

**EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE A REGULAÇÃO DA
EXPRESSÃO GÊNICA DE POLIGALACTURONASES EM**
Sclerotinia sclerotiorum

AMARILDO LEMOS DIAS DE MOURA

Orientadora: Profa. Dra. SILVANA S. PETROFEZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Área de concentração:

Biologia Celular e Molecular.

**Goiânia
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**EFEITO DA CAFEÍNA SOBRE A REGULAÇÃO DA
EXPRESSÃO GÊNICA DE POLIGALACTURONASES EM**
Sclerotinia sclerotiorum

AMARILDO LEMOS DIAS DE MOURA

**Goiânia
2008**

"A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana".

Louis Pasteur

À Deus, aos meus pais, pelo amor incondicional.

À minha esposa Aline e minha filha Gabrielle, pelo incentivo a conquista de um trabalho e pela valorização do que é substancial à vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Silvana da Silva Petrofeza pela confiança e oportunidade
de trabalharmos juntos;

Aos amigos do Laboratório, Lucas, Elda, Marília, Sílvio e Deyse,
comprometidos
com um ambiente de harmonia no trabalho;

Aos amigos conquistados no decorrer do curso;

À UFG, em especial a equipe da coordenação da Pós-Graduação,
pela valorização do desenvolvimento científico.

SUMÁRIO:

	Página
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	
RESUMO.....	
SUMMARY.....	
1- INTRODUÇÃO.....	01
1.1- INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO.....	02
1.1.1- HOSPEDEIRO.....	02
1.1.2- PATÓGENO.....	04
1.1.2.1- ÁCIDO OXÁLICO E pH.....	04
1.1.2.2- POLIGALACTURONASES.....	06
1.1.2.3- PROTEASES.....	09
1.2- VIAS DE TRANSDUÇÃO.....	09
1.2.1- PROTEÍNA G – ADENILATO CILASE – AMPc – PKA.....	09
1.2.2- RAS – MAPK.....	12
1.3- CAFEÍNA.....	13
2- OBJETIVOS GERAIS.....	15
2.1- METAS.....	15
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4- RESULTADOS.....	28
5- DISCUSSÕES.....	36
6- PRINCIPAIS RESULTADOS.....	41
7- CONCLUSÕES	42
7- PERSPECTIVAS.....	43
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
9- ANEXOS.....	51

LISTA DE FIGURAS e TABELAS:

	Página
Figura 1- Esquema do ciclo de vida de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	02
Figura 2- Esquematização da Parede Celular de uma planta.....	03
Figura 3- Crescimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em cultura	04
Tabela 1- Descrição dos Oligonucleotídeos utilizados	25
Figura 4- Análise do crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> submetida à diferentes concentrações de cafeína	28
Figura 5- Comparação do crescimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em Meio Mínimo – Ágar 1,7 % tratados com diferentes concentrações de cafeína	29
Figura 6- Comparação do padrão de crescimento e do desenvolvimento da esclerogênese de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em cultura de Meio Mínimo e Agar 1,7%, tratados com diferentes concentrações de cafeína	30
Figura 6- Valores de pH obtidos em cultura de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em MM	31
Figura 7- Atividade enzimática das Poligalacturonases secretadas por	

<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> cultivada em MM suplementado com Pectina....	32
Figura 8- Análise comparativa da expressão dos genes de PGs e PacC de <i>S.sclerotiorum</i> em diferentes intervalos de tempo em meio contendo 1 % de pectina (MM-pectina) como única fonte de carbono	33
Figura 9- Análise semiquantitativa dos níveis de expressão dos genes de Poligalacturonase (<i>sapg</i>) e <i>pacC</i> de <i>S. sclerotiorum</i> feita utilizando-se ferramentas do programa “Scion Image”.....	34
Figura 10- Quantificação por Radioimunoensaio das concentrações de AMPc de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> submetida a um meio de cultura com cafeína 5 mM	40

RESUMO

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo filamentosso necrotrófico, contaminante de uma variedade de plantas, causando uma patologia conhecida popularmente como “mofo branco”. Este microrganismo utiliza uma série de mecanismos, entre eles a síntese e secreção de ácido oxálico, enzimas proteolíticas e enzimas pectinolíticas com a finalidade de ataque e degradação da complexa estrutura da parede celular dos tecidos vegetais, processos disparados pela variação do pH do meio. Dentre as enzimas pectinolíticas, um grupo formado por várias isoformas conhecido como Poligalacturonases (PGs), é responsável pela despolimerização da estrutura da pectina, através da quebra das ligações de poligalacturonato que compõem este carboidrato. Neste trabalho buscou-se evidenciar a relação entre a produção destas enzimas (PG1, PG3, PG5, PG6 e PG7) pela expressão gênica e a ativação da cascata do AMPc, um modulador intracitoplasmático de ações biológicas bem diversificadas, sendo utilizada a cafeína com a finalidade de aumentar as concentrações das moléculas de AMPc e verificar a resposta desta alteração no sistema de cultivo. O tratamento que recebeu esta substância aumentou a expressão tanto das Poligalacturonases quanto da secreção de ácido oxálico produzidos pelo fungo, além da alteração do processo de desenvolvimento de escleródios nestas condições de cultura *in vitro*, meio mínimo suplementado com 1% de pectina, determinando, desta forma, uma importante via de ativação destes fatores de virulência.

PALAVRAS-CHAVES: Patogênese, interação parasita-hospedeiro, AMPc, Poligalacturonases, Cafeína.

SUMMARY

Sclerotinia sclerotiorum is a filamentous necrotrophic fungus, contaminant from a variety of plants, causing a pathology popularly known as "white mold". This microorganism uses a number of mechanisms, including the synthesis and secretion of oxalic acid, proteolytic enzymes and pectinolytic enzymes in order to attack and degradation of the complex structure of the cell wall of plant tissue, processes triggered by the change in pH of the medium. Among the pectinolytic enzymes, a group formed by several isoforms known as Polygalacturonases (PGs), are responsible for the depolymerization of the structure of pectin, by breaking the links of polygalacturonate that comprise this carbohydrate. This study sought is demonstrating the link between the production of these enzymes (PG1, PG3, PG5, PG6 e PG7) by gene expression and activation of the cascade of cAMP, a intracitoplasmatic modulator of biological activity well diversified, and the caffeine used for the purpose of increasing concentrations of molecules of cAMP and check the response of this amendment in the system of cultivation. The treatment that received this substance increased the expression of both the Poligalacturonases as the secretion of oxalic acid produced by the fungus, and the amendment of the process of esclerotial development these conditions of *in vitro* culture, medium minimum supplemented with 1% of pectin, determining thus an important means of activation of the virulence factors.

