

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**



**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO INDUTOR DE NECROSE**  
**DE *Crinipellis pernicios* EM *Theobroma cacao* L.**

**JOCI NEUBY ALVES MACÊDO**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Agosto de 2004**

JOCI NEUBY ALVES MACÊDO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO INDUTOR DE NECROSE DE *Crinipellis*  
*perniciosa* EM *Theobroma cacao* L.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

Agosto de 2004

JOCI NEUBY ALVES MACÊDO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO INDUTOR DE NECROSE DE *Crinipellis*  
*perniciosa* EM *Theobroma cacao* L.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 20 de agosto de 2004

Prof. Dr. Gonçalo Amarante G. Pereira  
UNICAMP

Prof. Dr. Márcio Gilberto C. Costa  
UESC

Prof. Dr. Júlio César de Mattos Cascardo  
(Orientador)

À minha mãe Nina, meus irmãos Joilson e Ana Rita pelo apoio, confiança incentivo e amor,

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus, pela vida.

A todas pessoas que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Júlio César de Mattos Cascardo, pela oportunidade, orientação, confiança e amizade.

Aos professores, pesquisadores e amigos Andréa, Abelmon, Fabienne, Fafá e Priminho, pela cooperação e apoio durante o desenvolvimento da pesquisa.

À Odalys Garcia Cabrera e ao Professor Dr. Gonçalo Guimarães, pelo material cedido para o desenvolvimento da pesquisa.

À Jaci, Pelé e Robson, pelo apoio técnico.

À turma da iniciação científica em especial à Lívia Maria Cabral Bitencourt, pela cooperação nos trabalhos de bancada.

Aos colegas de turma Adriana, Alfredo, Bianca, Cristiane, Geruza, Jeiza, Patrícia, Lívia e Ronaldo, pela solidariedade, pelo apoio e, em especial, pela amizade.

Aos colegas da segunda turma Maíza, Sônia e Stênio, pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação e à Universidade Estadual de Santa Cruz, pela oportunidade.

Aos docentes, pela participação na minha formação profissional.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo de mestrado.

À CEPLAC e Almirante Cacau nas pessoas da Dr<sup>a</sup> Karina Gramacho e Dr. Alan Pomella, pelo material vegetal.

## ÍNDICE

EXTRATO.....	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. <i>Theobroma cacao</i> L. e <i>Crinipellis pernicioso</i> (Stahel) Singer.....	3
2.2. Interação planta patógeno.....	5
2.2.1. Aspectos gerais da interação planta-patógeno.....	5
2.2.2. Respostas de defesa.....	6
2.2.3. Elicitores.....	10
2.2.3.1. Indutores de necrose.....	12
3. METODOLOGIA.....	15
3.1. Análises de seqüências.....	15
3.2. Clonagem molecular.....	15
3.2.1. Estratégia de clonagem.....	15
3.2.2. Preparo de células competentes.....	16
3.2.3. Transformação de bactéria por choque térmico.....	18
3.2.4. Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> .....	18
3.2.5. Confirmação da inserção do plasmídeo recombinante em <i>E. coli</i> .....	19

3.3. Expressão da proteína indutora de necrose em <i>E.coli</i> .....	19
3.4. Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade.....	20
3.5. Purificação de anticorpo contra a proteína indutora de necrose.....	21
3.6. SDS-PAGE e <i>immunoblotting</i> .....	22
3.7. Cultivo de <i>Crinipellis pernicioso</i> em meio líquido.....	23
3.8. Extração de proteínas secretadas em meio de cultura de <i>C. pernicioso</i> .....	23
3.9. Extração de DNA genômico de <i>Crinipellis pernicioso</i> .....	24
3.10. <i>Southern Blot</i> .....	25
3.11. Análise da atividade de indução de necrose da proteína recombinante em plantas.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Análise de seqüências de indutores de necrose de <i>Crinipellis pernicioso</i> .....	27
4.2. Detecção do número de cópias gênicas do indutor de necrose de <i>C. pernicioso</i> .....	31
4.3. Produção e purificação da proteína indutora de necrose em bactéria.....	34
4.4. Identificação da proteína indutora de necrose em meio de cultura de <i>C. pernicioso</i> .....	36
4.5. Indução de necrose em <i>Theobroma cacao</i> L. e <i>Nicotiana tabaccum</i> L. ....	37
5. DISCUSSÃO.....	40
5.1. <i>Crinipellis pernicioso</i> codifica uma proteína indutora de necrose.....	40
5.2. O gene da nip-cp está presente em cópia única no genoma.....	41
5.3. A proteína NIP-CP é eficientemente expressa em sistema heterólogo.....	42
5.4. A proteína NIP-CP não necessita ser glicosilada para ser funcional.....	43
5.5. A proteína NIP-CP é funcional em <i>Theobroma cacao</i> L. e possivelmente está envolvida na mudança da fase parasítica para necrotrófica.....	43
5.6. A proteína NIP-CP é funcional em <i>Nicotiana tabacum</i> L.....	44
6. CONCLUSÕES.....	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47



## EXTRATO

MACÊDO, Joci Neuby Alves, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, agosto de 2004. **Caracterização Funcional do indutor de necrose de *Crinipellis perniciosa* em *Theobroma cacao* L.** Orientador: Júlio Cezar de Mattos Cascardo. Co-orientadores: Abelmon Gesteira e Andréa Cristina Mariano.

A cacauicultura representava a principal fonte econômica da região sul da Bahia, antes da chegada da vassoura-de-bruxa, em 1989. A propagação da doença nas plantações e a queda do preço no mercado levaram o Brasil de país exportador para importador no início da década de 90. O *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, agente causador da vassoura-de-bruxa, é um fungo hemibiotrófico que provoca diversos sintomas no cacauero sendo o mais característico o super brotamento, conhecido como vassoura-de-bruxa. Vários trabalhos têm sido realizados na tentativa de controlar a doença, dentre eles a busca de cultivares resistentes que é considerada a técnica mais promissora, apesar da variabilidade genética do *C. perniciosa*. Uma alternativa para a elaboração de novas estratégias para o controle da vassoura-de-bruxa é o estudo molecular da interação *Crinipellis perniciosa*-cacau.

Duas seqüências foram identificadas a partir da análise do banco de dados da biblioteca do projeto genoma do *C. perniciosa* e de uma biblioteca da interação *C.perniciosa*-cacau (var. 'Catongo') e que foram denominadas NIP-CP ORFI e NIP-

CP ORFII, respectivamente. Estas seqüências apresentaram similaridade com indutores de necrose de *Phytophthora ssp.*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum*, e *Bacillus Halodurans*. As seqüências de aminoácidos deduzidas de NIP-CP ORFI e NIP-CP ORFII possuem regiões conservadas entre os indutores de necrose. Além dessas regiões, um peptídeo sinal, um sítio consenso de N-glicosilação e sítios consenso de fosforilação estão presentes nas duas ORFs de *C. perniciosa*. A identidade de seqüência entre NIP-CP ORFI e NIP-CP ORFII é 89,17%, sendo a maior divergência observada na região correspondente ao peptídeo sinal. Apesar da identificação de duas seqüências, a análise de número de cópias do indutor de necrose feita por *Southern blot* identificou apenas uma banda, sugerindo que estes genes ou estão em *tandem* no genoma ou são isoformas, visto que as bibliotecas foram montadas a partir de isolados diferentes de *C. perniciosa*.

A expressão de NIP-CP ORFI fundida a uma cauda de histidina em *E. coli* permitiu a sua purificação tanto sob condição nativa quanto em condição desnaturante. A infiltração de NIP-CP em meristemas de cacau (*Theobroma cacao*), variedade 'Catongo', e folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) resultou na formação de necrose 24 e 48 horas após infiltração, respectivamente. Visto que a proteína heteróloga foi ativa, esse fato demonstra que a glicosilação não é necessária para sua função.

Os resultados aqui apresentados correspondem ao primeiro relato de uma proteína indutora de necrose em um fungo basidiomiceto. Estudos adicionais estão sendo realizados para analisar o perfil de expressão deste gene durante as fases do desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: Indutor de necrose, elicitor, vassoura-de-bruxa e *Crinipellis perniciosa*

## ABSTRACT

MACÊDO, Joci Neuby Alves, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, august de 2004. **Functional characterization of the necrosis-inducing protein of *Crinipellis pernicios* in *Theobroma cacao* L.** Adviser: Júlio Cezar de Mattos Cascardo. Committee Members: Abelmon Gesteira and Andréa Cristina Mariano.

From the analysis of two DNA libraries (one genomic and another cDNA of an interaction cocoa x *C.pernicios* ), we have identified two sequences of a possible necrosis-inducing peptide, named NIP-CP ORFI and NIP-CP ORFII, respectively. These sequences showed significant similarity with necrosis-inducing proteins of *Phythophthora ssp.*, *Pythium aphanidermatum* and *Fusarium oxysporum* and *Bacillus Halodurans*. The amino acid deduced sequences of NIP-CP ORFI e NIP-CP ORFII presented conserved regions when compared with other necrosis-inducing proteins, mainly two cysteine residues that have been previously characterized as essentials for the functionality of these proteins. Furthermore, the sequences presented a signal peptide, N-glycosilation and phosphorylation sites in both ORFs. The sequence identity between NIP-CP ORFI e NIP-CP ORFII is 89.17%, with the higher divergence found at the signal peptide. *Southern blot* analyses revealed that it is present in the genome as a single copy, despite of the two different genes. This suggests that either they are arranged tandem in the genome or they are isoforms.

The cloning of the NIP-CP ORF1 fused in a histidine tag allowed its expression in *E. coli* and further purification aiming to perform functional studies. The analysis of the protein produced by *E. coli* demonstrated that it does not need to be glycosylated to be functional. The activity of the heterologous NIP-CP was assayed through the infiltration in *Theobroma cacao* meristems ('Catongo') and leaves of *Nicotiana tabacum* L., with the necrosis symptoms observed 24 and 48 hours, respectively. The results presented here correspond to the first report of this class of proteins in a basidiomycete.

## LISTA DE FIGURAS

1- Representação esquemática das respostas de defesa acionados pela planta contra o ataque de fitopatógenos.....	7
2- Esquema da clonagem da região codificadora do indutor de necrose de <i>C. pernicioso</i> (NIP-CP) no plasmídeo pET-15B.....	17
3- Análise filogenética.....	29
4- Alinhamento das seqüências dos indutores de necrose.....	30
5- Alinhamento das seqüências primárias dos possíveis indutores de necrose de <i>Crinipellis pernicioso</i> .....	32
6- Análise genômica do indutor de necrose de <i>Crinipellis pernicioso</i> .....	33
7- Expressão do indutor de necrose de <i>C. pernicioso</i> em bactéria.....	35
8- <i>Immunoblotting</i> .....	36
9- Identificação de NIP-CP em extratos de proteínas secretadas por <i>C. pernicioso</i> .....	37
10- Indução de necrose em <i>Theobroma cacao</i> L.....	38
11- Indução de necrose em <i>Nicotiana tabacum</i> L.....	39
12- Modelo proposto para o funcionamento de NIP-CP.....	45

## LISTA DE TABELAS

1-Percentagem de similaridade de seqüências de aminoácidos de indutores de necrose em relação a NIP-CP ORFI e NIP-CP ORFII.....	28
---	----

## 1. INTRODUÇÃO

A cacauicultura no sul da Bahia sofreu prejuízos econômicos de grande escala devido à propagação da vassoura-de-bruxa, doença causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer. O controle dessa doença tem-se baseado em técnicas como o controle químico e biológico, poda fitossanitária e o uso de cultivares resistentes. Alguns genótipos resistentes foram identificados como 'Scavina 6' e 'Scavina 12', que estão sendo usados como base para o melhoramento genético do cacauieiro (DIAS, 2001). Apesar de ser considerada a técnica mais promissora, os resultados obtidos com o uso de genótipos resistentes não têm sido satisfatórios, devido a grande variabilidade genética *C. perniciosa*.

Uma alternativa para a elaboração de novas estratégias para o controle da vassoura-de-bruxa é o estudo molecular da interação *C. perniciosa*-cacau. Com o advento das técnicas de biologia molecular, as metodologias estabelecidas para o estudo de genes em plantas-modelo e o projeto genoma do *C. perniciosa*, viabilizaram a identificação de genes envolvidos nesta interação e a elucidação de alguns mecanismos acionados no hospedeiro e no patógeno.

Estudos de interação planta-patógeno têm sido alvos de muitos projetos de pesquisas que visam elucidar os diferentes mecanismos de defesa acionados pela planta contra o ataque de patógenos. Vários elicitores, moléculas que induzem respostas de defesa na planta, estão sendo identificados em diferentes patógenos. Os elicitores podem ser proteínas, glicoproteínas, pequenos peptídeos ou oligossacarídeos. Esta diversidade química demonstra que plantas possuem sistemas de percepção eficientes para proteger-se do ataque do patógeno (MONTESANO et al.,

2003). Alguns elicitores que possuem a característica de induzir necrose e outras respostas de defesa em dicotilédoneas têm sido identificados e caracterizados em oomicetos e fungos ascomicetos (FELLBRICH et al., 2002; JENNINGS et al., 2001; QUTOB et al., 2002).

O estudo do envolvimento destas moléculas na indução de respostas de defesa tem permitido elucidar estratégias utilizadas pela planta para proteger-se contra o ataque de patógenos. Várias são as respostas de defesa induzidas por elicitores, como a síntese de proteínas PR, explosão oxidativa, abertura de canais de íons, fortificação da parede celular, resposta hipersensitiva, síntese de fitoalexinas, entre outras. Estes mecanismos de defesa acionados nos momentos iniciais da infecção são uma tentativa de conter o patógeno no sítio do ataque e em momentos mais tardios correspondem a uma forma da planta de obter “imunidade” contra o ataque de novos patógenos (HAMMOND-KOZACK ; JONES, 2000).

Diante deste contexto, o objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar funcionalmente o indutor de necrose de *C. perniciosa*, visto que durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa no cacauero ocorre a morte e necrose de tecidos, necessários à progressão da doença.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Theobroma cacao* L. e *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer

O cacauero é uma planta perene, arbórea, típica de clima tropical, originada da América Central e da Amazônia, cujo principal produto comercial são as amêndoas, matéria-prima da indústria de chocolate. As doenças que afetam a produtividade do cacauero são podridão-parda, vassoura-de-bruxa, morte-descendente e monilíase, causadas, respectivamente, pelos patógenos *Phytophthora spp.*, *Crinipellis pernicioso*, *Oncobasidium theobromae* e *Moniliophthora roreri* (DIAS, 2001). A vassoura-de-bruxa é a mais destrutiva doença do cacauero, provocando enormes prejuízos, e que foi primeiramente descrita em 1785, por Ferreira, quando nomeou as malformações por ele observadas de largatão (GRIFFITH et al., 1994; PURDY; SCHIMIDT, 1996). Mais de cem anos depois, a vassoura-de-bruxa foi detectada no Suriname (1895), Guiana (1906), Colômbia (1917), Equador (1921), Trinidad (1928), Tobaco (1939), Grenada (1948), St. Vicent (1988), Panamá e Brasil, em 1989 (PURDY; SCHIMIDT, 1996).

No Brasil, a vassoura-de-bruxa foi inicialmente identificada no município de Uruçuca, no sul da Bahia, e seis meses depois em Camacã (PEREIRA et al., 1989). A introdução da doença no centro da região cacauera, em dois pontos distantes, provavelmente ocorreu por intervenção humana, por meio da distribuição de amêndoas contaminadas provenientes da região endêmica Amazônica (ANDEBRHAN et al., 1999; PEREIRA et al., 1996). Nos últimos anos, a vassoura-de-bruxa tem sido sem dúvida o maior problema da cacauicultura brasileira, causando prejuízos na produção que

passaram o Brasil de país exportador para importador de cacau (DIAS, 2001). A devastação da cacauicultura no Brasil não se resumiu apenas a um problema econômico, mas atingiu dimensões sociais e ambientais na região sul da Bahia.

