

## ASPECTOS MOLECULARES DA INTERAÇÃO DO FUNGO *Sclerotinia sclerotiorum* E PLANTAS DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

MARÍLIA BARROS OLIVEIRA<sup>1</sup>, MURILLO LOBO JÚNIOR<sup>2</sup>, SILVANA PETROFEZA<sup>1</sup>

**INTRODUÇÃO:** *Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo de solo, pertencente à família Sclerotiniaceae, da ordem Helotiales, filo Ascomycota. Este fitopatógeno é o causador do mofo branco e ataca cerca de 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies ou variedades de plantas, sendo a maioria dicotiledônea (família Angiosperma) de grande importância econômica (BOLAND; HALL, 1994). O primeiro indício da presença da doença é um aspecto de murcha da planta. Nos órgãos infectados são encontradas lesões encharcadas, de coloração parda e consistência mole, com micélio branco de aspecto cotonoso, cobrindo os tecidos da planta. Com o progresso da doença, as folhas e caules infectados tornam-se marrons e permanecem eretos mesmo com a morte da planta. O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura altamente suscetível a *S. sclerotiorum*, causador do mofo branco. Os danos mais severos causados por esta doença, são em geral, observados em lavouras conduzidas sob temperaturas baixas e em solo úmido, como nos plantios irrigados por pivô central, hoje responsável por 49% da produtividade dos estados de Goiás e Distrito Federal. Quando o fungo infecta a planta seu primeiro desafio é vencer a barreira imposta pela parede celular da planta. Para ganhar acesso à célula hospedeira, dois fatores de patogenicidade de *S. sclerotiorum*, secreção de ácido oxálico e enzimas hidrolíticas, agem em concerto na maceração de tecidos vegetais e geração de necrose. Apesar da crescente quantidade de dados em literatura, descrevendo genes envolvidos no processo de patogênese vegetal, há poucos relatos descrevendo as mudanças moleculares durante a infecção deste patógeno em plantas hospedeiras. A técnica SSH consiste na identificação de genes diferencialmente expressos. Em geral, envolve hibridização de cDNA de uma amostra alvo (*tester*) contra um excesso de cDNA de outra amostra controle (*driver*). Com a hibridização das sequências comuns, o que resulta são os genes presentes em apenas uma das situações que serão analisados e identificados. O presente trabalho teve como objetivo identificar os genes potencialmente envolvidos no processo de infecção de *S. sclerotiorum* em plantas de feijoeiro, através do mapeamento de sequências diferencialmente expressas obtidos em bancos de subtração, por meio da técnica de SSH.

**MATERIAL E MÉTODOS:** Sementes de feijão (*P. vulgaris* L.) cultivar Pérola (PRS) foram semeadas em vasos com 5L de solo adubado com NPK (1 g/kg de solo) sob condições de luz natural, temperatura de até 20±3 °C e irrigação diária em casa de vegetação localizada na Embrapa Arroz e Feijão – Santo Antônio de Goiás, Goiás. Plantas de feijoeiro, no estágio de florescimento (R6), foram inoculadas nas axilas das folhas com discos (0,5 cm de diâmetro) de cultura de *S. sclerotiorum* em meio BDA crescidas a 20 °C por 5 dias. Amostras de tecido infectado foram coletas 06, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após o inoculo e armazenadas em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA total. Plantas sem inoculação foram coletadas nos respectivos tempos e utilizadas como controle do experimento. O RNA total foi extraído pelo método do TRIZOL Reagente (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) conforme instruções do fabricante. Para remover a contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) seguida de inativação da enzima (EDTA 2,5 mM, 65 °C / 10 min) e precipitação com etanol). Para a construção dos bancos de subtração foi utilizado o kit SUPER SMART™ PCR cDNA SYNTHESIS (BD Sciences, San Jose, USA). Foi constituído um *pool* de RNA representativo das amostras de planta infectadas nos diferentes tempos. Estas amostras compuseram o *tester* do experimento e as amostras de planta sem infecção compuseram o *driver*. A clonagem foi feita utilizando o vetor PCR 4® TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) e células competentes ONE SHOT® TOP 10 ELETROCOMP™. Após a seleção dos clones fez-se a extração do DNA plasmidial e sequenciamento utilizando o Kit Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). As sequências obtidas foram processadas pelos programas Phred e CAP3 verificando sua qualidade e alinhadas, a partir de suas similaridades, para formar *contigs*, e comparadas em bancos de dados internacionais NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Arroz e Feijão, GO-462 km 12, C.P. 179, 75375-000, Santo Antônio, Goiás, Brasil.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** A interação entre o fungo *S. sclerotiorum* e plantas de feijoeiro foi analisada através da técnica de SSH. Um total de 1.246 sequências foi gerado, sendo que 573 foram sequências únicas (*singlets*) e 673 sequências formaram 163 *contigs*. As ESTs foram identificadas partir da comparação em Banco público de dados GenBank usando BLASTN e BLASTX (ALTSCHUL et al., 1997) e classificadas de acordo com sua função baseada em similaridade com seqüências no Gene Ontology database. Foram identificadas 67 seqüências como de *S. sclerotiorum* ou fungos relacionados. Dentre estas, foram encontrados genes relacionados com o processo de degradação de parede celular da planta hospedeira, transporte intracelular e vias de transdução de sinal, como os listados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais ESTs representando proteínas associadas à patogenicidade.