KEY-WORDS: Pathogenesis, host-parasite interaction, cAMP, Polygalacturonases, Caffeine.

1- INTRODUÇÃO

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo fitopatígeno necrotrófico de ampla distribuição mundial que desperta um grande interesse da área agrícola por apresentar uma ampla diversidade de plantas hospedeiras, principalmente dicotiledôneas (Boland and Hall 1994). Pertence à família **Sclerotiniaceae**, da ordem **Helotiales**, filo **Ascomycota**, sendo um fungo contaminante do solo que causa uma patologia conhecida como Mofo Branco, caracterizada pela maceração tecidual de aspecto úmido no tecido das plantas parasitadas, apresentando um emaranhado de hifas brancas no local da lesão.

Fungos de forma geral possuem uma variedade de estratégias de propagação, dispersão e sobrevivência, *Sclerotinia sclerotiorum* desenvolve uma forma de resistência conhecida como escleródio, que lhe confere um alto grau de adaptabilidade no meio quando este se torna adverso às suas necessidades nutricionais (Willems and Wong 1980). Os escleródios são estruturas formadas por aglomerados de hifas bem compactadas e mielinizadas, que sobrevivem por longos períodos de tempo no solo, até o momento em que encontram condições favoráveis de desenvolvimento, sendo a umidade alta e a temperatura baixa fatores determinantes desta germinação, além da presença de matéria orgânica em decomposição. Dois mecanismos diferenciados podem ocorrer nesta fase de transição entre escleródio e forma contaminante, uma conhecida como germinação carpogênica e outra miceliogênica. A primeira, germinação carpogênica, consiste no desenvolvimento de apotécio e produção de ascósporos que são lançados ao ar, sendo estes as formas contaminantes. A segunda, germinação miceliogênica, é estabelecida pelo crescimento de micélio infectante na estrutura do escleródio. No ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum* (Figura 1) pode ser observada a

importância destes mecanismos no processo inicial de patogenicidade deste fungo (Dwayne *et al.* 2005).

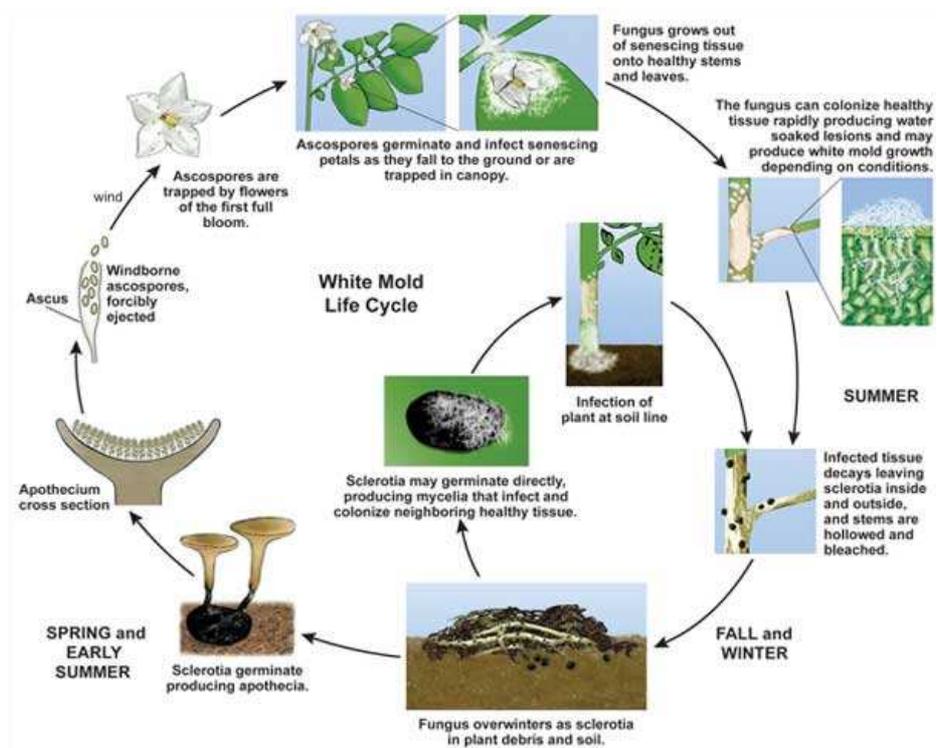


Figura 1: Esquema do ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*. Demonstrando as vias carpogênicas e miceliogênicas de propagação. Fonte: www.potatodiseases.org.

Podemos, didaticamente, dividir os processos envolvidos na patogenicidade de acordo com a dinâmica do processo de invasão do fungo sobre o hospedeiro, sendo:

1.1- Interação Patógeno-Hospedeiro:

Uma vez instalado sobre o tecido vegetal, o fungo inicia seu crescimento invasivo nas camadas celulares do hospedeiro, a partir da lamela média seguindo para a parede celular primária.

1.1.1- Hospedeiro:

As células vegetais possuem em sua composição uma complexa rede de microfibrilas de celulose, moléculas de hemicelulose e pectina (Figura 2). Esta última é um carboidrato, formado por polímeros de ácido poligalacturônico, que, juntamente com os polissacarídeos que compõem a hemicelulose e celulose, são responsáveis pela rigidez da parede celular (Vries *et al.* 2001), formando uma verdadeira barreira física. Estes componentes funcionam como verdadeiros elicitores ao entrar em contato com estruturas infectantes de *Sclerotinia sclerotiorum*, principalmente os monômeros de pectina, que, sofrendo despolimerização, proporcionam uma rica fonte de carbono para o desenvolvimento do fungo (Fraissinet-Tachet *et al.* 1995).

