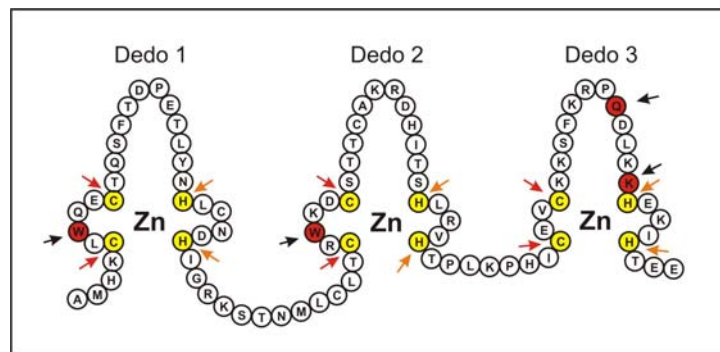
B**C**

Figura 8. **A.** Seqüência de aminoácidos deduzida do gene *pacCCp*. A região correspondente aos dedos de zinco (C_2H_2) 1, 2 e 3 está sublinhada, as cisteínas e histidinas estão em caixas cinza e, em vermelho, estão os aminoácidos considerados, funcionalmente importantes. Os dois sítios de ligação a PalA, apresentando a seqüência YPXL, estão em negrito na porção C-terminal. **B.** Esquema dos três dedos de zinco de PacC na região N-terminal e os sítios de ligação a PalA na região C-terminal estão representados por círculos vermelhos. **C.** Esquema baseado em Fernández-Martínez et al., (2003) representando a seqüência de aminoácidos dos três dedo de zinco da proteína PacCCp. As setas indicam os aminoácidos cisteínas e histidinas responsáveis pela formação dos dedos de zinco, em vermelho e indicado por setas pretas, estão os aminoácidos funcionalmente importantes e conservados nos diferentes organismos.

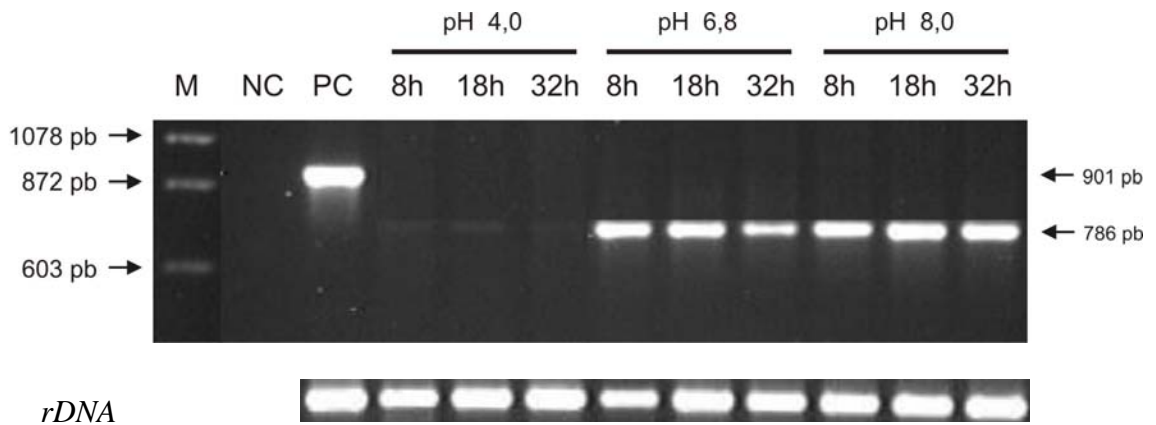


Figura 10. Análise da transcrição do gene *pacCCp* por meio da técnica de RT-PCR. O fungo foi cultivado durante 8, 18 e 32 horas em pH, 4,0, 6,8, ou 8,0. M representa marcador PhyX-174 digerido com *Hae* III. NC indica o controle negativo onde não foi adicionado DNA. PC é o controle positivo, onde foi amplificado o DNA genômico com os mesmos oligonucleotídeos.