Nº Acesso	Função	Taxo relacionado	valor de <i>E</i>
<b>Enzimas Hidrolíticas</b>			
SS1G_01493	Beta-xylosidase	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	3e-15
SS1G_08474	Beta-1,3-glucanase precursor	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	6e-05
SS1G_06964	Exochitinase	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	4e-10
SS1G_11212	Endochitinase	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	8e-57
SS1G_12021	Beta-1,6-glucanase	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	5e-18
SS1G_05897	Chitinase	<i>Hipocrea lixii</i>	1e-39
SS1G_13719	Aspartic endopeptidase	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	8e-15
KOG1339	Aspartyl	<i>Sacchamicyces cerevisiae</i>	2e-08
<b>Transporte intracelular</b>			
SS1G_07860	GTP-biding	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	6e-42
SS1G_09620	GTPase	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	2e-04
SS1G_02002	GTP-biding	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	1e-36
<b>Outros</b>			
KOG0286	G-protein	<i>Sacchamicyces cerevisiae</i>	8e-08
SS1G_03197	pH-resonse regulador protein	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	2e-09
SS1G_06319	Perilipin like CAP20 protein	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	1e-07
SS1G_00477	Phospholipase	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980	1e-12

Quando *S. sclerotiorum* infecta a planta o pH neutro ou ligeiramente alcalino do tecido vegetal estimula a síntese de oxalato, resultando em uma acidificação do meio extracelular. A acidificação do meio induz a atividade de muitas enzimas líticas (ROLLINS *et al.*, 1998). A degradação de componentes da parede celular da planta está ligada à produção de uma ampla e complexa variedade de enzimas hidrolíticas, como celulasas, hemicelulasas, pectinases e proteases. Sequencialmente à secreção pelo fungo, estas enzimas facilitam a penetração, colonização e maceração, mas também geram uma importante fonte de nutrientes (BOLTON *et al.*, 2006). As GTPases, outro grupo de proteína encontrado estão envolvidas no transporte intracelular de vesículas levando à secreção de enzimas extracelulares que degradam a parede celular da planta. Em muitos sistemas planta-fitopatógenos o cAMP e proteínas Kinases (MAPK) estão envolvidos na transmissão de sinais derivados do contato com superfícies da planta, levando à expressão de genes relacionados à infecção. A proteína G ativa a enzima adenilato ciclase resultando no aumento dos níveis de cAMP. Esta proteína assim como outras ligadas ao metabolismo secundário estão relacionadas à patogenicidade porque normalmente afeta conjuntos inteiros de genes-alvo. Trabalho em plantas de feijoeiro infectadas por *Botrytis cinera*, mostrou drástica redução ou perda total da patogenicidade do fungo com o *knockout* dos genes relacionados à Proteína G, MAPKinase e adenilato ciclase (GRONOVER *et al.*, 2004). A formação de apressório é relatada como fator de patogenicidade para muitos fungos, constituindo um pré-requisito para a infecção de tecidos sadios. O gene *CAP20* encontrado em nosso trabalho está relacionado com a formação de apressório para outros fungos, sendo demonstrado que o

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Arroz e Feijão, GO-462 km 12, C.P. 179, 75375-000, Santo Antônio, Goiás, Brasil.