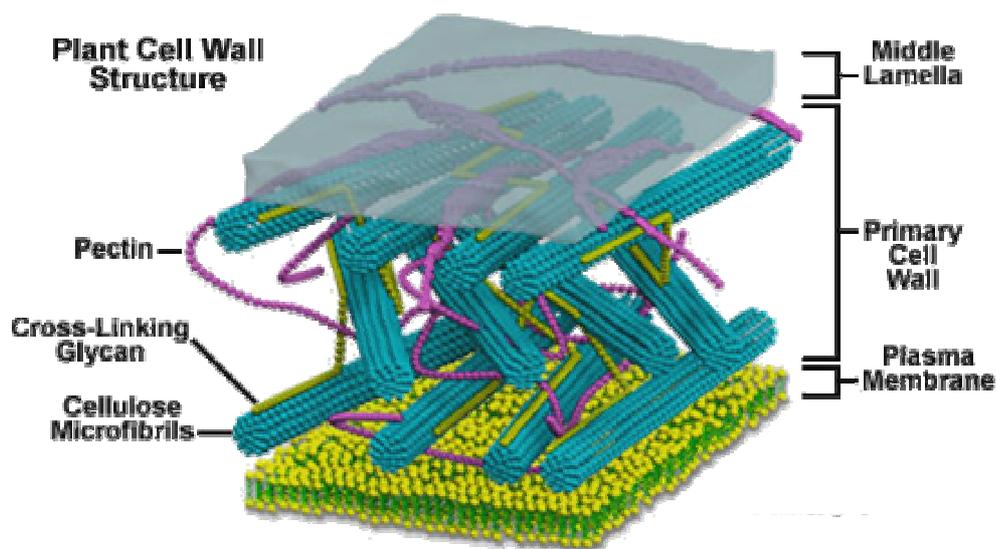


Figura 2: Esquematização da composição da parede celular de uma planta.

Fonte: www.informativodigitaleinstein.blogspot.com.

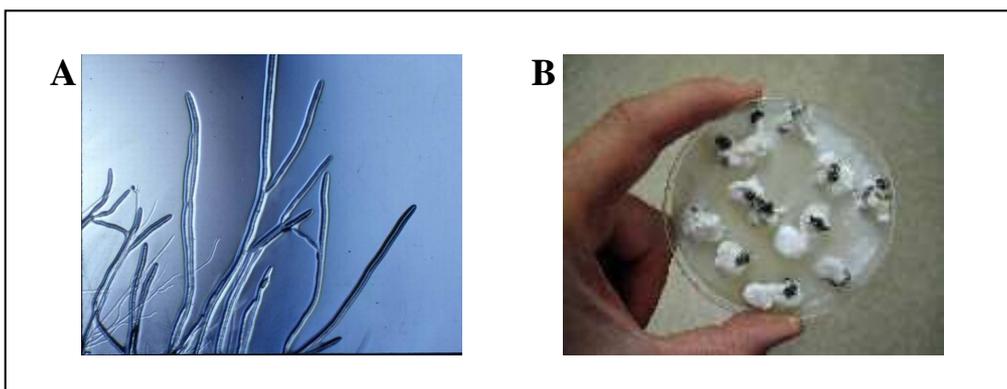
Com o início do processo de invasão, a planta ativa a formação de uma barreira tóxica contra o patógeno através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o ânion super-óxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Rezende *et al.* 2003), que buscam eliminar a fonte agressora, seja pelo efeito tóxico direto das EROs ou pela

ativação de genes de defesa da planta, a exemplo dos Inibidores de Poligalacturonases, PGIs (Cessna *et al.* 2000).

1.1.2 - Patógeno:

Sclerotinia sclerotiorum é um fitopatógeno capaz de causar perdas significativas em culturas economicamente importantes, como feijão, girassol, soja e algodão. É um fungo filamentososo, formado por hifas multinucleadas que crescem por alongamento polar (Figura 3A).

Frente às diversidades do ambiente, representadas pelas variações de umidade, temperatura ou nutrição, formam-se agregados compactados de micélio, denominados escleródios. Estas estruturas passam por uma etapa de maturação, produzindo e concentrando melanina em sua superfície, aumentando ainda mais seu caráter de resistência, sobrevivendo no solo por um período de até oito (08) anos no solo (Figura 3B).



Figuras 3. Crescimento celular de *S. sclerotiorum* em cultura. (A). Observação das hifas em microscopia óptica comum. (B) escleródios em placa de Petri. Fonte: www.whitemoldresearch.com.

Sclerotinia sclerotiorum faz uso de uma série de mecanismos que atuam de forma dinâmica no decorrer do processo patogênico, sendo:

1.1.2.1- **Ácido Oxálico e pH:**

Em *Sclerotinia sclerotiorum*, a síntese do oxalato é catalisada pela enzima oxalacetato acetil-hidrolase, e a sua atividade enzimática aumenta de forma proporcional à diminuição de pH do meio. Sua catálise é mediada pela ação da enzima oxalato descarboxilase, presente em altas concentrações intracelulares neste fungo (Rollins *et al.* 2001).

O sucesso do processo patogênico se deve inicialmente à síntese e secreção de ácido oxálico pelo fungo (Lugtemberg *et al.* 2002; Cessna *et al.* 2000; Guimarães *et al.* 2004; Durman *et al.* 2005). O pH neutro ou ligeiramente alcalino do tecido do hospedeiro estimula a síntese de oxalato, resultando em uma acidificação do meio extracelular que tem sido mostrada como um sinal chave na diferenciação entre o crescimento saprofítico e o crescimento necrotrófico (Rollins *et al.* 1998).

A síntese e a secreção de oxalato têm como determinante o pH do meio (Cotton *et al.* 2003), via um fator de transcrição conhecido como *PacC* (Rollins *et al.* 2001). Mecanismos de ativação gênica, disparado pelo pH do meio, foi descrito também em *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, e *Yarrowia lipolytica* (Diez *et al.* 2002; Peñalva *et al.* 2002; El Barkani *et al.* 2000; Lambert *et al.* 1997)), indicando sua importância na virulência destes patógenos.

Pesquisas relacionadas ao fator *PacC* demonstraram a sua importância no desenvolvimento e maturação de escleródios, além do envolvimento na virulência de *Sclerotinia sclerotiorum* (Rollins 2003) e na expressão de genes relacionados à virulência de outros fungos, a exemplo de *Fusarium oxysporum* (Caracuel *et al.* 2003),

Cândida albicans (El Barkani *et al.* 2000) e *Ustilago maydis* (Aréchiga-Carvajal *et al.* 2005), ou seja, mudanças biológicas específicas ocorreram frente à mudanças do pH, como a secreção de enzimas específicas e produção de metabólitos secundários diferenciados, sendo um importante mecanismo de sobrevivência.