*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, basidiomiceto pertencente a ordem Agaricales, família Tricholomataceae, é o patógeno causador da vassoura-de-bruxa (SILVA et al., 2003). Ele é um fungo hemibiotrófico, cujos basidiósporos são hábeis para infectar tecidos meristemáticos de *Theobroma cacao* e outras espécies dos gêneros *Theobroma* e *Herrania*, representantes da família Sterculiaceae (GRIFFITH et al., 2003). Durante o processo de infecção, *Crinipellis perniciosa* passa pelas fases parasítica e saprofítica que estão associadas à presença de micélios monocarióticos e dicarióticos, respectivamente (PURDY; SCHMIDT, 1996). Os basidiósporos, únicas estruturas infectivas do patógeno, são uninucleados e liberados geralmente à noite quando propagados pelo vento e pela chuva. Ao atingirem gemas apicais e florais, produzem os tubos germinativos monocarióticos responsáveis pela penetração dos tecidos vegetativos. Nessa fase da doença apenas os micélios biotróficos estão presentes na vassoura verde, que corresponde ao sintoma mais drástico da doença, e é caracterizada pelo crescimento desordenado de brotos. O micélio monocariótico, localizado no espaço intercelular, permanece na planta por um período de seis a nove semanas, na qual a vassoura verde evolui para um processo de necrose tornando-se amarronzada. As vassouras, agora chamadas de vassouras secas, podem permanecer presas à planta ou podem cair na superfície do solo. Nesta etapa da doença, o micélio passa para a fase saprofítica onde ocorre a dicarionização com a formação dos basidiomas, subsequente frutificação e liberação dos basidiocarpos, fechando desta forma o ciclo de vida do patógeno (PURDY; SCHMIDT, 1996). Vários sintomas além das vassouras verdes e secas são observados durante o desenvolvimento da doença, como lesões nos frutos que tornam as amêndoas impróprias para a comercialização e formação de frutos com forma de morangos e cenouras (SILVA et al., 2003).

Vários métodos têm sido aplicados para o controle da vassoura-de-bruxa tais como: 1) poda fitossanitária, ou seja, remoção das partes da planta infectadas que são potenciais fontes de basidiocarpos; 2) controle químico, com o uso de fungicidas que previnam ou reduzam a formação de basidiocarpos, sendo que esta técnica é

recomendada juntamente com a poda fitossanitária em algumas áreas; 3) plantio de genótipos resistentes à vassoura-de-bruxa (PURDY; SCHMIDT, 1996). Além dessas técnicas, o fungo antagonista *Trichoderma ssp.* tem sido usado para o controle biológico da vassoura-de-bruxa (AZEVEDO et al., 2000; BASTOS, 1996). Na busca de genótipos resistentes, foram identificados em Trinidad as variedades 'Scavina 6' e 'Scavina 12'. Inicialmente, estes genótipos apresentaram elevada tolerância à vassoura-de-bruxa, sendo que posteriormente no Equador, Brasil e Peru tornaram-se susceptíveis (DIAS, 2001). Atualmente o Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC-BA), vem desenvolvendo pesquisas na tentativa de identificar novos genótipos resistentes à vassoura-de-bruxa, visando fornecer populações base para o melhoramento genético do cacauero.

## **2.2. Interação planta patógeno**

### **2.2.1. Aspectos gerais da interação planta-patógeno**

Plantas sofrem o ataque de patógenos por diferentes vias, tais como: penetração nos tecidos superficiais por ataque enzimático, invasão de tecidos que se encontram previamente feridos e entrada por orifícios naturais, como lenticelas e estômatos. A instalação dos fitopatógenos no hospedeiro pode se dar por estratégias distintas: necrotrófica, biotrófica e hemibiotrófica.

Fungos necrotróficos, como *Botrytis cinerea*, possuem mecanismos que os permitem propagar em ambientes de morte celular, ao invés de terem sua propagação contida (GOVRIN; LEVINE, 2000). A produção de enzimas capazes de remover ou inativar espécies de oxigênio reativo (ROS), produzidos durante a morte do tecido, é uma das estratégias utilizadas por estes organismos para sobreviverem e darem continuidade ao processo de infecção (MAYER, 2001). Patógenos biotróficos, possuem um estilo de vida oposto ao necrotrófico, pois necessitam dos tecidos vivos para se estabelecer no hospedeiro, além de causarem doenças a uma ou poucas espécies de hospedeiros relacionados (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997). Com uma estratégia

intermediária, os hemibiotróficos inicialmente mantêm as células do hospedeiro vivas, direcionando o metabolismo a seu favor, mas em estágios avançados da doença matam as células e completam seu ciclo de vida, como exemplo *Phytophthora*, *Colletotrichum* e *Crinipellis pernicioso* (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000; PURDY; SCHMIDT, 1996 ).

A interação entre a planta e o patógeno pode ser classificada de acordo com a especificidade entre os organismos, podendo ser compatível, quando na planta susceptível ocorre o desenvolvimento da doença devido ao ataque de um patógeno virulento, e incompatível, quando não há o desenvolvimento da doença em um hospedeiro resistente ao ser atacado por um patógeno avirulento (LAUGÉ; DE WIT, 1998). A resistência é determinada pela interação do gene de resistência (R) na planta e o correspondente gene de avirulência (avr) no patógeno, qualquer combinação diferente desta corresponde à susceptibilidade. Este reconhecimento genético na interação é explicado pela teoria gene-a-gene, descrita por Flor em 1946, em seu clássico trabalho sobre a interação de *Melampsora lini* e linho (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000; LAUGÉ; DE WIT, 1998)

Na interação incompatível, além das barreiras pré-formadas, a combinação com mecanismos de defesa induzida impede o sucesso da colonização pelo patógeno. O reconhecimento do patógeno pela emissão de sinal primário específico (produto do gene *Avr*), desencadeia uma série de outros sinais que conduz para ativação de genes relacionados aos processos de defesa (HONÉÉ, 1999). Na interação compatível, a ausência do sinal primário permite que o patógeno esquive-se da ativação dos mecanismos rápidos de defesa e colonize o hospedeiro (CORDEIRO; SÁ , 1999).

### **2.2.2. Respostas de defesa**

Ao longo da evolução, os fungos fitopatogênicos desenvolveram mecanismos para invasão e conseqüente penetração, como a síntese de enzimas capazes de degradar a cutícula e a parede celular do hospedeiro. A planta necessita de um eficiente sistema de “vigilância” para reconhecer os sinais de ataque de patógenos, ou seja, os elicitores e acionar os mecanismos de defesa. Inicialmente, a resposta de

defesa da planta resulta na formação de condições não favoráveis ao desenvolvimento e à propagação do patógeno, que apresenta como característica a morte celular localizada ao redor do ponto de invasão do patógeno. Esta resposta imediata da planta ao ataque de patógenos é chamada de resposta hipersensitiva (HEATH, 2000). Além da resposta hipersensitiva, outros mecanismos de defesa são acionados, os quais envolvem a ativação de genes relacionados à patogênese, a abertura de canais de íons, modificações nos estados de fosforilação de proteínas, a explosão oxidativa, a síntese de óxido nítrico, alterações nas vias de metabólitos secundários, o acúmulo de ácido salicílico e benzoico, a produção de etileno e ácido jasmônico e a síntese de glucanases e quitinases (proteínas PR), eventos estes que iniciam como uma resposta local e se estendem ao nível de resposta sistêmica (Figura 1) (EBEL; MITHÖFER, 1998; HAMMOND-KOSAK; JONES, 2000).

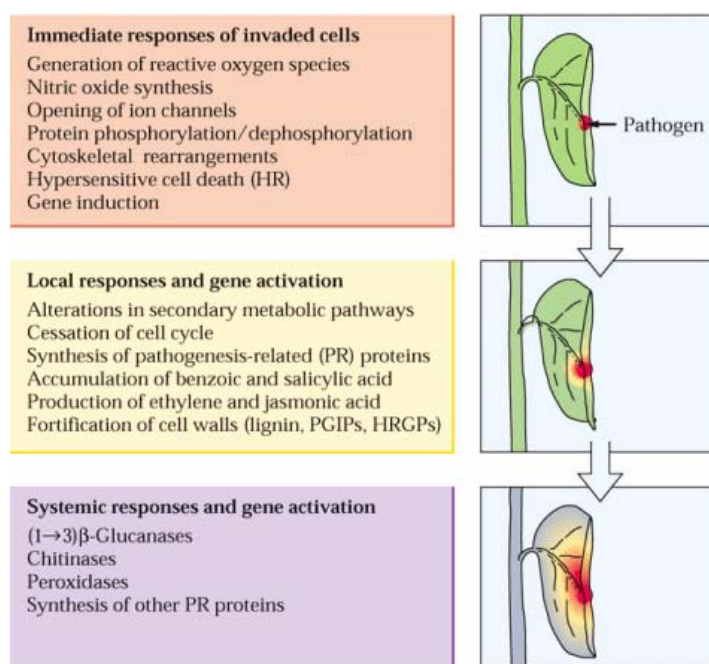


Figura 1 - Representação esquemática das respostas de defesa acionadas pela planta contra o ataque de fitopatógenos.

Fonte: HAMMOND-KOSAK; JONES, 2000.

Vários trabalhos têm demonstrado a importância de proteínas quinases no desenvolvimento de respostas de defesa. A ativação de MAPK quinases pelo elicitor Avr9 em cultura de células em suspensão de tabaco portadoras do gene de resistência *Cf-9*, constitui evidência da participação da fosforilação em etapas iniciais da sinalização (ROMEIS et al., 1999). Domínios quinase têm sido identificados em proteínas codificadas por genes de resistência, permitindo associar o envolvimento destas em processos de transdução de sinal (HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997). O gene de resistência *Pto* do tomate codifica uma serina/treonina quinase que interage com outras proteínas, possivelmente envolvendo fosforilação (ZHOU et al., 1995).

A explosão oxidativa é caracterizada pela formação dos chamados intermediários reativos de oxigênio (ROI), ou espécies de oxigênio reativas (ROS) ou espécies de oxigênio ativas (AOS), que participam de um sistema de sinalização, envolvendo o ácido salicílico (AS) e o cálcio ( $Ca^{2+}$ ) na indução de mecanismo de defesa (LAMB; DIXON, 1997). A produção de AOS durante a interação planta patógeno ocorre logo após o reconhecimento do patógeno pela planta e, em momentos mais tarde, células de tabaco inoculadas com *Phytophthora nicotianae* apresentaram explosões oxidativas no intervalo de duas horas após inoculação e oito horas depois, uma explosão mais forte foi observada (ABLE et al., 2000). Além da participação em resposta de defesa como HR, o  $H_2O_2$  contribui para reforçar estruturalmente a parede celular, através do *cross linking* de proteínas da parede celular com polissacarídeos da matriz ou aumentando a formação de polímeros de lignina pela ação das peroxidases (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

A produção de AOS está correlacionada à resposta hipersensitiva (HR), que leva à morte de células localizadas ao redor do sítio de infecção, restringindo o patógeno a pequenas áreas (DANGL et al., 2000; JACKSON; TAYLOR, 1996). Porém, apenas AOS não são suficientes para induzir a morte celular programada em resposta a HR, fazendo-se necessário fatores adicionais (MAYER et al., 2001; SASABE et al., 2000). Além da produção de AOS, a resposta hipersensitiva é caracterizada pela alteração do fluxo de íons, a síntese de componentes antimicrobianos como as fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR) (GREENBERG, 1997).

O ácido salicílico (AS), etileno (ET) e ácido jasmônico (AJ) são considerados moléculas sinalizadoras nos processos de defesa da planta. Estas moléculas parecem estar envolvidas em duas vias de sinalização da defesa, sendo uma dependente de AS e a outra independente de AS, mas que envolve o ET e AJ (KUNKEL; BROOKS, 2002). O uso de mutantes de *Arabidopsis* com fenótipos de insensibilidade a estes sinalizadores tem ajudado a elucidar as complexas vias que envolvem as moléculas sinalizadoras (GLAZEBROOK et al., 1997). O mutante de *Arabidopsis thaliana coi1-1*, insensível a MeJA (derivado metilado do ácido jasmônico), apresenta maior susceptibilidade aos fungos *Alternaria brassicicola* e *Botrytis cinerea* do que o tipo selvagem. Ao contrário, o genótipo de *Arabidopsis NahG*, que é uma planta transgênica que expressa o gene bacteriano *NahG*, cujo o produto converte o ácido salicílico em catecol, apresentou-se tão resistente quanto as plantas tipo-selvagens aos patógenos *A. brassicicola* e *B. cinerea* (THOMMA et al., 1998). Estes experimentos demonstram que plantas podem responder ao ataque de diferentes patógenos por vias de sinalização distintas.

O etileno é um fitohormônio que está envolvido em processos importantes, tais como, amadurecimento de frutos e senescência floral. O papel do etileno em mecanismos de defesa em plantas é controverso, pois, em algumas interações ele contribui para a resistência e, em outras, ele favorece o desenvolvimento da doença (KUNKEL; BROOKS, 2002). O mutante *Nr* de tomate, insensível a etileno, apresentou redução no desenvolvimento da doença em resposta à infecção pelas bactérias *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* pv *tomato* e ao fungo *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici* (LUND et al., 1998). Plantas transgênicas de *Arabidopsis* “super-expressando” o fator de resposta a etileno *ERF1* exibiram resistência ao ataque dos fungos necrotróficos *Botrytis cinerea* e *Plectosphaerella cucumerina* e tornaram-se mais susceptíveis que o tipo selvagem ao patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (BERROCAL-LOBO et al., 2002).

### 2.2.3. Elicitores

O termo elicitor foi primeiramente usado para definir moléculas capazes de induzirem a síntese de fitoalexinas, ou seja, compostos antimicrobianos em células vegetais. Atualmente, este termo é amplamente utilizado para moléculas que induzem diferentes mecanismos de defesa em plantas, tais como, resposta hipersensitiva (HR), produção de espécies de oxigênio ativas, lignificação da parede celular, produção de enzimas que degradam componentes da parede celular do patógeno, síntese de compostos capazes de inibir enzimas degradativas produzidas pelo patógeno e modificação da parede celular por deposição de calose (HANH, 1996).

Os elicitores compreendem tanto moléculas liberadas pelo patógeno, sendo chamados de exógenos, quanto componentes liberados pela planta por ação do ataque do patógeno denominados de endógenos (EBEL; COSIO, 1994). Oligossacarídeos, glicopeptídeos, peptídeos, proteínas e lipídeos representam a grande diversidade química dos elicitores, sugerindo que plantas possuem a habilidade de reconhecer moléculas distintas como sinais de patógeno para ativar defesa (MONTESANO et al., 2003).

De acordo com o grau de especificidade os elicitores podem ser classificados como gerais ou específicos. Os gerais são aqueles que induzem defesa tanto em plantas hospedeira e não hospedeiras, enquanto os específicos, induzem respostas de defesa que conduzem a resistência em interações incompatíveis (MONTESANO et al., 2003). Os elicitores específicos são representados pelos produtos dose genes *Avr*, os quais têm sido identificados em bactérias (LEACH; WHITE, 1996), vírus (PADGETT; BEACHY, 1993) e fungos (LAUGÉ; DE WIT, 1998). O gene *Avr9* codifica uma pré-proteína que, após o processamento do peptídeo sinal, sofre a ação de proteases do fungo e da planta, resultando no peptídeo funcional de 28 aminoácidos que foi demonstrado ser o único fator de resistência na interação *Cladosporium fulvum* e plantas de tomate com genótipo *Cf-9* (VAN DEN ACKERVEKEN et al., 1993). A transferência deste gene de raças avirulentas para raças virulentas do patógeno tornaram-nas avirulentas para o genótipo *Cf-9* (VAN DEN ACKERVEKEN et al., 1992).