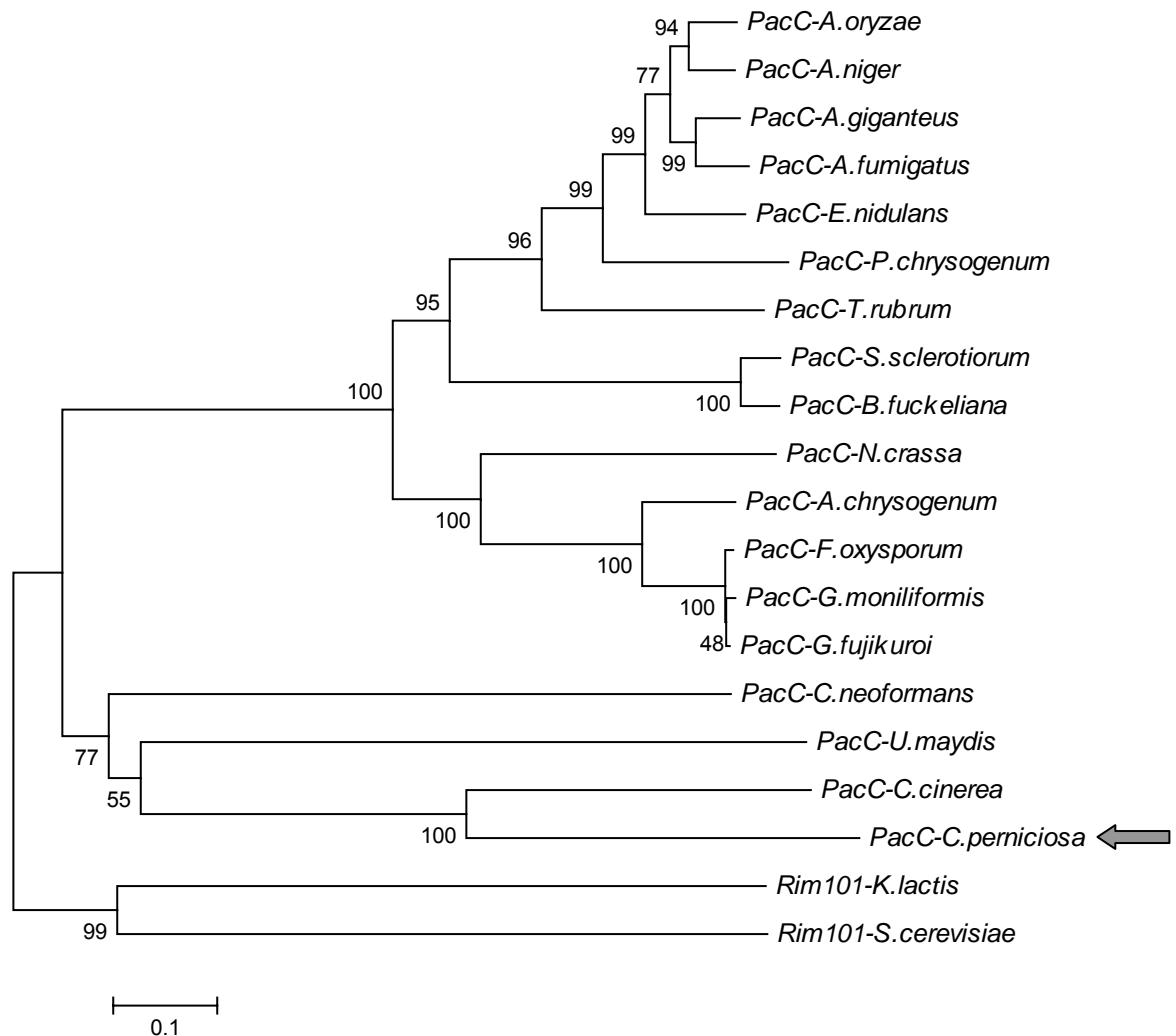


Figura 11- Análise filogenética do fator de transcrição PacC/Rim101 de *C. pernicioso*, usando o programa MEGA 3.1 pelo método da Evolução Mínima (ME) com bootstrap de 1000 réplicas. Os organismos utilizados e número de acesso foram: proteína hipotética de *Coprinopsis cinerea* (EAU92749); PacC de *Cryptococcus neoformans* (XP_572292); PacC de *Ustilago maydis* (CAG34353); Rim 101 de *Kluyveromyces lactis* (XP_453982); Rim 101 de *Saccharomyces cerevisiae* (NP_011836); PacC de *Acremonium chrysogenum* (Q96X49); PacC de *Gibberella moniliformis* (Q873X0); PacC de *Neurospora crassa* (Q7RVQ8); PacC de *Fusarium oxysporum* (Q870A3); PacC de *Emericella nidulans* (Q00202); PacC de *Sclerotinia sclerotiorum* (Q9P413); PacC de *Aspergillus oryzae* (Q9HFB3); PacC de *Gibberella fujikuroi* (Q8J1U9); PacC *Trichophyton rubrum* (Q9C1A4); PacC de *Aspergillus niger* (Q00203); PacC de *Botryotinia fuckeliana* (AAV54519); PacC de *Aspergillus giganteus* (Q5XL24); PacC de *Penicillium chrysogenum* (Q01864); PacC de *Aspergillus fumigatus* Af293 (XP_754424); e PacC de *C. pernicioso* ainda não depositado.

5. DISCUSSÃO

Os microrganismos possuem a capacidade de adaptar-se ao pH do ambiente. Um dos aspectos desta adaptação, particularmente importante para os organismos que crescem sob ampla variação de pH, é a capacidade de expressão gênica apropriada a cada pH (Arst & Peñalva 2003; Peñalva & Arst, 2004).

Entre os genes regulados por pH ambiental, encontram-se aqueles que codificam enzimas secretadas, permeases e reguladores de enzimas intracelulares ligadas à síntese de produtos, que são exportados como toxinas ou antibióticos, assim como enzimas ligadas à produção de compostos capazes de modificar o pH. Nos últimos anos, têm surgido evidências que os genes envolvidos na modificação pós-traducional das enzimas destinadas à secreção também são regulados por pH (Espeso & Peñalva, 1996; Nozawa et al., 2003; Penãlva & Arst, 2002).

No presente trabalho, foram descritas também a clonagem e a caracterização dos genes *palA* e *pacC* de *C. pernicioso*. Transcritos do gene *palACp* foram detectados em pH de 4,0 a 8,0 (Figura 5), não apresentando regulação por pH, conforme esperado.