Outro dado relevante a ser considerado é que enzimas pectinolíticas, proteolíticas e outras hidrolases possuem uma maior atividade em condições ácidas, proporcionado pela ação do ácido oxálico (Rollins *et al.* 2001). O potencial patogênico está diretamente relacionado com a produção do oxalato e a alteração do pH do meio, visto que a análise de isolados mutantes que não secretavam oxalato não eram capazes de infectar o hospedeiro, não sendo, desta forma, patogênicos (Godoy *et al.* 1990).

O oxalato secretado além de ser diretamente tóxico à planta, funciona como quelante de íons cálcio, desestabilizando o sistema bioquímico funcional do hospedeiro, seqüestra o cálcio da parede celular, suprime o estresse oxidativo gerado pela planta, pela neutralização das espécies reativas de oxigênio e diminui a afinidade da ligação entre as Poligalacturonases (PGs) do fungo com os inibidores de poligalacturonases (PGIs) do hospedeiro (Favaron *et al.* 2004).

A capacidade de secretar ácido oxálico influencia uma expressão seqüencial gênica que indica ser a base da polifagia deste fungo. A maceração tecidual característica se dá inicialmente pela ação do oxalato e em seguida pelo ataque enzimático sobre as estruturas da parede celular do hospedeiro (Cotton *et al.* 2003).

1.1.2.2- Poligalacturonases:

A decomposição dos componentes da parede celular dos tecidos vegetais durante o processo de patogenicidade de *Sclerotinia sclerotiorum* envolve um sistema

complexo de ativação enzimática, com o objetivo final de extrair compostos essenciais a sua sobrevivência, pela ação de proteases, pectinases e outras enzimas hidrolíticas sobre o hospedeiro (Hancock 1966).

Dentre as várias enzimas secretadas, *Sclerotinia sclerotiorum* sintetiza um grupo conhecido como Poligalacturonases (PGs), que é composto por isoformas que atuam em conjunto, cujo alvo são as ligações endo e exo dos polímeros de ácido poligalacturônico da pectina presente na parede celular da planta, e o resultado final é a maceração tecidual, quebra do talo e morte do hospedeiro (Fraissinet-Tached and Fèvre 1996). Uma isoforma de Endopoligalacturonase foi descrita também como indutora de morte celular programada no hospedeiro, favorecendo o ataque necrotrófico do fungo *S. sclerotinia* (Zuppini *et al.* 2005).

No fitopatógeno *Botrytis cinerea* também ocorre a necessidade de converter o tecido do hospedeiro em biomassa de nutrientes, e as Poligalacturonases secretadas são essenciais para este processo de decomposição. Neste fungo, as isoformas produzidas seguem uma cinética de ativação, prevalecendo as PG1 e PG2 na etapa inicial do processo patogênico, seguidas pelas outras isoformas. Este fracionamento em etapas se correlaciona com uma variação na intensidade da atividade necrotizante específica para cada isoforma secretada (Kars *et al.* 2005). Esta cinética também é observada em *Aspergillus niger*, levantando a hipótese de uma possível atividade complementar destas enzimas durante a patogênese (Benen *et al.* 1999).

Entre as isoformas de Poligalacturonases existentes em *Sclerotinia sclerotiorum* na fase inicial do processo de infecção, os genes *sspg1*, *sspg2* e *sspg3* são mais expressos (Cotton *et al.* 2002) e suas enzimas apresentam uma alta identidade da seqüência de aminoácidos, entre 95% e 97% (Kasza *et al.* 2004). Esta alta taxa de

identidade não equivale, necessariamente, a uma mesma função catalítica, como foi demonstrado em *Aspergillus niger* (Parenicova *et al.* 2000).

A análise da cinética de expressão gênica das Poligalacturonases *in vivo* em *Sclerotinia sclerotiorum* revela um padrão de transcrição seqüencial, onde PG1, PG2 e PG3 são secretadas durante a fase de colonização do tecido vegetal saudável, PG5 é secretada durante a fase de maceração tecidual, e PG6 e PG7 exibem uma secreção constante na cinética a partir da vigésima quarta hora após a infecção no hospedeiro (Kasza *et al.* 2004).

Em mutantes de *Fusarium oxysporum* que não expressavam *pg1*, foi observada uma drástica redução da atividade enzimática total quando comparada com isolados selvagens, mostrando a importância desta isoforma primária de Poligalacturonase no processo patogênico (Di Pietro *et al.* 1996). Durante a fase saprofítica, o gene *spsg5* é expresso em uma maior intensidade, sugerindo, desta forma, não ser essencial no processo patogênico invasivo desenvolvido por este fungo, uma vez que isolados mutantes que não expressavam este gene não apresentavam nenhuma perda na sua virulência (Fé-I.Garcia-Maceira *et al.* 2001).

O disparo inicial para a expressão das Poligalacturonases é a ativação do PacC via modulação do pH extracelular. Este fator transcricional se liga à região promotora específica de transcrição, ativando o processo de invasão. Sintetizadas as enzimas, estas são secretadas no meio extracelular atuando em seu substrato específico, as ligações de ácido poligalacturônico presentes na estrutura de pectina das células vegetais (Rollins 2003).

A rápida degradação dos polímeros de pectina presentes na parede celular da planta pela ação direta das Poligalacturonases, o acúmulo de produtos finais das reações e as variações do pH no meio, agem em conjunto como mecanismos de ativação e

repressão gênica, estabelecendo um padrão de cinética de expressão já caracterizado (Kasza *et al.* 2004; Martel *et al.* 1998).

É importante acrescentar que plantas também sintetizam Poligalacturonases, e estas são necessárias no processo de crescimento tecidual, importantes para o ciclo de vida, passando pela germinação, expansão celular até a maturação do grão de pólen, atuando de forma controlada e orientada (González-Carranza *et al.* 2007).

1.1.2.3- **Proteases:**

As proteases compõem uma fração das enzimas secretadas por *Sclerotinia sclerotiorum* durante a patogênese. Estas proteases atuam em conjunto com as Poligalacturonases e outras enzimas com a finalidade de fragmentar ao máximo a parede celular do hospedeiro, na busca por nutrientes essenciais ao seu crescimento e propagação (Billon-Grand *et al.*, 2002). Também são ativadas pelo fator transcricional PacC, nas mesmas condições que as PGs, ou seja, em pH ácido.