A resistência na interação do *Tobacco mosaic virus* (TMV) com tomate que possui o gene *Tm-2*, está relacionada com a interação do produto deste gene com uma proteína de 30 kD do patógeno, cuja função parece estar relacionada com o movimento célula-a-célula (MESHİ et al., 1989). Além de proteínas codificadas por genes *Avr*, os elicitores específicos podem ser produtos da ação de enzimas codificadas por genes *Avr*. Os siringólides, produtos da ação da enzima codificada pelo gene de avirulência *avrD* de isolados de *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, induzem a HR em cultivares de soja que possuem o gene de resistência *Rpg4* (JI et al., 1998).

Menos específicos que os produtos dos genes *Avr*, as elicinas fazem parte de uma família de pequenas proteínas que possuem 98 aminoácidos que são secretadas por espécies de *Phytophthora* e *Pythium*. Estas proteínas induzem respostas de defesa em muitas espécies de *Nicotiana*, sendo estas respostas suficientes para protegê-las contra novas infecções por *Phytophthora*, bactérias, fungos e vírus (TYLER, 2002). Para algumas elicinas, parece existir uma maior especificidade, como exemplo a elicina INF1. O silenciamento do gene *inf1* em *Phytophthora infestans* permitiu demonstrar que este gene pode atuar como um fator de avirulência na interação *P. infestans-Nicotiana benthamiana*. A inoculação de transformantes deficientes na síntese da proteína INF1 foi suficiente para a formação de lesões da doença em folhas de *N. benthamiana*. Em contraste, a inoculação com a estirpe selvagem resultou apenas na resposta hipersensitiva (HR) (KAMOUN et al., 1998).

Elicitores como glicopeptídeos têm sido demonstrado não necessitarem de toda sua estrutura para induzirem respostas de defesa. Uma porção de treze aminoácidos, denominada Pep-13, de uma glicoproteína de 42 kDa, que é componente da parede celular de *Phytophthora sojae*, foi suficiente para ativar resposta de defesa em células de salsa. Além disso a atividade elicitora da glicoproteína foi sensível a ação de proteases e insensível a deglicosilação (PARKER et al., 1991). Em alguns casos, a supressão da resposta pode ser resultado da alteração na estrutura do elicitor. A clivagem enzimática de uma invertase de levedura resulta na liberação de pequenos glicopeptídeos que induzem respostas de defesa em células de tomate, porém a ação de enzimas proteolíticas sobre estes elicitores libera um oligossacarídeo capaz de suprimir a ação do elicitor (BASSE; BOLLER, 1992).

Oligossacarídeos são representantes de elicitores não protéicos, sendo muitos deles componentes estruturais da parede celular de fungos, como quitina e  $\beta$ -glucanos. Quitinas com diferentes graus de polimerização (GP) induzem respostas de defesa dependendo do sistema utilizado; células de arroz respondem a quitinas com  $GP \geq 6$  e células de tomate a quitinas com  $GP \geq 4$  (HANH, 1996). Dentre as respostas de defesa induzida por oligossacarídeos estão a síntese de fitoalexinas, despolarização da membrana, efluxo de  $Cl^-$  e  $K^+$ , produção de AOS, biossíntese de ácido jamônico e morte celular (HANH 1996; SHIBUYA; MINAMI 2001; ZUPPINI et al., 2003; YAMAGUCHI et al., 2000). Sendo quitinases e glucanases enzimas liberadas durante o processo de defesa, sugere-se que tais enzimas ao atuar sobre o patógeno para conter o seu desenvolvimento também possam liberar glucanos e quitinas que atuarão como elicitores, contribuindo para o aumento da defesa do hospedeiro (HANH 1996; SHIBUYA; MINAMI, 2001).

### **2.2.3.1. Indutores de necrose**

Alguns elicitores protéicos identificados em oomicetos, ascomicetos e bactérias apresentam característica comum de induzir necrose, além de apresentar alta similaridade de seqüência. A seqüência de aminoácidos destas proteínas varia de 234 a 253 aminoácidos, sendo que todas possuem um peptídeo sinal. A expressão heteróloga em *Escherichia coli* de PaNie (25 kDa *protein elicitor Pythium aphanidermatum*), permitiu demonstrar a sua função como indutor de necrose em *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*. Além da formação de necrose, foi observada a deposição de calose em células do mesófilo de *Arabidopsis*, caracterizando o enrijecimento da parede celular. Como resultado da aplicação de 100  $\eta$ M desta proteína em células em suspensão de cenoura foi observado um sintoma característico da morte celular programada, a fragmentação do DNA (laddering) (VEIT et al., 2001).

O indutor de necrose de *Phytophthora parasítica*, a proteína NPP1 (necrosis-inducing *phytophthora* protein 1) induziu a formação de necrose em folhas de salsa e tabaco, reduziu a viabilidade de protoplastos de salsa e induziu a biossíntese de etileno em células em suspensão de salsa (FELLBRICH et al., 2002). Em folhas de *Arabidopsis*

infiltradas com NPP1 observou-se a produção de ânion superóxido antes das lesões necróticas se tornarem visíveis. Na tentativa de identificar um peptídeo mínimo capaz de induzir resposta de defesa, várias deleções foram realizadas em NPP1. Apenas a proteína heteróloga com uma deleção de 8 aminoácidos no carboxi-terminal manteve sua atividade de induzir a síntese de fitoalexinas e a morte celular em folhas de tabaco quando comparada com a proteína intacta, indicando a importância da estrutura terciária na sua atividade. A indução de genes PR1 sob o estímulo de NPP1 em plantas de *Arabidopsis* foi dependente de ácido salicílico, já que mutantes de *Arabidopsis* NahG não acumularam transcritos de PR1 em contraste aos mutantes insensíveis para etileno e ácido jasmônico (FELLBRICH et al., 2002).

A co-expressão transitória do indutor de necrose do oomiceto hemibiotrófico *Phytophthora sojae*, PsojNIP (*P. sojae* necrosis-inducing protein), em hipocótilos de soja resultou na morte celular que foi observada pela ausência da expressão do gene repórter *GUS* ( $\beta$ -glucuronidase), utilizado como indicador da viabilidade celular. A expressão de PsojNIP durante o processo de infecção foi analisada por *northern blot*, e o acúmulo dos transcritos foi relacionado com a transição das fases biotróficas e necrotróficas. Nenhuma expressão de PsojNIP foi observada nos estágios iniciais da infecção correspondente a fase biotrófica do patógeno, sugerindo que esta proteína é um elicitor que acelera o processo de morte celular para o estabelecimento da fase necrotrófica do patógeno (QUTOB et al., 2002).

A proteína Nep1 (*necrosis and ethylene inducing peptide*) é uma proteína extracelular primeiramente identificada e purificada de meio de cultura de *Fusarium oxysporum*, possui a atividade de induzir necrose e a biossíntese de etileno em várias dicotiledôneas (BAILEY, 1995; JENNINGS et al., 2001). Em folhas de tabaco, a produção de etileno foi diretamente proporcional à concentração de Nep1 infiltradas e relacionada com o aumento do acúmulo de transcritos de ACC sintase e ACC oxidase, enzimas que atuam na biossíntese de etileno (JENNINGS et al., 2001). Nep1 quando aplicada como *spray* foliar em diferentes espécies de ervas daninhas causa necroses similares àquelas formadas por contato com herbicidas (JENNINGS et al., 2000). Além disso, a proteína Nep1 quando aplicada em combinação com herbicida químico 2,4-D ou glifosato em *Cetaurea maculosa* é observado inicialmente necrose foliar causada por

Nep1 e em seguida a morte da erva daninha causada pelo herbicida (BAILEY et al., 2000). Em trabalho mais recente, Keates et al. (2003) identificou genes induzidos por Nep1 em diferentes espécies de plantas através da técnica de *differential display*. Estes genes estão relacionados com a defesa da planta ou senescência ou respostas a estresse, como ferimento e seca.

Apesar da identificação de vários elicitores, entre eles os indutores de necrose, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares por eles ativados que desencadeiam as diversas respostas defesa nas plantas.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Análises de seqüências**

As análises de seqüências foram realizadas com programas disponíveis nos seguintes endereços eletrônicos: análise de similaridade de seqüências, BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; tradução das seqüências de nucleotídeos, ORF Finder <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>; predição do sítio de clivagem do peptídeo sinal, SignalP <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; alinhamento de seqüências, MultAlin <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html> e ClustalW1.8 <http://clustalw.genome.jp/>; predição de seqüências conservadas, PredictProtein <http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein/>. A árvore filogenética foi construída com o programa Clustal X e visualizada no programa Treeview, cujo *downloads* foram feitos nos endereços <http://www.crc.dk/dnatools/> e <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>, respectivamente.

#### **3.2. Clonagem molecular**

##### **3.2.1. Estratégia de clonagem**

A construção de DNA para expressar a proteína em bactéria foi realizada, conforme descrito abaixo, pela estudante de doutorado Odalys Garcia Cabrera, do

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP, Campinas, SP. O DNA foi cedido para os trabalhos realizados em parceria com o laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Ba.

Com o objetivo de expressar em bactéria uma versão da proteína indutora de necrose sem peptídeo sinal e fundida ao terminal amino uma cauda de histidina, derivada do vetor de expressão em bactéria pET-15b (NOVAGEN), foram sintetizados dois oligonucleotídeos específicos CPF-SPS Nde1F (5' gga aTt Cca tat GGC TCC ACA TCA GCT TCC 3'), coordenadas 45 e 74, que gera um sítio para a endonuclease *NdeI* e o oligonucleotídeo CPR-BamH1 (5'cGg gaT Cct TAC TAC CAC ATC CAA GCC C 3'), coordenadas 680 e 707, que gera um sítio para endonuclease *BamHI*, logo após o códon de terminação. Na reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), estes oligonucleotídeos foram utilizados para amplificar um fragmento de 662 pares de bases, tendo como molde DNA genômico de *Crinipellis pernicioso*. O fragmento amplificado foi clivado com as enzimas de restrição *BamHI* e *NdeI* e inserido no vetor pET-15b, clivado com as mesmas endonucleases, sob o controle do promotor da T7 RNA polimerase (Figura 2).

### 3.2.2. Preparo de células competentes

Células de bactérias competentes para transformação por choque térmico foram preparadas segundo Sambrook et al. (1989). Células de *Escherichia coli*, estirpe BL21(DE3)pLysS, foram inoculadas em 2,0 mL de meio LB broth (Tryptona 1%, NaCl 1% e extrato de levedura 0,5%) e incubadas a 37 °C, por 16 horas. A cultura foi transferida para 100 mL de meio LB broth e incubada sob as mesmas condições por aproximadamente 4 horas, até atingir absorvância a 600 nm ( $A_{600\text{ nm}}$ ) entre 0,5 a 0,7. As células foram incubadas no gelo por 10 minutos e coletadas por centrifugação, 5.000 x g, 4 °C por 10 minutos, em seguida, foram ressuspensas em 20 mL de  $\text{MgCl}_2$  100 mmol.L<sup>-1</sup> e concentradas por centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente. Durante 20 minutos, as células ressuspensas em 50 mL  $\text{CaCl}_2$  100 mmol.L<sup>-1</sup> foram incubadas no gelo, sendo em seguida coletadas por centrifugação a

5.000 x g, 4 °C, por 5 minutos. As células foram ressuspensas em 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mmol.L<sup>-1</sup> e 1,5 mL de glicerol 50%, distribuídas em alíquotas de 200 µL em microtubos de 1,5 mL e armazenadas a -80 °C.

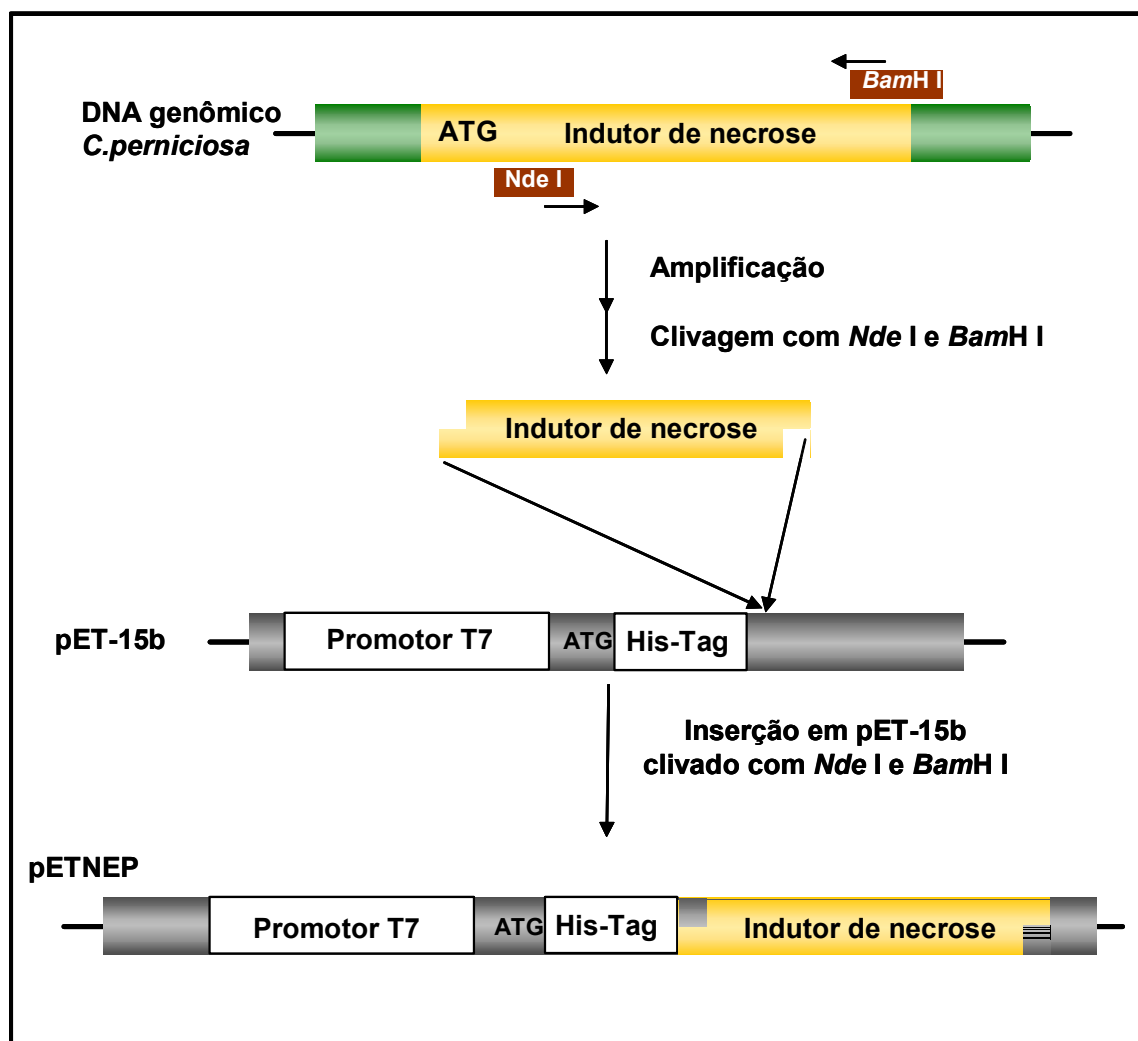


Figura 2 - Esquema da clonagem da região codificadora do indutor de necrose de *C.pernicioso* (NIP-CP) no plasmídeo pET-15B.