A seqüência parcial do gene que codifica *palACp* foi deduzida e a análise da seqüência de aminoácidos mostra que esta proteína apresenta o domínio BRO1, encontrado desde leveduras até mamíferos (Figura 4). A proteína PalA encontrada em fungos filamentosos e o homólogo Rim20 de leveduras estão relacionados à transdução de sinal em resposta ao pH. PalA e Alix são componentes comuns na rota de transdução de sinal conservada de levedura a humanos. Alix é uma proteína citoplasmática de mamíferos, associada à sinalização da apoptose (Xu & Mitchell, 2001; Boysen & Mitchell, 2006). A análise filogenética mostra que Alix está mais proximamente relacionada com a proteína BRO1 codificada por um gene parálogo de *palA/Rim20* em fungos filamentosos. De fato, as proteínas PalA/Rim20 relacionadas à regulação em resposta ao pH em fungos perderam a região rica em

prolina e um domínio “coiled-coil” (Ohkouchi et al., 2005; Odorizzi, 2006; Sadoul, 2006).

PalA está associado à clivagem proteolítica do fator de transcrição PacC. A clivagem ocorre no “box” de sinalização para a protease, que está flanqueada por dois motivos de ligação a PalA, os quais foram identificados na proteína PacC de *C. pernicioso* (Figura 8).

O gene *pacC* de *C. pernicioso* apresenta, na região promotora, três possíveis sítios de ligação ao fator de transcrição PacC, o que indica sua autorregulação (Figura 7). Conforme esperado, a transcrição de *pacCCp* apresentou sua regulação dependente do pH ambiental, como tem sido também observado em outros fungos filamentosos (Rollins & Dickman, 2001; Arechiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005; Ferreira-Nozawa et al., 2006).

A região dedo de zinco mantém-se extremamente conservada, em todos os ascomicetos e basidiomicetos (Figuras 9). O aminoácido triptofano (W), localizado entre as duas cisteínas no primeiro e segundo dedo de zinco, é considerado fator crítico na estrutura e função do fator 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) e estão relacionadas à localização nuclear, são também conservadas em todos os organismos (Fernández-Martínez et al., 2003).