1.2- **Vias de Transdução:**

1.2.1- **Proteína G – Adenilato Ciclase – AMPc – PKA:**

Vários estudos buscam a análise dos processos moleculares e bioquímicos envolvidos na sinalização dos mecanismos de patogenicidade. Sabe-se que fungos de forma geral respondem a diferentes estímulos físicos e químicos através de sinais de seus hospedeiros que são detectados por receptores específicos localizados em suas membranas celulares. Neste caso, citamos uma proteína conhecida como Proteína-G,

composta por sete alças transmembrânicas de aminoácidos hidrofóbicos no domínio estrutural comum, cujas regiões N-terminal e C-terminal se localiza dentro e fora da célula, respectivamente (Dolhman *et al.* 1991). Esta proteína é um complexo heterotrimérico dividido em subunidades de cadeias polipeptídicas diferentes, denominadas α , β e γ , que interagem com efetores específicos desencadeando processos intracelulares direcionados (Kleuss *et al.* 1994). A subunidade α encontra-se acoplada ao dímero β - γ , sendo inativa nesta conformação. A subunidade α da Proteína-G está ligada à uma molécula de guanidina difosfato (GDP) e, uma vez ativada a Proteína-G, a subunidade α se dissocia da molécula total e recebe a ligação de uma Guanidina Trifosfato (GTP), buscando a ativação de outras proteínas. Este processo de ativação da Proteína-G possui como moduladora a própria subunidade α que se torna uma GTPase, hidrolizando GTP à GDP, voltando a proteína para a sua forma inativa. Entre as proteínas que seguem nesta cascata de sinalização, é bastante conhecida a Adenilato Ciclase, enzima que ao ser ativada é responsável pela utilização energética de moléculas de Adenosina Trifosfato (ATP) com formação de Adenosina 5'- Monofosfato Cíclico (AMPc), um conhecido mensageiro celular intracitoplasmático mediador de ações biológicas diversificadas. O AMPc sofre a ação de uma Fosfodiesterase AMPc Específica (PDEs), por hidrólise, , produzindo Adenosina Monofosfato (AMP). Desta forma, Adenilato Ciclase e PDEs trabalham juntas na modulação dos níveis de AMPc celular, demonstrado em *Candida albicans* (Wilson *et al.* 2007). Isolados mutantes de *Sclerotinia sclerotiorum* com deleção de Adenilato Ciclase mostraram alterações tanto morfológicas quanto de patogenicidade (Jurick II *et al.* 2007), dados também encontrados em *Magnaporthe grisea* (Choi and Dean 1997), onde se observaram as reduções no crescimento vegetativo, na formação e germinação de conídios e no desenvolvimento do apressório, todos fatores de virulência. Em *Ustilago maydis*,

observaram-se alterações significativas na estrutura morfológica das hifas, comprometendo o crescimento filamentosos da colônia (Gold *et al.* 1994).

A cascata do AMPc pode seguir por diversas vias, uma vez que faz parte também de vias constitutivas dos processos de percepção de nutrientes, crescimento, resposta ao estresse e morfogênese, já descritos em vários microrganismos, como *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *Ustilago maydis* (Hu *et al.* 2007; Jones *et al.* 2003; H Marcus *et al.* 2004; Larrava *et al.* 2005). Uma via bastante estudada dentro desta cascata é a que se direciona à Proteína Quinase-A (PKA). Esta proteína é uma enzima formada por duas subunidades catalíticas e duas regulatórias, que mudam de conformação frente a um aumento das concentrações de AMPc, liberando as subunidades catalíticas que têm como funções a fosforilação de diversas proteínas citoplasmáticas na célula (D'Souza *et al.* 2001) e na transcrição gênica, via fator de transcrição conhecido como Elemento de Ligação em Resposta ao AMPc (CRE1) (Vautard-Mey and Fèvre 2003) .

Dentre as funções que são estabelecidas por esta via do AMPc-PKA, podemos citar a relação direta entre os níveis de Adenosina 5'- Monofosfato Cíclico e a esclerogênese em *Sclerotinia sclerotiorum* (Rollins *et al.* 1998; Chen *et al.* 2004), e a importância deste mensageiro na regulação do crescimento e na patogenicidade demonstradas em *Magnaphorte grisea* (Adachi *et al.* 1998; Xu *et al.* 1996), *Ustilago maydis* (Dürrenberger *et al.* 1998; Gold *et al.* 1994), *Trichoderma virens* (Mukherjee *et al.* 2007) e *Cryptococcus neoformans* (D'Souza *et al.* 2001).

Deficiências na via Proteína G – Adenilato Ciclase – AMPc – PKA reduzem drasticamente a patogenicidade e a virulência em diversos microrganismos . Uma análise interessante do envolvimento do AMPc na patogenicidade de *Sclerotinia sclerotiorum* é a que relaciona esta molécula à síntese de um grupo de proteases,

denominadas de Aspartil Proteases, entre elas a Aspartil Protease 1 (Acp1), que é produzida pelo fungo nos estágios iniciais de infecção na planta (Girard *et al.* 2004). Entretanto, o estudo do envolvimento direto dos níveis de AMPc com a síntese de Poligalacturonases em *Sclerotinia sclerotiorum* ainda não está bem definido.

O cálcio seqüestrado da parede celular do tecido vegetal pode também ter uma contribuição direta no aumento da produção de AMPc, como foi demonstrado em pesquisas desenvolvidas com células embrionárias renais humanas e em neurônios espinhais do anfíbio do gênero *Xenopus* (Willoughby *et al.* 2005; Gorbunova and Spitzer 2002). Nestas avaliações, foram citadas as isoformas da Adenilato Ciclase conhecidas e, uma em especial, a Adenilato Ciclase – 8 (AC-8) que teve uma expressão diferenciada quando submetida a uma alta concentração de íons Cálcio, sendo ativada positivamente para produção de moléculas de AMPc. Desta forma, o cálcio funcionou como um elicitador da via de síntese do AMPc, mediado pela AC-8 nestas espécies.

1.2.2- RAS – MAPquinase (MAPK):

As proteínas RAS são importantes componentes de sinalização em muitos microrganismos, envolvidas com a sensibilidade aos vários tipos de estresse, e sua ativação resulta em alterações no crescimento e virulência de *Sccharomyces cerevisisae* (Broach 1991), *Candida albicans* (Leberer *et al.* 2001), *Neurospora crassa* (Kana-uchi *et al.* 1997) e em *Ustilago maydis* (Lee *et al.* 2002). De uma forma geral, as RAS estão vinculadas à moléculas de Guanosina Tri-Fosfato (GTP), que possuem a função de servir de substrato para a síntese de Ácido Ribonucléico (RNA), induzindo a mitogênese através da cascata do AMPc. Desta forma, as proteínas RAS estão ligadas a alterações na morfogênese de uma variedade de fungos.