### 3.2.3. Transformação de bactéria por choque térmico

A transformação das células competentes BL21(DE3)pLysS com o vetor pET-15b recombinante foi realizada com a adição de aproximadamente 30 ng do DNA em uma alíquota de células descongelada. A suspensão foi mantida no gelo por 30 minutos. Após o choque térmico, por 2 minutos a 42 °C, foi adicionado 1 mL de meio LB broth, seguido por incubação a 37 °C, por uma hora. As células foram então concentradas por centrifugação, ressuspensas em 100 µL de meio LB e espalhadas em placas de petri contendo LB broth sólido, ampicilina 50 µg.mL<sup>-1</sup> e cloranfenicol 34 µg.mL<sup>-1</sup>, para seleção de colônias transformantes. As placas foram incubadas a 37 °C, por 16 horas.

### 3.2.4. Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

DNA plasmidial de colônias isoladas de transformantes foi extraído para posterior identificação do clone de interesse. Colônias de transformantes foram inoculadas em 2 mL de meio LB broth contendo ampicilina 50 µg.mL<sup>-1</sup> e incubadas a 37 °C, por 14 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 12.000 x g durante 30 segundos, a 4 °C, e ressuspensas em 200 µL de solução I (glicose 50 mmol.L<sup>-1</sup>, Tris-HCl 25 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0 e EDTA 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0). A lise alcalina das células ocorreu por adição de 200 µL de solução II (NaOH 0,2 N e SDS 1%) e incubação no gelo por 5 minutos. Ao lisado foi adicionado 200 µL de solução III (CH<sub>3</sub>COOK 3 mol.L<sup>-1</sup>) seguido por 5 minutos de incubação no gelo. Os restos celulares foram descartados por centrifugação a 12.000 x g, 4 °C, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionado igual volume de fenol:clorofórmio 1:1(v/v). A mistura foi agitada por 30 segundos e centrifugada por 3 minutos a 12.000 x g e 4 °C. A fase superior foi transferida para outro microtubo, adicionada igual volume de clorofórmio, agitada por 30 segundos e centrifugada sob as mesmas condições anteriores. A fase aquosa foi novamente transferida para outro microtubo e o DNA foi precipitado por adição de dois volumes de etanol absoluto, seguida de incubação por pelo menos 20 minutos, a -20 °C, e centrifugação por 15 minutos, a 12.000 x g. O DNA foi então lavado com 200 µL de



etanol 70%, seco a temperatura ambiente por 10 minutos e ressuspensão em 40 µL de água milli-Q.

### **3.2.5. Confirmação da inserção do plasmídeo recombinante em *E. coli***

Aproximadamente 600 ng de DNA plasmidial extraído de colônias transformantes foram clivados com as endonucleases *Hind*III e *Xba*I (PROMEGA) que flanqueiam os sítios de inserção do DNA de interesse no vetor pET-15b. Um fragmento de 1.000 pb foi observado após eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 0,25 µg.mL<sup>-1</sup>.

### **3.3. Expressão da proteína indutora de necrose em *E.coli***

Para determinar as melhores condições de indução da proteína heteróloga, um experimento piloto foi realizado para conhecer o melhor tempo de indução e a melhor concentração do agente indutor, IPTG. Uma colônia isolada do clone de *E. coli* transformada com a construção de DNA de interesse foi crescida em 2 mL de meio LB broth, contendo ampicilina 50 µg.mL<sup>-1</sup> e cloranfenicol 34 µg.mL<sup>-1</sup>, por 16 horas. As células foram coletadas por centrifugação a 7.000 x g, por 2 minutos, e ressuspensas em 2 mL de meio LB broth, com ampicilina 50 µg.mL<sup>-1</sup> e cloranfenicol 34 µg.mL<sup>-1</sup>. Foram distribuídos 100 µL de inóculo em alíquotas de 2 mL de LB broth com os antibióticos de seleção sob os seguintes tratamentos: 0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mmol.L<sup>-1</sup> de IPTG; em seguida foram incubadas a 37 °C e 180 rpm. Como controles, foram utilizados a estirpe de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com o plasmídeo e não transformada. Durante a indução foram coletadas alíquotas de 50 µL das culturas nos intervalos de 2, 3, 4 e 5 horas. As melhores condições de indução da síntese da proteína de interesse foram determinadas por separação do extrato protéico bruto por SDS-PAGE.

Com a finalidade de purificar a proteína heteróloga, foi realizada a indução da produção da proteína nas melhores condições previamente determinadas e seguindo

as recomendações do “pET System Manual” (NOVAGEN). Como descrito no experimento piloto, células de *E. coli* transformadas com a construção de DNA de interesse foram crescidas por 16 horas em meio LB broth com antibiótico de seleção, coletadas por centrifugação e ressuspensas em 2 mL de LB. O inóculo foi transferido para 100 mL de LB broth com cloranfenicol  $34 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , 180 rpm até atingir  $A_{600\text{nm}}$  0,6 a 1,0. Em seguida, as células foram submetidas à indução com IPTG  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , por 5 horas (determinado pelo experimento piloto). Após indução, as células foram mantidas no gelo por 5 minutos para cessar o crescimento, coletadas por centrifugação a  $5.000 \times g$  por 5 minutos e, em seguida, ressuspensas em  $\frac{1}{4}$  do volume de cultura de Tris-HCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 8,0 e EDTA  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  e centrifugadas como descrito anteriormente. O precipitado foi congelado em freezer a  $-80^\circ\text{C}$ .

### **3.4. Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade**

A purificação da proteína heteróloga foi realizada sob condições nativa e desnaturante, seguindo basicamente as recomendações do “pET System Manual” (NOVAGEN). Para purificação da proteína sob condição desnaturante, as células congeladas após indução foram descongeladas, ressuspensas em 40 mL de tampão de ligação 1X (Tris-HCl  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 7,9, Imidazol  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , NaCl  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e centrifugadas a  $5.000 \times g$  por 40 minutos. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 20 mL de tampão de ligação 1X, centrifugado como descrito anteriormente. A solubilização das proteínas foi realizada com incubação por uma hora no gelo, após o precipitado ser ressuspenso em 5 mL de tampão de ligação 1X com uréia  $6 \text{ mol.L}^{-1}$ . Os restos celulares foram eliminados por centrifugação a  $5.000 \times g$  por 40 minutos, o sobrenadante filtrado em membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  e aplicado em coluna de cromatografia por afinidade contendo a resina “Chelating Sepharose” (Pharmacia) ativada com  $\text{Ni}^{++}$ .

Para o preparo da coluna cromatográfica, a resina “Chelating Sepharose” (Pharmacia) foi homogeneizada por inversão e, em seguida, empacotada por gravidade em uma seringa de 2,5 mL, até completa drenagem do etanol 20%. A resina foi lavada com 7,5 mL (3 volumes) de  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada, ativada com 12,5 mL de tampão de troca

1X ( $\text{NiSO}_4$  50  $\text{mmol.L}^{-1}$ ) e equilibrada com 7,5 mL (3 volumes) de tampão de ligação 1X com uréia 6  $\text{mol.L}^{-1}$ . O extrato de proteínas total foi aplicado à coluna, em seguida a coluna foi lavada com 25 mL (10 volumes) de tampão de ligação 1X com uréia 6  $\text{mol.L}^{-1}$  e 15 mL de tampão de imidazol 20  $\text{mmol.L}^{-1}$  (11 mL de tampão de ligação 1X, 4,1 mL de tampão de lavagem 1X e uréia 6  $\text{mol.L}^{-1}$ ). A proteína heteróloga foi eluída com 15 mL (6 volumes) de tampão de eluição (Tri-HCl 20  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,9, imidazol 1  $\text{mol.L}^{-1}$ , NaCl 0,5  $\text{mol.L}^{-1}$ ) contendo uréia 6  $\text{mol.L}^{-1}$ . Frações de 600  $\mu\text{L}$  foram coletadas da eluída e analisadas por SDS-PAGE, usando gel de acrilamida 15% (p/v), conforme descrito por Laemmli (1970). As frações enriquecidas com a proteína recombinante foram armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ .

Na purificação da proteína heteróloga sob condição nativa, as células descongeladas foram ressuspensas em 4 mL de tampão de ligação 1X e Tween-20 0,1%, o lisado foi centrifugado a 5.000 x g por 40 minutos para precipitar os restos celulares. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e aplicado na coluna de cromatografia contendo a resina "Chelating Sepharose" (Pharmacia). Todo o procedimento de purificação da proteína heteróloga é basicamente igual à purificação sob condição desnaturante, com exceção que em nenhum dos tampões o agente desnaturante, uréia 6  $\text{mol.L}^{-1}$ , foi adicionado e a lavagem da coluna após passagem do extrato protéico foi feita primeiramente com 25 mL de tampão de ligação 1X e, em seguida, com 15 mL de tampão de lavagem 1X (Tris-HCl 20  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,9, imidazol 60  $\text{mmol.L}^{-1}$  e NaCl 0,5  $\text{mol.L}^{-1}$ ). Após análise por SDS-PAGE, as frações enriquecidas com a proteína de interesse foram armazenadas a  $4^\circ\text{C}$ .

### **3.5. Purificação de anticorpo contra a proteína indutora de necrose**

O anticorpo policlonal contra a proteína heteróloga foi produzido pela estudante de doutorado Odalys Garcia Cabrera, do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP, Campinas, SP. O soro foi cedido ao laboratório de Genética e Biologia Molecular onde procedeu a imunopurificação por afinidade.

As duas frações mais enriquecidas com a proteína recombinante, produzida em *E. coli* e purificada sob condição desnaturante, foram distribuídas em 50 cm<sup>2</sup> de membrana de nitrocelulose (Hybond C- Amersham Biosciences); em seguida a membrana foi lavada duas vezes de 5 minutos cada, com TBS-T 1X (Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH7,6, NaCl 0,14 mmol.L<sup>-1</sup>e Tween-20 0,1%) e incubada com 50 mL de reagente de bloqueio (leite em pó desnatado 5% em TBS-T 1 X), por uma hora. Após o bloqueio da membrana foram realizadas três lavagens de 15 minutos cada com TBS-T 1X. A membrana foi subsequentemente incubada durante 4 horas com o soro diluído 1:50 em TBS-T. Três lavagens de 5 minutos cada foram feitas para remover as ligações inespecíficas. O anticorpo monoespecífico para a proteína recombinante foi eluído com incubação por uma hora em glicina 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 2,9. O armazenamento do anticorpo monoespecífico a 4 °C foi realizado após adição de 10 mL de TBS-T 10 X , aferição do pH da solução para 7,6 e do volume para 100 mL.

### **3.6. SDS-PAGE e immunoblotting**

Os extratos de proteína total de bactérias, proteína heteróloga purificada e proteínas secretadas por *Crinipellis pernicioso* foram analisados por SDS-PAGE 12,5% e 15%, seguido por *immunoblotting*. Eletroforeses em géis de poliacrilamida foram realizadas como descrito por Laemmili (1970), exceto que a concentração do gel de empilhamento foi de 5 %. As amostras de proteína foram incubadas em tampão da amostra [glicerol 10 % (v/v), SDS 2,3 %, azul-de-bromofenol 0,25 %, 2-mercaptoetanol 5 % (v/v), e Tris-HCl 62,5 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 6,8] por cinco minutos, a 100 °C, antes de ser aplicado no gel. O fracionamento das proteínas foi conduzido por aproximadamente 2 horas, a 150 V, em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mmol.L<sup>-1</sup>, glicina 200 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup> e SDS 3,5 mmol.L<sup>-1</sup>). Após a eletroforese, os géis foram incubados em solução corante [metanol 25 % (v/v), ácido acético glacial 10 % (v/v) e “coomassie brilliant blue R250” 0,25 % (p/v)] por 5 horas e, em seguida, descorado em solução ácido acético glacial 7 % (v/v).

Os *immunoblottings* foram realizados com a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, usando-se o sistema de transferência da BIO-RAD, de acordo com as instruções do fabricante. Após a transferência por uma hora a 250 mA em tampão de transferência (glicina 39 mmol.L<sup>-1</sup>, Tris-HCl 48 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,3, SDS 0,037% e metanol 20%), as membranas de nitrocelulose foram incubadas com o reagente de bloqueio (leite em pó desnatado 5% em TBS-T) por uma hora, sob leve agitação. As membranas foram lavadas com TBS-T [Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,6, NaCl 0,14 mmol.L<sup>-1</sup>, Tween-20 0,1 % (v/v)] três vezes, por 15 minutos cada lavagem, e incubadas com o anticorpo monoespecífico contra a proteína indutora de necrose, por uma hora sob agitação. Em seguida, foram feitas três lavagens de 15 minutos com TBS-T, e a membrana foi incubada com o anticorpo contra IgG conjugada à fosfatase alcalina (SIGMA), numa diluição de 1:5.000, por uma hora. A atividade da fosfatase alcalina foi detectada, usando-se o sistema de detecção NBT/BCIP (azul de nitrotetrazólio/5-bromo-4-cloro-indolilfosfato) (GIBCO/BRL).

### **3.7. Cultivo de *Crinipellis perniciosa* em meio líquido**

Micélios de *C. perniciosa* foram inoculados em meio líquido composto por Glicose 1% (p/v), NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (p/v), KCl 0,02% (p/v), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,02% (p/v), CuSO<sub>4</sub> 0,005% (p/v), ZnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O 0,001% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v); mantido a 24 °C sem agitação por 10 a 14 dias. Após o período de incubação, o micélio foi utilizado para extração de DNA e o meio líquido para purificação de proteínas secretadas.

### **3.8. Extração de proteínas secretadas em meio de cultura de *C. perniciosa***

O meio de cultura de *C. perniciosa* foi recolhido e liofilizado, após o período de incubação, para retirar toda a água; em seguida procedeu-se a extração de proteína baseado no método descrito por Wang et al., 2003.

A 0,1 g do material desidratado adicionou-se 800  $\mu\text{L}$  de fenol tamponado , pH 8,0 e 800  $\mu\text{L}$  de tampão SDS denso [sacarose 30% (p/v), SDS 2% (p/v), Tris-HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0 e  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v)]. Em seguida, agitou-se vigorosamente e centrifugou-se a 10.000 x g por 3 minutos. A precipitação das proteínas foi realizada por recuperação da fase superior com adição de 5 volumes de metanol gelado, contendo 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de acetato de amônio, seguido por incubação a -20 °C por 14 horas. As proteínas foram recuperadas por centrifugação 10.000 x g por 5 minutos, seguida de duas lavagens do precipitado com metanol gelado, contendo 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de acetato de amônio, e duas lavagens com acetona 80% gelada. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e as proteínas ressuspensas em 70  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 25 mmol.L<sup>-1</sup>, glicina 200 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol.L<sup>-1</sup> e SDS 3,5 mmol.L<sup>-1</sup> (tampão de corrida para SDS-PAGE).

### **3.9. Extração de DNA genômico de *Crinipellis pernicios***

O DNA foi extraído como descrito por Zolan e Pukkila (1986). O micélio de *C. pernicios* foi macerado em nitrogênio líquido e às alíquotas de 40 mg do macerado adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (CTAB 1%, NaCl 0,7 mol.L<sup>-1</sup>, Tris-HCl 20 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0, EDTA 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0 e  $\beta$ -mercaptoetanol 1%) misturando-se bem. Em seguida, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v), centrifugado a 20.000 x g por 5 minutos e a fase aquosa contendo o DNA foi recolhida. O DNA foi precipitado por adição de um volume de isopropanol, seguido de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugação por 1 minuto a 20.000 x g. O precipitado de DNA foi ressuspensão em 300  $\mu\text{L}$  de TE (Tris-HCl 10 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0 e EDTA 1 mmol/L) com RNase (livre de DNase) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e incubado por 30 minutos a 37 °C para degradar os RNAs presentes. A solução de DNA foi limpa com a adição de 300  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v), seguida de agitação e centrifugação por 5 minutos a 20.000 x g. A fase aquosa foi recolhida adicionando-se 75  $\mu\text{L}$  de CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 7,5 mol.L<sup>-1</sup> e 750  $\mu\text{L}$  de etanol 95%, incubando-se por 20 minutos a -20 °C a fim de precipitar o DNA. Após centrifugação por 1 minuto a 20.000 x g, o DNA

precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente e solubilizado em 50 µL de água milli-Q.