Motivos de reconhecimento proteína-proteína YPXL/I, em que tirosina (Y), prolina (P) e leucina (L) ou isoleucina (I) são cruciais para a ligação na interação PalA (Vincent et al., 2003), foram localizados na região C-terminal da proteína PacC de *C. pernicioso*, entre os aminoácidos 637 e 742 (Figura 8A). Isto sugere que o primeiro processamento proteolítico, realizado por PalB, ocorre no “box” de sinalização para protease (SPB- signalling protease box) entre esses dois motivos de ligação à PalA.

O isolamento e caracterização dos genes *palACp* e *pacCCp* e a identificação de seqüência, que codificam o PalB no banco genômico do projeto vassoura-de-bruxa, permite inferir que, em *C. pernicioso*, ocorre um processo de transdução de sinal mediado por pH, assim como o observado em *A. nidulans*.

A produção de fatores de virulência em resposta ao pH, tem sido identificada em vários fitopatógenos. Portanto, é possível que mecanismos similares

possam ser compartilhados também por *C. perniciosus*. Se comprovada sua veracidade, tal fato pode abrir novas e promissoras perspectivas para o controle da doença.

6. REFERÊNCIAS

- Akimitsu, K., Isshiki, A., Ohtani, K., Yamamoto, H., Eshel, D., Prusky, D.: Sugars and pH : A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. *Physiol Mol Plant Pathol* 65 (2004) 271-75.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Milller, W. and Lipman, D.J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 3389-02.
- Arechiga-Carvajal, E.T. and Ruiz-Herrera, J.: The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryot Cell* 4 (2005) 999-1008.
- Arst, H.N., Jr. and Penalva, M.A.: Recognizing gene regulation by ambient pH. *Fungal Genet Biol* 40 (2003) 1-3.
- Benton W.D., and Davis R.W.: Screening of lambda gt recombinant clones by hibridization to single plaques in situ. *Science* 196 (1977) 180-83.
- Bignell, E., Negrete-Urtasun, S., Calcagno, A.M., Haynes, K., Arst, H.N., Jr. and Rogers, T.: The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Mol Microbiol* 55 (2005) 1072-84.
- Boysen, J.H. and Mitchell, A.P.: Control of Bro1-domain protein Rim20 localization by external pH, ESCRT machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 pathway. *Mol Biol Cell* 17 (2006) 1344-53.
- Caddick, M.X., Brownlee, A.G. and Arst, H.N., Jr.: Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 203 (1986) 346-53.
- Caracuel, Z., Roncero, M.I., Espeso, E.A., Gonzalez-Verdejo, C.I., Garcia-Maceira, F.I. and Di Pietro, A.: The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* 48 (2003) 765-79.
- Davis, D., Edwards, J.E., Jr., Mitchell, A.P. and Ibrahim, A.S.: *Candida albicans* RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. *Infect Immun* 68 (2000) 5953-9.
- De Bernardis, F., Muhlschlegel, F.A., Cassone, A. and Fonzi, W.A.: The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 66 (1998) 3317-25.

- Denison, S.H., Orejas, M. and Arst, H.N., Jr.: Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J Biol Chem* 270 (1995) 28519-22.
- Diez, E., Alvaro, J., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suarez, T., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr. and Penalva, M.A.: Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *Embo J* 21 (2002) 1350-9.
- Espeso, E.A. and Arst, H.N., Jr.: On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 3355-63.
- Espeso, E.A. and Penalva, M.A.: Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J Biol Chem* 271 (1996) 28825-30.
- Espeso, E.A., Tilburn, J., Sanchez-Pulido, L., Brown, C.V., Valencia, A., Arst, H.N., Jr. and Penalva, M.A.: Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol* 274 (1997) 466-80.
- Felipe, M.S.S., Azevedo, M.A, Vainstein, M.H, Scharank, A. : *Biologia Molecular de fungos filamentosos: construção de banco genômico e de cDNA. Manual Técnico.* In. Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz". (1992) p.99.
- Fernandez-Martinez, J., Brown, C.V., Diez, E., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr., Penalva, M.A. and Espeso, E.A.: Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J Mol Biol* 334 (2003) 667-84.
- Ferreira-Nozawa, M. S., Silveira H. C. S., Ono, C. J., , Fachin, A. L., Rossi, A. , Martinez-Rossi, N. M.: The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. *Medical Micol* 44 (2006) 641-45
- Griffith, G.W. And Hedger, J.N.: The breeding biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. *Heredity* 72 (1994) 278-89.
- Griffith, G.W., Nicholson, J., Nenninger, A., Birch, R.N., Hedger: J.N.: Witches' broom and frosty pods in cacao. *New Zealand J Bot* 41 (2003) 423-35.