Candida albicans pode apresentar uma função diferenciada quanto as proteínas RAS, isto é, estas podem estar associadas a uma aceleração de morte programada, ou seja, uma ação pró-apoptótica nas células leveduriformes em resposta a um sinal de estresse específico (Phillips *et al.* 2006).

Em *Sclerotinia sclerotiorum*, acredita-se no envolvimento destas proteínas na ativação da esclerogênese via RAS-MAPK, que possui como um alvo nesta linha, o gene *smk1*, e sua respectiva proteína Smk1. Sabe-se que o pH do meio também tem uma influência neste processo, isto é, a acidificação provocada pelo excesso de ácido oxálico secretado pelo fungo, e a diminuição dos nutrientes no tecido do hospedeiro, disparam a expressão *smk1*, desviando a via de patogenicidade para a via de resistência esclerogênica. A concentração de AMPc elevada inibe a ativação de da cascata da MAPK e de *smk1*, essenciais para a iniciação e maturação dos escleródios, sugerindo mais uma vez a importância dos níveis de Adenosina 5'- Monofosfato Cíclico dentro dos fatores de virulência deste fitopatógeno (Chen *et al.* 2004).

1.3- Cafeína:

Algumas substâncias são aplicadas no sistema celular visando verificar alguma resposta de expressão gênica e proteômica, podemos citar a utilização da Cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina), um análogo de base purínica, relacionada a uma variedade de processos bioquímicos em diferentes organismos vivos por atuar diretamente na inibição da fosfodiesterase AMPc específica, aumentando os níveis intracelulares de AMPc e estimulando respostas celulares diferenciadas (Rollins *et al.* 1998; Kuranda *et al.* 2006; Girard *et al.* 2004).

Por bloquear a degradação das moléculas de AMPc, a utilização da cafeína pode demonstrar muitos produtos que são AMPc dependentes, ou seja, que são formados através da ativação da cascata da Proteína G - Adenilato Ciclase –AMPc - PKA, ou ainda a que envolve RAS - MAPK, uma vez que moléculas de AMPc podem atuar inibindo esta via (Chen *et al.* 2005).

Em *Sclerotinia sclerotiorum*, a utilização de cafeína no meio de cultivo demonstrou uma influência positiva na esclerogênese (Rollins *et al.* 1998) e no aumento da síntese de uma protease ácida, a Acp1-ácida. Ao se analisar os efeitos desta substância na produção de Poligalacturonases nas mesmas condições de cultura, não se estabeleceu uma correlação direta da via do AMPc com a síntese destas enzimas (Girard *et al.* 2004).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral:

Este trabalho teve como objetivo geral determinar a relação entre os níveis de AMPc e a expressão de Poligalacturonases através da ação da cafeína.

2.2- Metas:

Dentro da proposta geral desta pesquisa, foram estabelecidas análises a serem obtidas a fim de se alcançar as respostas necessárias para finalização do trabalho, sendo:

2.2.1- Avaliar o desenvolvimento de *Sclerotinia sclerotiorum* quando submetida à diferentes concentrações de cafeína.

2.2.2- Determinar a ação dos níveis de AMPc em *Sclerotinia sclerotiorum*, sob condições de indução com pectina, na:

- Produção e secreção de Ácido Oxálico
- Atividade de Poligalacturonases e,
- Expressão dos genes de poligalacturonases (*sspgs*) e fator de transcrição *PacC*.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

O isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* utilizado foi o SPS, caracterizado no Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília. A cultura foi preparada em placa de Petri em meio BDA, (Batata-dextrose-agar: 250g; 20g; 15g; água destilada 1000 mL; pH 5.8 mantidas em estufa BOD à 20° C. O micélio foi estocado em 25% de glicerol à -80° C.

3.1- Resposta de *Sclerotinia sclerotiorum* a diferentes concentrações de cafeína em meio sólido:

Com o objetivo de analisar a influência de diferentes concentrações de cafeína no crescimento micelial e na esclerogênese de *Sclerotinia sclerotiorum*, o isolado foi inoculado com um (01) plug de cinco (05) mm de diâmetro em Meio Mínimo (MM) solidificado com 1,7% de Ágar, distribuídos em cinco (05) placas de Petri, tratados com cafeína a um (01), cinco (05), dez (10) e vinte (20) mM e uma placa como controle negativo, mantidas a uma temperatura de 20° C em estufa. Foram analisadas por um período de noventa e seis (96) horas, em tempos de vinte e quatro (24) horas, sendo medidos os halos de crescimento a partir do ponto central de inoculação, em milímetros, com o auxílio de uma régua e documentados por fotografia.

3.2- Análise da ação dos níveis de AMPc de *Sclerotinia sclerotiorum* na produção de Ácido Oxálico e Poligalacturonases e na expressão gênica das *sspgs* e *pacC*, em condições de indução com pectina:

3.2.1- Cultura Primária *in vitro*:

O micélio do isolado SPS de *Sclerotinia sclerotiorum* mantido no Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos da Universidade Federal de Goiás – Instituto de Ciências Biológicas II, foi inoculado na forma de um plug de cinco (05) mm de diâmetro, por placa de Petri contendo meio BDA, em um total de oito (08) placas, permanecendo para crescimento por cinco (05) dias em estufa BOD à 20° C.

3.2.2- Cultura Secundária *in vitro*:

Após a etapa inicial de obtenção de uma amostra “jovem”, foram retirados plugs de cinco (05) mm de diâmetro contendo micélio da cultura primária. A cada Erlenmeyer utilizado nesta fase, foram transferidos quatro (04) plugs da cultura primária visando à obtenção de uma massa micelial mais significativa para prosseguimento da análise. Preparou-se um total de dois mil quinhentos (2500) mL de Meio Mínimo (MM), [Nitrato de Amônia: 5g; Fosfato de Potássio: 2,5g; Sulfato de Magnésio: 0,25g; Extrato de Levedura: 1,25g; Ácido Málico: 7,5g; Hidróxido de Sódio: 2,5g e Água Destilada q.s.p.] suplementado com glicose à 2%, sendo empregado nesta etapa setecentos e cinquenta (750) mL, distribuídos em trinta (30) Erlenmeyers contendo vinte e cinco (25) mL de MM cada um. Este material foi autoclavado e, em seguida, o meio foi inoculado com micélio de *Sclerotinia sclerotiorum* da cultura primária, sendo

adicionado 100 µg/ml de Ampicilina em cada Erlenmeyer, com o objetivo de eliminar uma possível contaminação bacteriana. Estes frascos foram então vedados com tampões de gaze-algodão hidrófobo e papel craft, colocados no shaker à 20° C e cento e vinte (120) r.p.m. por dois (02) dias para crescimento.