### **3.10. Southern Blot**

A técnica de transferência de *southern* foi realizada segundo Sambrook et al. (1989) e para marcação da sonda e detecção do sinal utilizou-se o kit “Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection system” (Amersham Biosciences) conforme as recomendações do fabricante.

Três alíquotas de 6 µg de DNA genômico de *C. pernicioso* foram clivadas com 12 unidades das enzimas de restrição *Bam*H I, *Hind* III ou *Pst* I. O DNA digerido foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo 0,25 µg.mL<sup>-1</sup>. Após eletroforese, o gel foi transferido para um recipiente onde foi incubado sob leve agitação na solução de depuração (HCl 0,2 mol.L<sup>-1</sup>) por 15 minutos, seguido de duas incubações de 30 minutos na solução de desnaturação (NaOH 0,5 N e NaCl 1,5 mol.L<sup>-1</sup>) e duas incubações de 30 minutos na solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,2 e NaCl 1,5 mol.L<sup>-1</sup>). O DNA foi transferido para membrana de náilon (Hybound N – Amersham Biosciences) por capilaridade em 16 horas. Para tal, nos reservatórios de uma cuba de eletroforese horizontal foram colocados SSC 20X (NaCl 3 mol.L<sup>-1</sup>, citrato de sódio 0,3 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0). Sobre a plataforma da cuba foram colocadas três folhas de papel de filtro (3MM) embebidas em SSC 20 X, formando uma ponte. Sobre a ponte foram colocados na seguinte ordem o gel, membrana de náilon e três pedaços de papel de filtro umedecidos em SSC 20 X, uma camada de papel toalha de 10 cm de altura, uma placa de vidro e um peso de aproximadamente 1 kg. O aparato de transferência foi desmontado e a membrana foi lavada em SSC 2 X (NaCl 0,3 mol.L<sup>-1</sup> e citrato de sódio 0,03 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0). O DNA foi fixado na membrana por incidência de luz UV usando Spectro Linker™ XL-1000 UV Crosslynker.

A marcação da sonda foi realizada com o kit “Gene Images Alkphos direct labelling and detection system” (Amersham Biosciences), seguindo as recomendações do fabricante. Na reação foram usados 200 ηg de um fragmento de 550 pb correspondente à região central da seqüência de NIP-CP ORFII desnaturado por

aquecimento. A marcação ocorreu via ligação covalente da enzima fosfatase alcalina ao DNA fita simples.

A membrana foi pré-hibridizada com 0,2 mL.cm<sup>-2</sup> de tampão de hibridização do fabricante, com NaCl 0,5 mol.L<sup>-1</sup> e reagente de bloqueio do kit 4% (p/v), por 1 hora a 55°C. Em seguida, a sonda foi adicionada ao tampão procedendo a hibridização por 16 horas a 55 °C. As lavagens da membrana foram realizadas a 55 °C por duas vezes de 10 minutos em tampão contendo uréia 2 mol.L<sup>-1</sup>, SDS 0,1% (p/v), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, NaCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>, MgCl<sub>2</sub> 1 mmol.L<sup>-1</sup> e reagente de bloqueio 0,2% (p/v) e por duas vezes de 5 minutos a temperatura ambiente em Tris base 50 mmol.L<sup>-1</sup>, NaCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e MgCl<sub>2</sub> 2 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 10,0.

A detecção do sinal foi realizada por degradação do substrato dioxetano, CDP Star (Amersham Biosciences), pela ação enzimática da fosfatase alcalina. A energia luminosa emitida foi observada por sensibilização do Hyperfilm ECL após 20 horas de exposição, seguida de revelação por autoradiografia.

### **3.11. Análise da atividade de indução de necrose da proteína recombinante em plantas.**

Plantas de *Nicotina tabacum* L. (tabaco) e *Theobroma cacao* L. (var. 'Catongo'), com 90 e 60 dias respectivamente, foram infiltradas com a proteína indutora de necrose (NIP-CP) produzida em *E. coli*, purificada sob condição nativa e dializada contra tampão fosfato de potássio 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 6,0. O volume de 20 µL de NIP-CP, correspondente a 1,4 µmol.L<sup>-1</sup> foi infiltrado no mesófilo foliar, abaixo da epiderme das plantas de tabaco, e no meristema das plantas de cacau. Como controle foram usados o mesmo volume e concentração de tampão fosfato e BSA (Albumina Soro Bovina), respectivamente. A infiltração foi realizada com seringa para insulina.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise de seqüências de indutores de necrose de *Crinipellis pernicioso*

Durante o seqüenciamento e processo de pré-anotação automática do genoma do *C. pernicioso* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>), foram observadas seqüências genômicas correspondentes a fragmentos de um possível gene que apresentava homologia com proteínas indutoras de necrose. O alinhamento destas seqüências resultou na montagem de um *contig* (seqüência maior e contínua gerada pelo agrupamento de seqüências que apresentam regiões sobreposta), cuja seqüência de nucleotídeos foi comparada com o banco de dados público *GenBank*, utilizando o programa BLASTX (ALTSCHUL et al., 1997), confirmando a similaridade com seqüências de indutores de necrose já caracterizadas. A seqüência de nucleotídeos foi traduzida e uma ORF (*open reading frame*) de 696 nucleotídeos que codifica uma proteína de 231 aminoácidos foi assim identificada e denominada de NIP-CP ORFI.

Uma segunda ORF, denominada de NIP-CP ORFII, foi identificada a partir da análise do banco de dados de uma biblioteca de cDNA, correspondente a interação compatível entre *Crinipellis pernicioso* -*Theobroma cacao*. Esta seqüência foi traduzida para aminoácidos e uma ORF de 693 nucleotídeos que codifica uma proteína de 230 aminoácidos foi confirmada possuir homologia com indutores de necrose, por análise comparativa com seqüências do *GenBank*.

As seqüências de NIP-CP ORFI e NIP-CP ORFII foram comparadas com seqüências do *GenBank* apresentando similaridade com indutores de necrose de

diferentes organismos (Tabela 1). A menor similaridade foi de 49,3% com a proteína Nep1 de *Fusarium oxysporum* para NIP-CP ORFI e de 51,3% com a proteína de *Bacillus halodurans* em relação a NIP-CP ORFII. A percentagem de similaridade com proteínas de oomicetos foram as maiores, sendo 56,3% com a proteína de 25 kDa PaNie, de *Pythium aphanidermatum*, e 57,8% com a proteína indutora de necrose NPP1 de *Phytophthora infestans* em relação a NIP-CP ORFI e NIP-CP ORFII, respectivamente.

Tabela 1 - Percentagem de similaridade de seqüências de aminoácidos de indutores de necrose em relação a NIP-CP ORFI e NIP-CP ORFII

<b>Elicitor</b>	<b>Número de acesso</b>	<b>NIP-CP ORFI</b>	<b>NIP-CP ORFII</b>
PaNie ( <i>Pythium aphanidermatum</i> )	AAD53944	56,3	56,9
NPP1 ( <i>Phytophthora parasitica</i> )	AAK19753	55,8	56,5
PsojNIP ( <i>Phytophthora sojae</i> )	AAK01636	52,8	56,5
NPP1 ( <i>Phytophthora infestans</i> )	AAK25828	52,8	57,8
Proteína indutora de etileno e necrose ( <i>Bacillus.halodurans</i> )	BAB04114	51,0	48,7
Nep1 ( <i>Fusarium .oxysporum</i> f. sp. <i>Erythroxyli</i> )	AAC97382	49,3	51,7

Uma árvore filogenética baseada nas seqüências dos indutores de necrose presentes na Tabela 1, foi construída usando o programa ClustalX (Figura 3). As seqüências de *C. pernicioso* foram agrupadas com todos os oomicetos (*Pythium* e *Phytophthora* spp.), confirmando a maior similaridade entre elas. Um segundo grupo foi formado pelas seqüências do ascomiceto (*F. oxysporum*) e do *Bacillus*, representando maior divergência em relação às seqüências de *C. pernicioso* (vide Tabela 1).

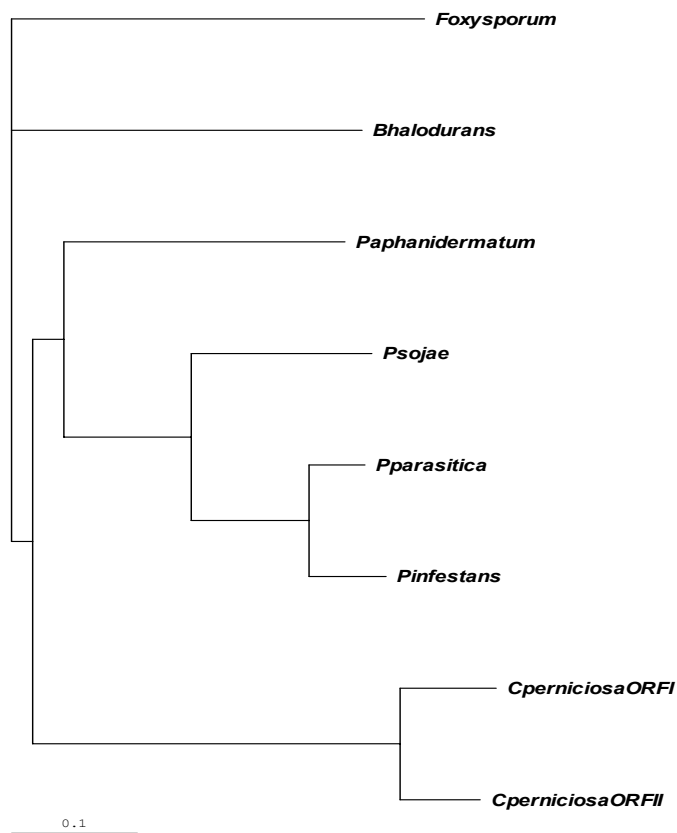


Figura 3 - Análise filogenética. A análise de comparação de seqüências inteiras das proteínas indutoras de necrose foi realizada utilizando-se o programa ClustalX, e a árvore filogenética foi visualizada utilizando-se programa TreeView. O número de acesso das seqüências depositadas no GenBank estão listados na Tabela 1. A escala representa 10% de divergência de seqüência.

O alinhamento de seqüência dos indutores de necrose *C. perniciosa* com as seqüências dos indutores de necrose de *F. oxysporum*, *B. halodurans*, *P.aphanidermatum* e espécies de *Phytophthora*, permitiu a identificação de algumas regiões conservadas com 2, 3, 4 e 7 aminoácidos presentes em todas as seqüências (Figura 4). Além destas regiões, alguns aminoácidos isolados são comuns a todos os elicitores, destacando-se dois resíduos de cisteína nas posições 53 e 79 de NIP-CP ORFI e 52 e 78 de NIP-CP ORFII.

CperniciosaI	MLYSSLLIVVLFIVTRMSAP-----HQLPHDQIAKFPKS-----GGPLETQYQ	44
CperniciosaII	MQLQNFLSIVLLVSVGAIAG-----TVMDHDKIAKLPAS-----GSPLETKFQ	43
Foxysporum	MHPQTFINALVALAATGMAAPSEALNNLHARAVVNHD <sup>↓</sup> SLNPVKKT-IEGGAIGAAIDRWQ	59
Bhalodurans	MMRFVIGFLLSILASISLVSPANA-----AVIDHDKVVGFEEV-TPTTTTQKVAKRQ	52
Pparasitica	MN--VLTFLIAAAVSLAVVQ-----ADVISHD <sup>↓</sup> AVVPFAQP-TATTTEQKAGVKFK	47
Pinfestans	MN--ILQLFASAAAALTVAH-----ADVISHDAVIPPFAQPTTTTTEQKAGIKFK	48
Psojæ	MN--LRPALLATLASFAYVS-----ASVINHD <sup>↓</sup> QVVPFTQP-TPTTALQQAQVYK	47
Pphanidermatum	MVRFVSALLLAAAGVLASTN-----AAVINHD <sup>↓</sup> AVPVWPQP-EPADATQALAVRFK	49
CperniciosaI	PALHIGNGCHSYPAVDVDGN <sup>↓</sup> SSGGLKPTGAPSAACKDTSK-AQTYVRSATFQKKTALVYA	103
CperniciosaII	PQLHIGNGCHSYPAVDAQGN <sup>↓</sup> SSGGLKPTGAPSAACKDTSK-AQTYVRSATFQKKTALVYA	102
Foxysporum	PLLHIADGCQPYTAVDTN <sup>↓</sup> GNVSSGGLQDSGSKTGGCKDTSK-GQTYARAAMHNGKLAIMYA	118
Bhalodurans	PYLTVSTGCVPPPAVDADGN <sup>↓</sup> SSGGLAPTGPHTGGCS-SHI-GQVYSRSTWHNGVWAIMYA	110
Pparasitica	PQIHISNGCHPYPAVDANGN <sup>↓</sup> SSGGLKPTGSSSAGCKGSGYGSQVYGRVATYNGVYAIMYS	107
Pinfestans	PQIHISNGCHPYPAVDADGN <sup>↓</sup> SSGGLNPTGSSSAGCKGSGYGSQIYGRVATYNGVYAIMYS	108
Psojæ	PQIHISNGCHPYPAVDNNGN <sup>↓</sup> SSGGLNPTGSESAGCKGSGYGTQIYGRVATYNGVYAIMYS	107
Pphanidermatum	PQLDVVNGCQPYPAVD <sup>↓</sup> PQGN <sup>↓</sup> SSGGLKPSGSAACCRDMSK-AQVYSRSGTYNGVYAIMYS	108
CperniciosaI	WYMPKDEISTG---IGHRHDWEGAVVFLNS---DTQQIDGVAASA <sup>↓</sup> HGKWRKYPNPGGANI	157
CperniciosaII	WYMPKDEISTG---IGHRHDWEGAVVFLNS---DTQQIDGVAASA <sup>↓</sup> HGKWRKYPNPGGANI	156
Foxysporum	WYWPQDQPADGNLVS <sup>↓</sup> GHRHDWENVVVIDNYQSPGATLYAAAA <sup>↓</sup> SGHDYKKTKNPQRSG-	177
Bhalodurans	WYFPKDSPTG---LGH <sup>↓</sup> RHDWEGIVVWVDNPNPSPQLLSIAYS <sup>↓</sup> QHGNFYNVAPTDRNTR	167
Pparasitica	WYFPKDSPTG---LGH <sup>↓</sup> RHDWEHV <sup>↓</sup> VWDDIKLSDPSIIAVSPSAHSGYNIYPPESNTI	164
Pinfestans	WYFPKDSPLTG---LGH <sup>↓</sup> RHDWEHV <sup>↓</sup> VWDDIKLNSPSVIAVSPSAHSGYNIYPPESNTI	165
Psojæ	WYMPKDETLTG---LGH <sup>↓</sup> RHDWEACV <sup>↓</sup> VWDDIAASSPKIVALSA <sup>↓</sup> HSGYNYKYPSSSYF	164
Pphanidermatum	WYMPKDSPTG---IGHRHDWENVVWLDN--AASANIVALSA <sup>↓</sup> HSGYKSFADKSYL	163
CperniciosaI	DDTHVKLQYSAEPVINS <sup>↓</sup> HALDLTDKGGDLPTLASWEGMGADARA <sup>↓</sup> AINE-----RSHWGD	211
CperniciosaII	DDTHVKLQYSAEPVINS <sup>↓</sup> HALDLTDKGGDLPTLASWEGMGADARA <sup>↓</sup> AINE-----RSHWGD	210
Foxysporum	--NNVMAEYFTSFG-KNHELQFKTSPGR <sup>↓</sup> TYWIYDWAAMT <sup>↓</sup> PAQKGLITGPGSDPNKPWGS	234
Bhalodurans	E-QRPLIRYSHAWP-LN <sup>↓</sup> HSLWIHDQVGGTQPLIGWDDLT <sup>↓</sup> PARHALNT-----TDFGA	218
Pparasitica	DGYSAKVDYSSSWVIN <sup>↓</sup> HALDSTTDA <sup>↓</sup> GETQDLIMWDQLTDA <sup>↓</sup> ARTALEN-----TDFGD	217
Pinfestans	DGYSTKVDYSSSWLVIN <sup>↓</sup> HALDSTTDA <sup>↓</sup> GETQNLIMWDQLTDA <sup>↓</sup> ARTALEN-----TDFGD	218
Psojæ	SGNSAKIDYSSSYVIN <sup>↓</sup> HALSATSTAGETQPLIMWDQLTDA <sup>↓</sup> ARRALED-----TDFGD	217
Pphanidermatum	DGITAKISYKSTWP-LD <sup>↓</sup> HELGFTTSACKQQLIQ <sup>↓</sup> WEQMTQA <sup>↓</sup> ARDALES-----TDFGN	215
CperniciosaI	ANPFIADSLIDSSLSGAWMW	231
CperniciosaII	ANPFIADSLIGSSLSGAWMW	230
Foxysporum	ANVPFIDANFGNNLNKAWM-	253
Bhalodurans	ANVPFNDHNFINNLRKAWYR	238
Pparasitica	ANVPMKDGFLTKVGNAYYA	237
Pinfestans	ANVPMKDGFLTKVGNAYYA	238
Psojæ	ANVPFKDANFQTKLGNAYYA	237
Pphanidermatum	ANVPFKS-NFQDKLVK <sup>↓</sup> AFQ	234