- Herranz, S., Rodriguez, J.M., Bussink, H.J., Sanchez-Ferrero, J.C., Arst, H.N., Jr., Penalva, M.A. and Vincent, O.: Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 12141-6.
- Hurley, J.H. and Emr, S.D.: The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35 (2006) 277-98.
- Kim, J., Sitaraman, S., Hierro, A., Beach, B.M., Odorizzi, G. and Hurley, J.H.: Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain. *Dev Cell* 8 (2005) 937-47.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M.: MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5 (2004) 150-63.
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., Legendre, L.: Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microb Ecol* 43 (2003) 359-66.
- Nozawa, S.R., Ferreira-Nozawa, M.S., Martinez-Rossi, N.M. and Rossi, A.: The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene *pacC*-dependent pathway. *Fungal Genet Biol* 39 (2003) 286-95.
- Odorizzi, G.: The multiple personalities of Alix.. *J. Cell Sci.* 119 (2006) 3025-32
- Ohkouchi, S., Saito, H., Aruga, F., Maeda, T., Shibata, H. and Maki, M.: *Dictyostelium discoideum* requires an Alix/AIP1 homolog, DdAlix, for morphogenesis in alkaline environments. *FEBS Lett* 579 (2005) 1745-50.
- Penalva, M.A. and Arst, H.N., Jr.: Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66 (2002) 426-46.
- Penalva, M.A. and Arst, H.N., Jr.: Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* 58 (2004) 425-51.
- Prusky, D., McEvoy, J.L., Leverentz, B. and Conway, W.S.: Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 14 (2001) 1105-13.
- Prusky, D., Mcevoy, J. L., Saftener, R., Conway, W. S., And Jones, R.: Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium spp.* on apple and citrus fruit. *Biochem Cell Biol* 94 (2004) 44-51.

- Prusky, D., And Yakoby, N.: Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH? *Mol Plant Pathol* 4 (2003) 509-16.
- Rozen, S. and Skaletsky, H.J.: Primer3 on the WWW for general users and biologist programmers, Krawetz S, Misener S (Eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 2000, pp. 365-386.
- Rollins, J.A.: The *Sclerotinia sclerotiorum* *pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Mol Plant Microbe Interact* 16 (2003) 785-95.
- Rollins, J.A. and Dickman, M.B.: pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a *pacC/RIM1* homolog. *Appl Environ Microbiol* 67 (2001) 75-81.
- Sadoul, R.: Do Alix and ALG-2 really control endosomes for better or for worse? *Biol Cell* 98 (2006) 69-77.
- Sanger, F., Nicklen, S. and A.R., C.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 85 (1977).
- Santos, J. K., Isolamento, caracterização e regulação de genes que codificam pectato liase em *Crinipellis pernicioso*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao*). 2006. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa. 121p.
- Tilburn, J., Sanchez-Ferrero, J.C., Reoyo, E., Arst, H.N., Jr. and Penalva, M.A.: Mutational analysis of the pH signal transduction component PalC of *Aspergillus nidulans* supports distant similarity to BRO1 domain family members. *Genetics* 171 (2005) 393-401.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673-80.
- Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr. and Penalva, M.A.: YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 1647-55.
- Xu, W. and Mitchell, A.P.: Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J Bacteriol* 183 (2001) 6917-23.

7. CONCLUSÕES

A análise de seqüência, alinhamento e filogenia da proteína deduzida indicam que o gene *xghCp* codifica uma endo-xilogalacturonana hidrolase;

No genoma de *C. pernicioso* parece conter uma cópia do gene *xghCp*;

O gene *xghCp* de *C. pernicioso* é transcrito em pH variando de 4.0 a 8.0, e não foi reprimido em meio contendo glicose 1%.

A proteína XghCp apresenta assinatura GIK característico de endo-xilogalacturonana hidrolase;

O gene *palACp* não é regulado em resposta ao pH e a proteína deduzida apresenta o domínio BRO1;

O gene *pacCCp* é regulado por pH;

O isolamento de *palA* e *pacC* indicam a existência de uma cascata de sinalização em resposta ao pH em *C. pernicioso*.