3.2.3- Cultura Terciária *in vitro* – Etapa de Indução:

A massa micelial obtida na cultura secundária foi utilizada para a fase de indução, visando analisar as diferentes respostas do fungo frente aos tratamentos. O MM foi distribuído em Erlenmeyers, contendo cada um cinquenta (50) mL. Após esta divisão, cada frasco recebeu a respectiva suplementação e tratamento, sendo glicose 2%, glicose 2% e cafeína 5mM, pectina 1% e pectina 1% e cafeína 5 mM. Todos os Erlenmeyers desta fase foram colocados no shaker à 20° C e cento e vinte (120) r.p.m., permanecendo neste equipamento por um período de até noventa e seis (96) horas.

3.2.4- Retirada dos Pontos de Indução:

Após a colocação dos frascos da etapa de cultura terciária no shaker, foram estabelecidos os pontos de retirada dos mesmos, sendo: pontos de doze (12), vinte e quatro (24), quarenta e oito (48), setenta e duas (72) e noventa e seis (96) horas de interação para cada tratamento processado. A cada ponto, seguia-se a separação da massa micelial e do meio líquido de cultura. Os frascos eram retirados do shaker, e submetidos à filtração em um Kitassato e funil de Buchener acoplado a uma bomba-à-vácuo. O meio líquido de cultura de cada tratamento foi retirado do Kitassato e dividido em tubos graduados Falcon do tipo cônico e em uma pequena alíquota de 1,5 mL em tubos de microcentrífuga, rotulados com data-ponto-tratamento, submergidos em

nitrogênio líquido e acondicionados no freezer à -20° C. Os micélios de cada tratamento foram retidos em papéis de filtro autoclavados colocados sobre o funil, lavados com água destilada autoclavada, vedados em papel alumínio, rotulados com data-ponto-tratamento e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Nesta etapa, a cada retirada de ponto, foi aferido o pH do meio de cultura de cada Erlenmeyer retirado do shaker para separação das fases.

3.2.5- Análise do meio líquido de cultura:

As alíquotas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml do meio líquido de cultura estocadas no freezer foram submetidas a duas análises, sendo:

- Atividade Enzimática:

Esta análise foi baseada no método do DNS que permite a dosagem de açúcares redutores pelo 3,5- dinitrosalicilato (Miller, 1959). Pela ação das Poligalacturonases presentes no meio líquido de cultura sobre o substrato específico, no caso a pectina, resultando na liberação de açúcares que têm a capacidade de reduzir o reagente DNS. As amostras foram centrifugadas a doze mil (12000) r.p.m. por vinte (20) minutos a 04° C e submetidas à análise em triplicata. Foi preparado o substrato da reação contendo Tampão Acetato 0,05 M e pH 5,0 suplementado com 0,5% de pectina. Este teste foi desenvolvido em tubos de ensaio colocados em incubados a uma temperatura de 50° C, sendo que cada um recebeu duzentos e vinte e cinco (225) µL de substrato e, ao serem adicionadas as amostras, marcou-se um tempo total de dez (10) minutos. Em seguida, foi pipetado um volume de setecentos e cinquenta (750) µL do reagente DNS em cada

tubo, fervido por cinco (05) minutos, resfriado em banho de gelo e acrescentado cinco (05) mL de água destilada. No preparo do branco da reação, foi mantido o volume do substrato e acrescentado vinte e cinco (25) μ L de MM. As amostras foram levadas à leitura por espectrofotometria em um comprimento de onda de quinhentos e setenta e cinco (575) nm, para anotação dos valores de absorbância, sendo estes relativos à Atividade Enzimática das amostras.

- Dosagem de Proteínas Totais:

Os ensaios para verificação da concentração de proteínas totais seguiram a metodologia de Bradford (Bradford M.M., 1976), que tem como princípio a formação de um complexo corado, detectável por espectrofotometria, pela ligação entre o corante Azul de Coomassie brilhante e as proteínas presentes na amostra analisada. Inicialmente foi traçada uma curva padrão com albumina sérica bovina (BSA) e o reagente de Bradford, onde o eixo “x” equivale à concentração protéica e o eixo “y” às absorbâncias (Abs) para validação dos resultados. Os teste foram feitos em triplicata, utilizando trinta e três (33) μ L das amostras do meio líquido de cultura aliquoteadas, sessenta e sete (67) μ L de água destilada para um (01) mL do reagente de Bradford, homogeneizados em tubos de ensaio e deixados em repouso à temperatura ambiente por cinco (05) minutos. Ao término deste tempo, os ensaios foram levados à leitura espectrofotométrica em um comprimento de onde de quinhentos e noventa e cinco (595) nm para anotação das absorbâncias, multiplicando-se os valores pelo fator três (03), devido a proporção necessária para a reação ser de 1:3. O branco da reação foi preparado com um (01) mL do reagente de Bradford adicionado com cem (100) μ L de água destilada. Os valores

das absorbâncias obtidas foram plotados na curva padrão de BSA e anotadas as respectivas concentrações protéicas.