Figura 4 – Alinhamento das seqüências dos indutores de necrose. Seqüência deduzida de aminoácidos dos indutores de necrose de *C. perniciosa* foram alinhadas com seqüências de proteínas relacionadas, depositadas no *GenBank*. O alinhamento foi realizado utilizando o programa ClustalW 1.8. Os aminoácidos em vermelho estão presentes em todas as seqüências. A seta azul destaca os resíduos de cisteínas conservados entre as seqüências. Os sítios consensos de N-glicosilação conservados entre as seqüências estão sublinhados.

As seqüências NIP-CP ORFI e NIP-CP ORFII de *Crinipellis pernicioso* contêm sítios potenciais de N-glicosilação e fosforilação (Figura 5). As seqüências “TSK” e “TDK”, consensos para fosforilação por proteína quinase C, e a seqüência “NWS” consenso para N-glicosilação, estão presentes em ambas ORFs. Em contraste, o consenso para fosforilação por caseína quinase II, “SLID” aparece apenas na ORFI e os consensos “TVMD” e “SPLE” estão presentes na ORFII.

Na extremidade carboxila das proteínas foi identificada o sítio de clivagem do peptídeo sinal, representado pelos resíduos de aminoácidos das posições 19 e 20 em NIP-CP ORFI e NIP-CP ORF II. As seqüências de aminoácidos dos elicitores de *C. pernicioso* possuem 89,17% de identidade, sendo a maior divergência observada na região correspondente ao peptídeo sinal (19 aminoácidos iniciais) (Figura 5).

A clivagem do peptídeo sinal das seqüências de NIP-CP ORFI e NIP-CP ORFII resulta em proteínas maduras com 212 e 211 aminoácidos e com massas 22698.09 Da e 22464,75 Da, respectivamente.

#### **4.2. Detecção do número de cópias gênicas do indutor de necrose de *C. pernicioso***

O DNA genômico de *Crinipellis pernicioso* foi digerido com enzimas de restrição que não clivam as seqüências internas dos possíveis indutores de necrose de *Crinipellis pernicioso*. Após fracionamento em gel de agarose 0,8% e transferência para membrana de náilon, o DNA foi sondado com um fragmento de 550 pares de bases de NIP-CP ORFII correspondente à região central e com alta identidade com NIP-CP ORFI. A hibridização em condições de baixa estrigência conduziu a identificação de apenas uma banda de diferentes tamanhos em cada digestão do DNA (Figura 6).

CperniciosaORFI	MLYSSLLIYVLFIVTRSM	SAPHQLPHDQIAKFPKSGGPLETQYQPALHIGNGCHSYPAVDYDQ	NWSGGLK	70	
CperniciosaORFII	MQLQNFLSIVLLVYSGAIAGT	YHDHDKIAKLPASG	SPLETKFQPOLHIGNGCHSYPAVDADQ	NWSGGLK	69
CperniciosaORFI	PTGAPSAACKD	TSK	AQTYVRSATFQGKTALVYAWYMPKDEISTGIGHRRHDEGAVVFLNSDTQQIDGVAA	140	
CperniciosaORFII	PTGAPSAACKD	TSK	AQTYVRSATFQGKTALVYAWYMPKDEISTGIGHRRHDEGAVVFLNSDTQQIDGVAA	139	
CperniciosaORFI	SAHGKWRKYPNPGGANIDDTHYKLQYSAEPYINSHALDL	TDK	GGDLPTLASMEGMGADARAARAINERSHWG	210	
CperniciosaORFII	SAHGKWRKYPNPGGANIDDTHYKLQYSAEPYINSHALDL	TDK	GGDLPTLASMEGMGADARAARAINERSHWG	209	
CperniciosaORFI	DANPPIA	SLTD	SSLGAWHW	231	
CperniciosaORFII	DANPPIADSLIG	SSLGAWHW		230	

Figura 5 – Alinhamento das seqüências primárias dos possíveis indutores de necrose de *Crinipellis pernicioso*. Em vermelho estão os aminoácidos comuns às duas ORFs e em preto os divergentes. Na caixa amarela estão os sítios de clivagem do peptídeo sinal e na caixa verde os potenciais sítios de N-glicosilação. Os sítios consensuais para fosforilação por proteína quinase C e por caseína quinase II estão nas caixas rosas e azuis, respectivamente.

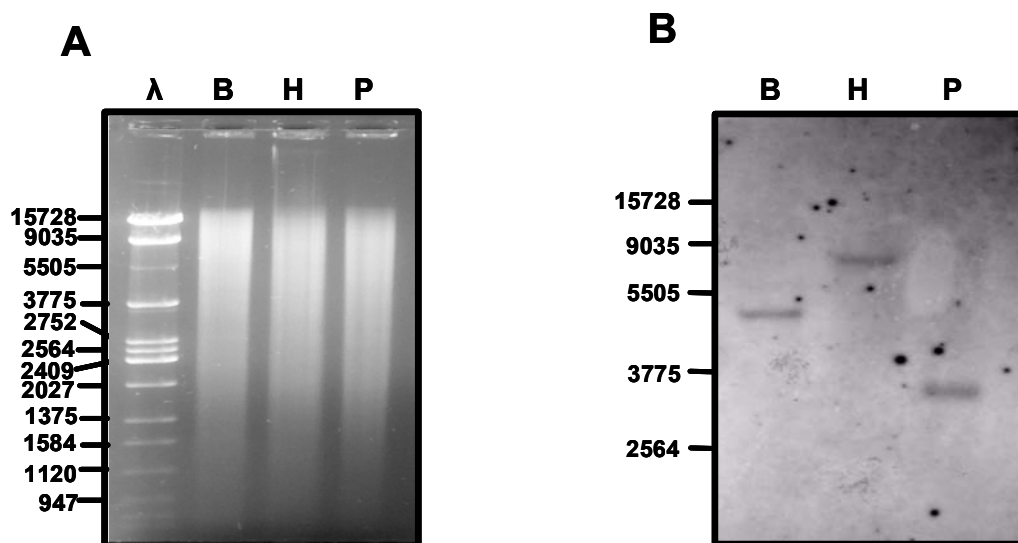


Figura 6 – Análise genômica do indutor de necrose de *Crinipellis pernicioso*. Em A, 6  $\mu\text{g}$  de DNA genômico de *C. pernicioso* digerido com *BamH* I (B), *Hind* III (H) e *Pst* I (P) fracionados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo  $0,25 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , para *Southern* não radioativo.  $\lambda$ , corresponde ao padrão em pares de bases. Em B, *Southern* após transferência do DNA digerido para membrana de náilon e revelado por autoradiografia, a partir da exposição da membrana ao filme de raio-X por 20 horas.

### 4.3. Produção e purificação da proteína indutora de necrose em bactéria

Oligopeptídeos específicos gerando sítios para as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* e eliminando a seqüência no amino terminal correspondente ao peptídeo sinal, foram sintetizados para NIP-CP ORFI. A amplificação e posterior inserção do fragmento de 662 pares de bases no vetor de expressão em bactéria pET-15b, sob o controle do promotor da T7 RNA Polimerase e fundido a uma cauda de histidina (Figura 7 A), permitiu a expressão de NIP-CP e posterior purificação via cromatografia de afinidade. A expressão heteróloga da proteína foi conduzida em *E. coli* estirpe BL21(DE3)pLysS, na presença do agente indutor IPTG. Inicialmente, foi realizado um experimento para determinar a melhor concentração de IPTG e o melhor tempo de indução. Não foram observadas diferenças significativas quanto às concentrações de IPTG (dados não mostrados), mas o acúmulo da proteína aumentou com o tempo de indução (Figura 7 B, canaletas 3 a 6). A proteína purificada (vide Figura 7B, canaletas 7 e 8, com 7C canaleta 4) possui uma massa molecular de aproximadamente 25,0 kDa, superior a massa calculada a partir da seqüência de aminoácidos deduzida. Este aumento na massa da proteína heteróloga é devido aos resíduos de aminoácidos adicionados na extremidade amino da proteína, originados do vetor de expressão.

O anticorpo monoespecífico contra a proteína indutora de necrose de *C. perniciosa* foi produzido em coelho seguido de imunopurificação. A eficiência e especificidade do anticorpo foram testadas por *immunoblotting*. A proteína recombinante produzida em bactéria (Figura 8, canaleta 4) e purificada por cromatografia de afinidade (canaletas 1 e 3) foi reconhecida pelo anticorpo. Além disso, o anticorpo não apresentou reações cruzadas com extrato protéico de *E. coli* (Figura 8, canaleta 5).



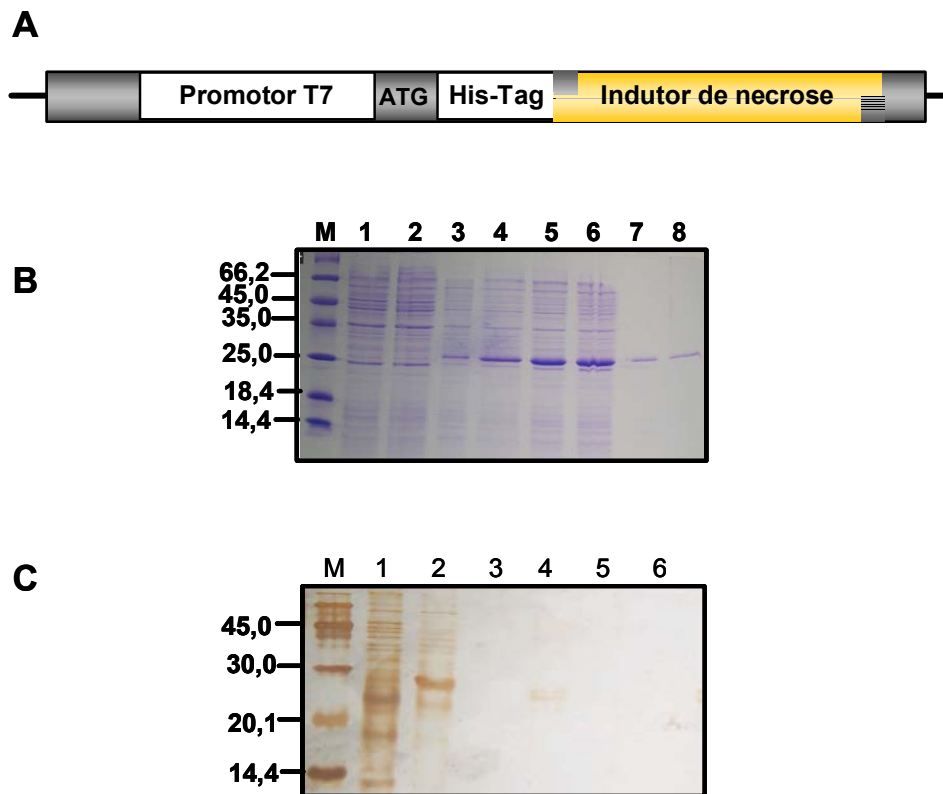


Figura 7 – Expressão do indutor de necrose de *C. perniciosus* em bactéria. Em A, construção de DNA utilizada para expressar a proteína em *E. coli*. Em B, canaleta 1 corresponde ao extrato protéico de *E. coli* transformada com o plasmídeo (controle), canaletas 2 a 6 correspondem aos extratos de bactérias transformadas com a construção de DNA representada em A. Canaleta 2, sem agente indutor (IPTG) e 3, 4, 5 e 6 com  $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de IPTG no período de indução de 2, 3, 4, e 5 horas, respectivamente. Canaletas 7 e 8, proteína purificada por cromatografia de afinidade sob condição desnaturante. Em C, canaletas 1 e 2, correspondem ao extrato de bactéria transformada com o plasmídeo recombinante (A), sem e com IPTG, respectivamente. As canaletas 3 a 6 correspondem a frações da proteína purificada sob condição nativa. As proteínas foram fracionadas em SDS-PAGE e coradas em *coomassie brilliant blue* R-250 e prata, em B e C, respectivamente. M, corresponde ao padrão em kDa.

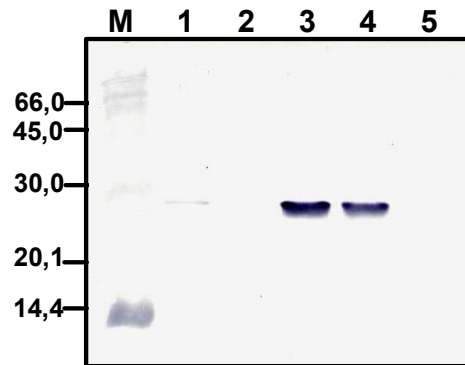


Figura 8 - *Immunoblotting*. Extrato protéico de bactéria transformada com plasmídeo recombinante, na presença (canaleta 4) e ausência (canaleta 5) do agente indutor (IPTG), e a proteína purificada por cromatografia (canaletas 1 e 3) foram fracionados em SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo contra a proteína indutora de necrose. M, corresponde ao padrão em kDa.

#### 4.4. Identificação da proteína indutora de necrose em meio de cultura de *C. pernicioso*.

Micélio de *C. pernicioso* foi cultivado em meio líquido e após 14 dias de incubação, extratos de proteínas secretadas no sobrenadante foram preparados. As proteínas foram fracionadas por SDS-PAGE e analisadas por *Immunoblotting*. Uma banda correspondente ao tamanho da proteína indutora de necrose de *C. pernicioso* foi identificada além, de uma banda de aproximadamente 35 kDa correspondente a reação cruzada (Figura 9, canaleta 1).