bloqueio deste gene levou à redução dos sintomas da doença causada por *Colletotichum gloeosporioides* em frutos de tomate (KLEEMANN *et al.*, 2008). Inicialmente, foram validados por qRT-PCR alguns genes que codificam proteínas envolvidas na penetração e colonização de *S. sclerotiorum* no tecido do feijoeiro. Para os cinco genes validados houve expressão positiva durante o processo de patogênese. A modulação do pH durante a infecção, envolvendo a secreção de ácido oxálico, é um mecanismo importante em *S. sclerotiorum* para a regulação da expressão sequencial de fatores de patogenicidade como enzimas hidrolíticas. Em *S. sclerotiorum*, assim como em outros fungos, o ácido oxálico é produzido a partir de oxaloacetato em uma reação catalisada pela oxaloacetato acetilhidrolase. Neste trabalho, a expressão deste gene pôde ser detectada já no estágio inicial da infecção (24hpi) persistindo durante todo o período avaliado. As proteases produzidas pelo fungo atuam na degradação de proteínas da planta, algumas envolvidas em resposta de defesa, também parecem estar correlacionadas com o desenvolvimento dos sintomas (BOLTON *et al.* 2006). Durante a interação *S. sclerotiorum* – feijoeiro o gene (*acp1*) que codifica para uma protease ácida foi altamente expresso, principalmente com 24 – 48 horas após a infecção; o gene que codifica para aspartil protease (*aspS*) apresentou expressão constante durante todo o período avaliado. Em relatos anteriores, o isolamento deste gene confirmou sua importância como fator de virulência (POUSSEREAU *et al.*, 2001). Nenhuma cisteína protease foi anteriormente descrita em *S. sclerotiorum*, a detecção deste gene constitui um aspecto importante para a caracterização de novos genes envolvidos no processo de infecção. O gene pisatin demethylase, envolvido no processo de detoxificação do fungo contra as toxinas de defesa da planta, como as fitoalexinas, foi positivamente regulado durante os estágios iniciais de infecção, sendo um indício da atuação desta proteína neste processo. Esta em curso a validação por qRT-PCR dos demais genes identificados pela técnica de SSH.

**CONCLUSÕES:** Embora ainda seja resultado preliminar, o presente estudo mostrou, através do mapeamento de sequências diferencialmente expressas obtidos em bancos de subtração SSH, genes relacionados à patogenicidade de *S. sclerotiorum* em plantas de feijoeiro. A identificação destes genes sugere que os principais fatores de patogenicidade deste fungo são: (a) produção de enzimas hidrolíticas, (b) acidificação do meio e (c) formação de apressório. Entretanto, identificar o papel de cada gene no processo de infecção exige estudos adicionais envolvendo técnicas como RNAi.

**AGRADECIMENTOS:** CNPq, FAPEG e CAPES.

## REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLERW and LIPMAN, D. J. (1997). BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal Plant Pathology*, 16 (2): 93-108. 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Mol Plant Pathol*, 1:1-6. 2006.

GRONOVER, C.S.; SCHORN, C.; TUDZYNSKI, B. Identification of *Botrytis cinera* genes up-regulated during infection and controlled by the G $\alpha$  subunit BCG1 using suppression subtractive hybridization (SSH). *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 17: 537-546. 2004.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Arroz e Feijão, GO-462 km 12, C.P. 179, 75375-000, Santo Antônio, Goiás, Brasil.

KLEEMANN, J.; TAKAHARA, H.; STUBER, K.; O'CONNELL, R. Identification of soluble secreted proteins from appressoria of *Colletotrichum higginsianum* by analysis of expressed sequence tags. **Microbiology**, 154: 1204-1217. 2008.

POUSSEREAU, N.; GENTE, S.; RASCLE, C.; BILLON-GRAND, G. FÈVRE, M. aspS encoding an unusual aspartyl protease from *Sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis. **FEMS Microbiol. Lett.**, 194: 27-32. 2001.

ROLLIS, J. A.; DICKMAN, M. B. Increase in endogenous and exogenous cyclic AMP levels inhibits sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied Environ. Microbiol.**, 64: 2539-2544. 1998.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Arroz e Feijão, GO-462 km 12, C.P. 179, 75375-000, Santo Antônio, Goiás, Brasil.