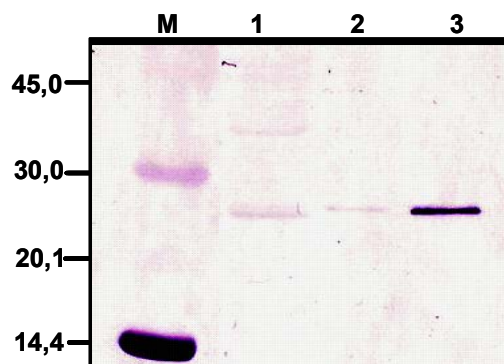


Figura 9 – Identificação de NIP-CP em extratos de proteínas secretadas por *C. pernicioso*. Proteínas secretadas por *C. pernicioso* foram purificadas, fracionadas em gel de poliacrilamida 12,5%, transferidas para membrana de nitrocelulose e sondadas com anticorpo contra o indutor de necrose. M, corresponde ao padrão em kDa; canaleta 1, 20  $\mu\text{g}$  de extrato de proteínas secretadas por *C.pernicioso*. Canaletas 2 e 3 são concentrações crescentes da proteína indutora de necrose eluída da coluna de cromatografia.

#### 4.5. Indução de necrose em *Theobroma cacao* L. e *Nicotiana tabaccum* L.

A proteína expressa em bactéria e purificada sob condição nativa foi dialisada contra tampão fosfato 10  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 6 para remoção dos sais. A fim de confirmar a homologia funcional com indutores de necrose já caracterizados em diferentes organismos, 1,4  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de NIP-CP foi infiltrada em meristema de *Theobroma cacao*, variedade ‘Catongo’. Após 24 horas, os sintomas de necrose já foram observados, tornando-se mais característicos com 48 horas (Figura 10). Para analisarmos se a indução de necrose por esta proteína estaria restrita ao hospedeiro natural do *Crinipellis pernicioso*, folhas de tabaco (*Nicotiana tabaccum* L.) também foram infiltradas com 1,4  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de NIP-CP. Diferentemente do cacau, a formação da necrose em tabaco iniciou-se com 48 horas após infiltração, progredindo até 96 horas (Figura 11).

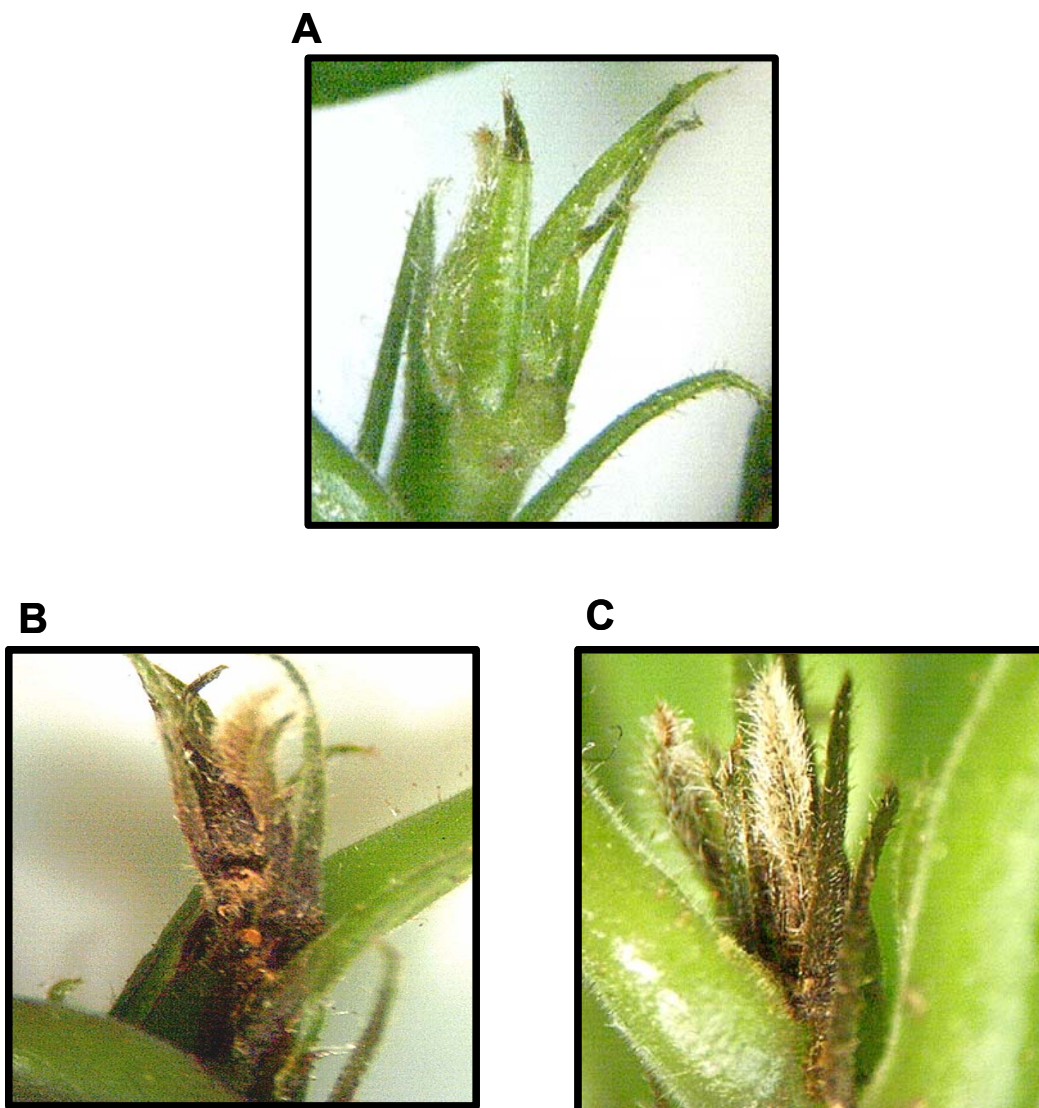


Figura 10 – Indução de necrose em *Theobroma cacao* L.. Plantas de cacau variedade ‘Catongo’ com 60 dias, foram infiltradas com 20  $\mu\text{L}$  de NIP-CP  $1,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , produzida em *E. coli*. A infiltração no meristema foi realizada usando seringa de insulina. Em A, meristema infiltrado com tampão fosfato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH 6,0 (controle). B e C correspondem a meristemas de cacau infiltrados com a proteína NIP-CP. As fotos foram tiradas com 48 horas após infiltração em B e C, e 72 horas em A.

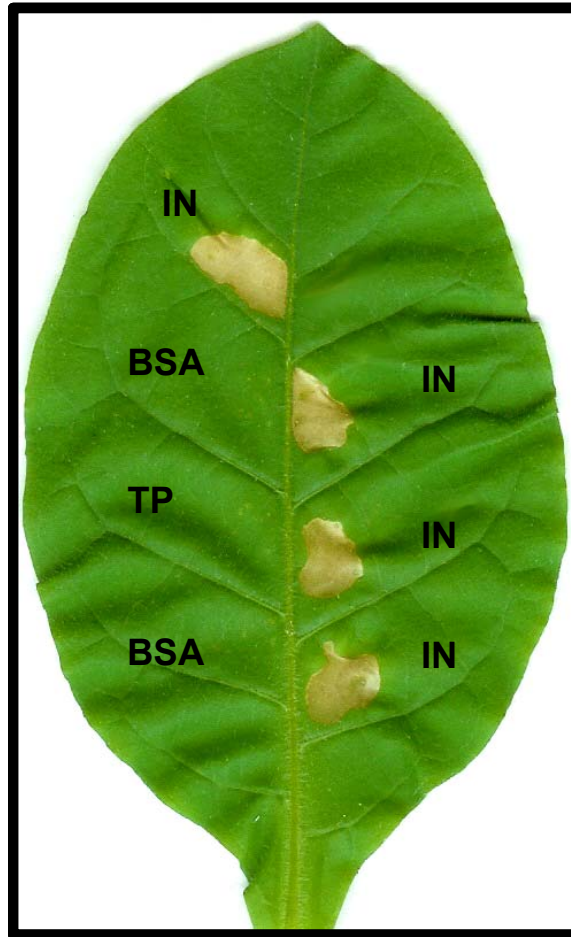


Figura 11 – Indução de necrose em *Nicotiana tabacum* L. Folha de tabaco com 90 dias foi infiltrada com 20  $\mu\text{L}$  de NIP-CP 1,4  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , produzida em *E. coli* (IN). Tampão fosfato (TP) e a proteína BSA foram usados como controles. A foto foi tirada 96 horas após infiltração.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. *Crinipellis perniciosa* codifica uma proteína indutora de necrose

A análise de duas bibliotecas construídas com isolados distintos de *Crinipellis perniciosa*, sendo uma genômica e a outra de cDNA da interação *Crinipellis perniciosa*-*Theobroma cacao* (var. 'Catongo'), permitiu a identificação de duas seqüências que apresentaram similaridade com proteínas indutoras de necrose. NIP-CP ORFI foi identificada no banco de dados da biblioteca do seqüenciamento do genoma de *C.perniciosa* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>), e NIP-CP ORFII na biblioteca de cDNA. Ambas seqüências possuem similaridade com proteínas indutoras de necrose já caracterizadas de oomicetos *Phytophthora ssp.* e *Pythium aphanidermatum*, do fungo *Fusarium oxysporum*, além de uma ORF de *Bacillus halodurans* (FELLBRICH et al., 2002; JENNINGS et al., 2001; QUTOB et al., 2002; TAKAMI et al., 2000; VEIT et al., 2001;). A identificação destas seqüências despertou muito interesse em investigar a homologia funcional com indutores de necrose uma vez que, durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa, na transição entre os sintomas de vassoura verde para vassoura seca, ocorre a necrose de tecidos no cacauero (PURDY; SCHMIDT, 1996). A caracterização funcional da proteína indutora de necrose de *C.perniciosa* corresponde à primeira descrição desta proteína em basidiomiceto, visto que em fungos só existe o relato da proteína Nep1 (*necrosis and ethylene inducing peptide*) no ascomiceto *Fusarium oxysporum* (BAILEY, 1995). Além disso, deve-se ressaltar a grande importância do estudo molecular deste patossistema a fim de elucidar

mecanismos acionados pelo fungo durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa no cacauzeiro, lembrando-se que os prejuízos por ele causado na cacaiucultura levou o Brasil de país exportador para importador, no início da década de 90 (DIAS, 2001).

O alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos dos indutores de necrose já caracterizados e as seqüências de NIP-CP ORFI e NIP-CP ORFII permitiram a identificação de regiões altamente conservadas (Figura 4). Entre estas regiões conservadas dois resíduos de cisteína foram demonstrados ser importantes para funcionalidade da proteína NPP1 de *P. parasítica*. Estes resíduos presentes na posição 56 e 82 de NPP1 foram mutados para serina, e a proteína heteróloga produzida em *E. coli* perdeu a capacidade de induzir a produção de fitoalexinas e a morte celular em protoplasto de salsa, além de não ocorrer à formação de necrose em folhas de tabaco infiltradas com a proteína (FELLBRICH, et al., 2002). Uma vez que cisteínas podem formar ligações de sulfeto, pode-se inferir que, caso exista tal ligação estabilizando a estrutura terciária dessa proteína, a perda dela certamente acarretou em mudanças conformacionais na forma nativa dessa proteína e, conseqüentemente, a especificidade da interação entre a proteína e seu possível receptor na planta pode ter sido perdida. Como as mutações foram feitas independentemente, essa hipótese fica reforçada. Fato este que desperta interesse em estudos futuros para analisar a importância dessas regiões conservadas na funcionalidade e reconhecimento da proteína NIP-CP.

O peptídeo sinal identificado na seqüência de NIP-CP é característico de proteínas que são secretadas, uma vez que não foi identificada as seqüências consenso “KDEL ou HDEL” de retenção no retículo endoplasmático (CHUNG et al., 2003). A funcionalidade do peptídeo sinal é confirmada pela presença de NIP-CP em extratos de proteínas secretadas por *C. pernicioso* (Figura 9).

## **5.2. O gene da nip-cp está presente em cópia única no genoma**

O *Southern Blot* genômico revelou a presença de apenas uma banda, apesar de terem sido identificadas duas seqüências de indutores de necrose em *C. pernicioso* (Figura 6). Os resultados sugerem que NIP-CP ORFI e NIP-CP ORFII, ou encontram-se

em *tandem* no genoma de *C. pernicioso* ou são isoformas, visto que essas seqüências são provenientes de isolados diferentes. Alguns estudos têm demonstrado a variabilidade genética entre isolados distintos *C.pernicioso* (ANDERBRHAN et al., 1999; ARRUDA et al., 2003; RINCONES et al., 2003). Um outro *Southern* está sendo feito, com enzimas que clivam dentro do gene, visando validar ou não essa hipótese.

Corroborando com esses resultados, em *Phytophthora sojae* foram identificadas três ORFs que apresentaram similaridade com indutores de necrose e que se encontravam em *tandem*, em um clone de uma biblioteca de cromossomo artificial (BAC). Entre essas ORFs, apenas a expressão de PsojNIP foi observada durante o desenvolvimento da infecção de tecidos de soja por *P. sojae* (QUTOB et al., 2002). Contrário a estes resultados, multicópias foram identificadas de NPP1 (*P. parasitica*) e PaNie (*Pythium aphanidermatum*) (FELLBRICH et al., 2002; VEIT et al., 2001).

### **5.3. A proteína NIP-CP é eficientemente expressa em sistema heterólogo**

A indução e purificação da proteína indutora de necrose foi eficiente, tanto sob condição nativa quanto sob condição desnaturante, sendo que a concentração de proteína na forma nativa foi bem inferior à obtida na forma insolúvel (Figuras 7B e 7C). É comum a dificuldade em se obter proteína solúvel e ativa quando a expressão é em sistemas procariotos, pois frequentemente ocorre a formação de agregados protéicos e insolúveis, formados por proteínas mal-dobradas. Estes agregados protéicos dificultam a purificação da proteína por cromatografia de afinidade visto que a cauda de histidina não se encontra exposta. Contudo, estes agregados podem ser solubilizados sob condições fortemente desnaturantes, necessitando de passos adicionais de renaturação para obtenção de proteína ativa (TSUMOTO et al., 2003). No caso de elicitores, a obtenção de pequenas quantidades para ensaios funcionais não se apresenta como uma barreira, uma vez que a atividade dos elicitores é observada em baixas concentrações, sendo em alguns casos em níveis nanomolares (MONTESANO et al., 2003; SHIBUYA; MINAMI, 2001).



#### **5.4. A proteína NIP-CP não necessita ser glicosilada para ser funcional**

A análise de seqüência de NIP-CP permitiu a identificação de um sítio consenso de N-glicosilação que está presente em todos os indutores de necrose descritos (Figuras 4 e 5). Porém, a funcionalidade da proteína produzida em *E. coli* demonstra que a glicosilação não é necessária, ou não ocorre, para que ela seja ativa, visto que em sistemas de expressão procarioto não ocorre glicosilação de proteínas. Condizente com este resultado, tanto a proteína PaNie purificada de meio de cultura de *Pythium aphanidermatum* e a sua versão produzida em *E.coli* são ativas (KOCH et al., 1998; VEIT et al., 2001).

#### **5.5. A proteína NIP-CP é funcional em *Theobroma cacao* e possivelmente está envolvida na mudança da fase parasítica para necrotrófica.**

A indução de necrose pela proteína heteróloga em meristemas de cacau (Figura 10) foi observada 24 horas após infiltração. Ao contrário disso, no patossistema *Crinipellis pernicioso*-cacau, o início da necrose ocorre 60 - 70 dias após a penetração do basidiósporo, momento este que o fungo torna-se dicariótico, e penetra nas células, dando início a fase necrotrófica (PURDY; SCHIMIDT, 1996). Em soja, a transição da fase parasítica para necrotrófica, de *P.sojae*, ocorre concomitantemente com um aumento no acúmulo de transcritos de PsojNIP (QUTOB et al., 2002).

Os dados de ESTs da biblioteca da interação compatível ('Catongo') mostraram a presença do transcrito de nip-cp, confirmando que ele é expresso nesse patossistema. Cabe ressaltar, que no universo de genes de cacau que foram identificados, esse gene foi rapidamente seqüenciado, sugerindo que ele deve ser altamente expresso durante a interação. De acordo com esses resultados, Penman et al. (2000) quantificando quitina demonstrou que pequena quantidade de biomassa de *C. pernicioso* está presente em tecidos infectados de cacau.

Resta então entender como essa proteína atua no patossistema. NIP-CP não possui atividade hidrolítica *per si*, e como é uma proteína secretada (Figura 9), espera-se que exista um receptor celular na planta (vide Figura 12, modelo proposto), responsável pelo reconhecimento dessa proteína, desencadeando o processo de morte celular programada (PCD). Ceita, 2004 mostrou, no patossistema *Crinipellis*-cacao, que o processo de degeneração tecidual observado ao longo do desenvolvimento da sintomatologia da doença é um evento de morte celular programada induzida pelo patógeno, onde foi observada a presença acumulativa de núcleos apoptóticos (TUNEL positivos), acompanhada de uma fragmentação do DNA, característica de PCD.

A validação do modelo proposto depende da identificação do receptor de membranas de tecidos de *Theobroma cacao* para a proteína NIP-CP. Visto que possuímos a proteína heteróloga e o anticorpo contra a mesma, a coimunoprecipitação é uma alternativa para a identificação do possível receptor.

#### **5.6. A proteína NIP-CP é funcional em *Nicotiana tabacum* L.**

A indução de necrose pela proteína heteróloga em folhas de tabaco (Figura 11), permite inferir que existe um mecanismo conservado de reconhecimento dessa proteína (NIP-CP) e desencadeamento do processo de necrose em outras espécies. Esse resultado é compatível com os observados para Nep1, NPP1 e PaNie que foram hábeis em induzir a formação de lesões necróticas em várias espécies de dicotiledôneas (BAILEY, 1995; FELLBRICH et al., 2002; JENNINGS et al., 2000; VEIT et al., 2001). Esse fato abre novas perspectivas para o estudo dessa proteína em sistemas modelo, onde a genética da resposta a patógenos está mais bem compreendida.

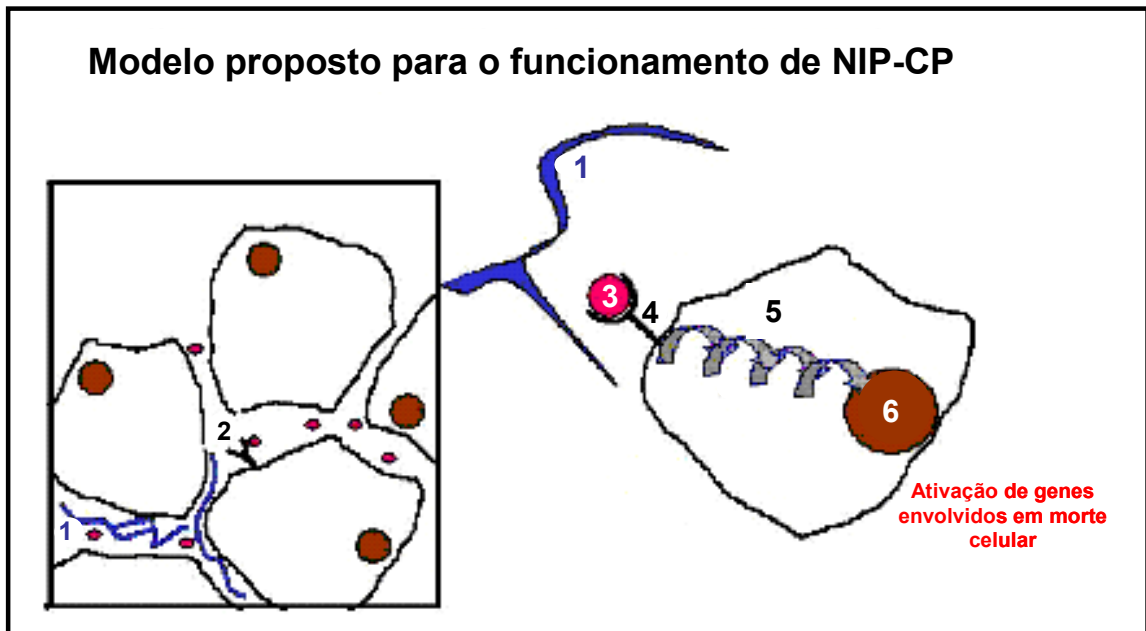


Figura 12 - Modelo proposto para o funcionamento de NIP-CP. Hifas de *C. pernicioso* (1), presentes no espaço intercelular de tecido de *Theobroma cacao* (2), secretam NIP-CP (3). O indutor de necrose é reconhecido por um receptor (4), presente nas células da planta. Em seguida, ocorre a transmissão de sinal (5), resultando na ativação de genes envolvidos na morte celular (PCD). 6, corresponde ao núcleo das células.

## 6. CONCLUSÕES

- *Crinipellis pernicioso* possui pelo menos um gene que codifica uma proteína indutora de necrose, denominada NIP-CP.
- A proteína heteróloga NIP-CP foi eficiente na indução de necrose em *Theobroma cacao* L. e *Nicotiana tabaccum* L.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLE, A. J.; GUEST, D. I.; SUTHERLAND, M. W.. Hydrogen peroxide yields during the incompatible interaction of tobacco suspension cells inoculated with *Phytophthora nicotianae*. **Plant Physiology**, v.124, p.899-910, 2000.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A. et al.. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.389-3402, 1997.

ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M.M. et al.. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.1667-1675, 1999.

ARRUDA, M. C. C.; FERREIRA, M. A.S.V.; MILLER, R.N.G. et al.. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. **Mycology Research**, v.107, n.1, p.25–37, 2003

AZEVEDO, A.M.C.; DE MARCO, J.L.; FELIX, C.R.. Characterization of an amylase produced by a *Trichoderma harzianum* isolate with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **FEMS Microbiology Letters**, v.188, p.171-175, 2000.

BAILEY, B.A.; COLLINS, R.; ANDERSON, J.D.. Factors influencing the herbicidal activity of Nep1, a fungal protein that induces the hypersensitive response in *Centaurea maculosa*. **Weed Science**, v.48, p.776-785, 2000.

BAILEY, B.A.. Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. **Phytopathology**, v.85, p.1250-1255, 1995.

BASSE, C.W.; BOLLER, T.. Glycopeptide elicitors of stress responses in tomato cells. N-linked glycans are essential for activity but act as suppressors of the same activity when released from the glycopeptides. **Plant Physiology**, v.98, p.1239-1247, 1992.

BASTOS, C.N.. Potencial de *Trichoderma viride* no controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.509-512, 1996.

BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A.; SOLANO, R.. Constitutive expression of Ethylene-Response-Factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. **The Plant Journal**, v.29, n.1, p. 23-32, 2002.

CEITA, G.O.. **Análise do processo de morte celular em *Theobroma cacao* L. induzido por *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer**, 2004. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - Bahia, 2004.

CHUNG, J.; YANG, H.; LI, M.. Genome-wide analyses of carboxyl-terminal sequences. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.2, p.173-181, 2003.

CORDEIRO, M.C.R.; SÁ, M.F.G.. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.10, p.34-39, 1999.

DANGL, J.F.; DIETRICH, R.A.; THOMAS, H.. **Senescence and programmed cell death**. In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R., eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, p. 1044 -1101, 2000.

DIAS, L.A.S.. **Melhoramento Genético do cacauero**. Editora Folha de Viçosa Ltda. 578 p., 2001.

EBEL, J.; MITHÖFER, A.. Early events in the elicitation of plant defense. **Planta**, v.206, p.335-348, 1998.

EBEL, J.; COSIO, EG.. Elicitors of plant defense responses. **International Review of Cytology**, v.148, p.1-36, 1994.

FELLBRICH, G.; ROMANSKI, A.; VARET, A. et al.. NPP1, a Phytophthora-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 32, p. 375-390, 2002.

GLAZEBROOK, J.; ROGERS, E.E.; AUSUBEL, F.M.. Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. **Annual Review of Genetic**, v.31, p.547-569, 1997.

GOVRIN, E. M.; LEVINE, A.. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Current Biology**, v.10, p.751-757, 2000.

GREENBERG, J. T.. Programmed cell death in plant- pathogen interactions. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.48, p.525-545, 1997.

GRIFFITH, G.W.; BRAVO-VELASQUEZ, E.; WILSON, F.J. et al.. **Autecology and evolution of the witches' broom pathogen (*Crinipellis pernicios*) of cocoa**. In: Blakeman, J.P.; Williamson, B., eds. *The Ecology of Plant Pathogens*, CAB International, Wallingford, U.K., p.245-26, 1994.

GRIFFITH, G.W.; NICHOLSON, J.; NENNINGER, A. et al.. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, v.41, p.423-435, 2003.

HAHN, M.G.. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.34, p.387-412, 1996.

HAMMOND-KOSAK, K.; JONES, J.D.G.. **Responses to plant pathogens**. In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R., eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, p1102 -1156, 2000.

HAMMOND-KOSAK, K.; JONES, J.D.G.. Plant disease resistance genes. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.48, p.575-607, 1997.

HEATH, M.C.. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular Biology**, v.44, p.321-334, 2000.

HONÉE, G.. Engineered resistance against fungal plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.319-326, 1999.

JACKSON, A.O.; TAYLOR, C.B.. Plant-microbe interaction: life and death at the interface. **The Plant Cell**, v.8, p.1651-1668, 1996.

JENNINGS J.C.; APEL-BIRKHOLO, P.C.; MOCK, N.M. et al.. Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep 1 from *Fusarium oxysporum*. **Plant Science**, v.161, p.891-899, 2001.

JENNINGS J.C.; APEL-BIRKHOLO, P.C.; BAILEY, B.A. et al.. Induction of ethylene biosynthesis and necrosis in weed leaves by a *Fusarium oxysporum*. **Weed Science**, v.48, p.7-14, 2000.

JI, C.; BOYD, C.; SLAYMAKER, D. et al.. Characterization of a 34-kDa soybean binding protein for the syringolide elicitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.95, p.3306-3311, 1998.

KAMOUN, S.; van WEST, P.; VLEESHOUWERS, V.G.A.A. et al.. Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by recognition of the elicitor protein INF1. **The Plant Cell**, v.10, p.1413-1425, 1998.

KEATES, S.E.; KOSTMAN, T.A.; ANDERSON, J.D. et al.. Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. **Plant Physiology**, v.132, p.1610-1622, 2003.

KOCH, W.; WAGNER, C.; SEITZ, H.U.. Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. **Planta**, v.206, p.523-532, 1998.

KUNKEL, B.N.; BROOKS, D.M.. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 325-331, 2002.

LAEMMLI, U.K.. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, v. 227, n.1, p.680, 1970.

LAMB, C.; DIXON, R.A.. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.48, p.251-275, 1997.



LAUGÉ, R.; DE WIT, P.J.G.M.. Fungal avirulence genes: structure and possible functions. **Fungal Genetics and Biology**, v.24, p.285-297, 1998.

LEACH, J.E.; WHITE, F.F.. Bacterial avirulence genes. **Annual Review Phytopathology**, v.34, p.153-179, 1996.

LUND, S.T. ; STALL, R.E.; KLEE, H.J.. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. **The Plant Cell**, v. 10, p. 371-382, 1998.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C.; GIL-AD, N.L.. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. **Phytochemistry**, v.58, p.33-41, 2001.

MESHI, T.; MOTOYOSHI, F.; MAEDA, T. et al.. Mutations in the *Tobacco Mosaic Virus* 30-kD protein gene overcome *Tm-2* resistance in tomato. **The Plant Cell**, v.1, p.515-522, 1989.

MONTESANO, M.; BRADER, G.; PALVA, E.T.. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, v.4, n.1, p.73-79, 2003.

PADGETT, H.S.; BEACHY, R. S.. Analysis of a tobacco mosaic virus strain capable of overcoming N gene-mediated resistance. **The Plant cell**, v.5, p.577-586, 1993.

PARKER, J. E.; SCHULTE, W.; HAHLBROCK, K. et al.. An extracellular glycoprotein from *phythophthora megasperma* f.sp.*glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplast. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v.4, p.19-27, 1991.

PENMAN, D.; BRITTON, G.; HARDWICK, K. et al.. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycology Research**, v.104, n.6, p.671-675, 2000.

PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M. et al.. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotrópica**, v.1, n.1, p.79-81, 1989.

PEREIRA, J.L.; DE ALMEIDA, L.C.C.; SANTOS, S.M.. Witches' broom disease of cocoa in Bahia – attempts at eradication and containment. **Crop Protection**, v.15, p.743-752, 1996.

PURDY, L.H.; SCHIMIDT, R.A.. Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology and management. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.573-594, 1996.

QUTOB, D.; KAMOUN,S.; GIJZEN, M.. Expression of *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. **The Plant Journal**, v. 32, p. 361-373, 2002.

RINCONES, J.; MEINHARDT, LW.; VIDAL, BC. et al.. Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycology Research**, v.107, n.4, p.452-458, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T.. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SASABE, M.; TAKEUCHI, K.; KAMOUN, S. et al.. Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. **European journal of Biochemistry**, v.267, p.5005-5013, 2000.

SHIBUYA, N.; MINAMI, E.. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.59, 223-233, 2001.

SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; ALMEIDA, O.C. et al.. Redescritção da sintomatologia causada por *Crinipellis pernicioso* em cacaueiro. **Agrotropica**, v.14, n.1, p.1-28, 2003.

TAKAMI,H.; NAKASONE, K.; TAKAKI, Y. et al.. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. **Nucleic Acids Research**, v.28 , n.21, p. 4317-4331, 2000.

THOMMA, B.P.H.J.; EGGERMONT, K.; PENNINGCKX, I.A.M.A. et al.. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.95, p. 15107-15111, 1998.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; KUMAGAI, I. et al.. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**, v.28, p.1-8, 2003.

TYLER, B.M.. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. **Annual Review Phytopathology**, v.40, p.137-167, 2002.

VAN DEN ACKERVEKEN, G.F.J.M.; VAN KAN, J.A.L.; de WIT, P.J.G.. M. Molecular analysis of the avirulence gene *Avr9* of *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. **Plant Journal**, v.2, p.359-366, 1992.

VAN DEN ACKERVEKEN, G.F.J.M.; VOSSEN, P.; de WIT, P.J.G.M.. The AVR9 race-specific elicitor of *Cladosporium fulvum* is processed by endogenous and plant proteases. **Plant Physiology**, v.103, p.91-96, 1993.

VEIT, S.; WÖRLE, J.M.; NÜRNBERGER, T. et al.. A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense response in carrot, Arabidopsis, and tobacco. **Plant Physiology**, v.127, p.832-841, 2001.

ZHOU, J.; LOH, Y.T.; BRESSAN, R.A. et al.. The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. **Cell**, v.83, p.925-935, 1995.

ZOLAN, M.; PUKKILA, P.. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. **Molecular and Cell Biology**, v.6, p.195-200, 1986.

ZUPPINI, A.; BALDAN, B.; MILLIIONI, R. et al.. Chitosan induces Ca<sup>2+</sup>-mediated programmed cell death in soybean cells. **New Phytologist**, v.161, p.557-568, 2003.

WANG, W.; SCALI, M.; VIGNANI, R. et al.. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v.24, p.2369-2375, 2003.

YAMAGUCHI, T.; YAMADA, A.; HONG, N. et al.. Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean:  $\beta$ -glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. **The Plant Cell**, v.12, p.817-826, 2000.