3.2.6- Análise da expressão dos genes de poligalacturonases:

▪ Extração e Isolamento do RNA total:

As amostras micelianas que estavam congeladas em nitrogênio líquido foram submetidas à extração de Ácido Ribonucléico (RNA) total pela metodologia do Trizol (Invitrogen). O micélio de cada tratamento foi triturado em cadinho e pistilo, adicionando-se nitrogênio líquido para evitar o descongelamento, até ter o aspecto de pó. Em seguida, este material com um peso de 0,5 g foi colocado em um tubo de ensaio graduado cônico de polietileno homogeneizado com cinco (05) mL do reagente Trizol e ressuspendidos em vórtex por quinze (15) minutos, deixado em repouso por cinco (05) minutos à temperatura ambiente, permitindo uma eficiente dissociação das ribonucleoproteínas de interesse. Foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio por mL de reagente Trizol, homogeneizados vigorosamente no vórtex e deixadas novamente em repouso por cinco (05) minutos à temperatura ambiente. Após este prazo, foram centrifugadas a nove mil (9000) r.p.m. por quinze (15) minutos a uma temperatura de 4° C, com o objetivo de separar o RNA total de possíveis interferentes, como membranas celulares, Ácido Desoxirribonucléico (DNA) e polissacarídeos. O RNA, posicionado no sobrenadante após esta centrifugação, na chamada fase aquosa ou polar, foi retirado com o auxílio de uma ponteira RNase Free e micropipeta, distribuído em tubos de microcentrífuga, acrescentado-se álcool isopropílico para um volume de 1,5 mL, precipitando o RNA total. O material permaneceu em repouso por vinte (20) minutos à

temperatura ambiente e em seguida foi centrifugado a doze mil (12000) r.p.m. por vinte (20) minutos à 4° C. O resultado desta segunda centrifugação foi a formação de um pellet esbranquiçado no fundo do tubo, correspondendo ao RNA total. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspenso e lavado com etanol 75% gelado, com um volume de um (01) ml, homogeneizados em vórtex e novamente centrifugado em doze mil (12000) r.p.m. à 4°C por quinze (15) minutos. Na temperatura ambiente, o etanol sofreu evaporação, permanecendo o pellet úmido, que foi ressuspenso em cinquenta (50) µL de água milli-q tratada com DEPC, incubado a 60° C por dez (10) minutos e congelado no freezer. As amostras congeladas estavam aliqüotadas em três (03) Eppendorfs para cada tratamento em todos os pontos, sendo necessária uma etapa de separação, que consiste em ressuspenso o RNA total em um único Eppendorf, sendo levadas ao banho-maria a uma temperatura de 65° C por cinco (05) minutos e imediatamente colocadas em banho de gelo, em seguida, centrifugadas à nove mil (9000) r.p.m. por dez (10) minutos. Desta forma, as amostras foram separadas entre sobrenadante e material centrifugado (pellet), em tubos diferentes, e novamente congeladas no freezer, estocados à -20°C. Este processo foi repetido para cada ponto em todos os tratamentos e cada Eppendorf utilizado foi rotulado com amostra-data-ponto-tratamento.

- Quantificação do RNA total por Espectrofotometria – UV:

As amostras congeladas foram diluídas em uma proporção de 1/1000, sendo um mil, novecentos e noventa e oito (1998) µL de água milli-q para dois (02) µL de RNA total, homogeneizados e levados à leitura das absorbâncias (Abs) em espectrofotometria com ultra-violeta (UV) e cubetas de quartzo, nos comprimentos de onda em duzentos e

sessenta (260) nm e de duzentos e oitenta (280) nm, utilizando-se água como branco para zerar o equipamento. A quantificação foi dada pela fórmula: $Abs\ 260\ nm \times 1000 \times 40 / 1000$, e o resultado liberado em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

- Qualidade do RNA total:

A avaliação da qualidade da amostra foi calculada utilizando-se a fórmula: $Qualidade\ do\ RNA = Abs.\ 260\ nm / Abs.\ 280\ nm$, sendo as Abs obtidas no espectrofotômetro. Este valor deve ser próximo de 1,8, equivalente a uma boa qualidade.

- Quantificação e Qualidade do material em Gel de Agarose 1%:

Pela fórmula: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, sendo C_1 a concentração inicial obtida pela espectrofotometria – UV ($Concentração\ em\ \mu\text{g}/\mu\text{L} = Abs\ 260\ nm \times 1000 \times 40 / 1000$), C_2 a concentração final de um (01) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e V_2 o volume final de 10 μL a ser aplicado no Gel de Agarose 1% RNase Free (Sambrook & Russel, 2001) e submetido à eletroforese, encontra-se o valor de V_1 : volume inicial de amostra que deve ser equivalente a um (01) μg de RNA total. A agarose é um polissacarídeo que forma uma verdadeira rede que dificulta a migração de moléculas quando submetidas à ação de um potencial elétrico, criando padrões visíveis em ultravioleta pelo acréscimo de Brometo de Etídio durante a preparação do gel. Este reagente tem a capacidade de se intercalar nas moléculas dos ácidos nucleicos, DNA ou RNA, tendo um caráter fluorescente ao contato com UV.

- Purificação do RNA total:

As amostras foram tratadas com DNase I® (Invitrogen) para eliminar as fitas de DNA presentes nas amostras. Esta endonuclease digere fitas simples e fitas duplas de DNA hidrolisando as cadeias fosfodiéster produzindo mono e oligonucleotídeos com grupos 5' fosfato e 3' hidroxila. O tratamento foi feito conforme instruções do fabricante. Para tratar 1 g de RNA total, utilizou-se 1µl do tampão DNase I (10X); 1µl da enzima DNase I; o volume foi completado para 10 µl final com água Milli-Q tratada com DEPC. As amostras foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente, a seguir adicionou-se 1µl de EDTA (25 mM) em cada uma das amostras inativando a DNase I e parando a reação. As amostras foram aquecidas a 65° C por 10 min.

- Desenho de Oligonucleotídeos para amplificação dos genes:

Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para alguns genes descritos no processo de infecção, sendo *sspg1* (AF501307), *sspg3* (AY312510), *sspg5* (AY496277), *sspg6* (AF501308), *sspg7*(CD645693) e para o fator de transcrição *pacC* (SS1G07355.1). Foram também sintetizados oligonucleotídeos para amplificação de um fragmento do gene 28S do rDNA. Esse gene serviu como controle interno nos experimentos de RT-PCR semi-quantitativa realizados. Os oligonucleotídeos foram desenhados com base nas seqüências obtidas pelo Projeto Transcriptoma de *S.sclerotiorum* (Li *et al.*, 2004), utilizando-se o *software Primer-3*, disponível *on-line* (<http://www-genome.wi.mit.edu>). Os oligonucleotídeos foram posteriormente sintetizados pela *GenScript Corporation*. As características dos iniciadores utilizados nesse trabalho estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos Oligonucleotídeos utilizados

<i>Genes</i>	Possíveis funções	Nº de acesso no <i>Gene Bank</i>	PRIMERS (5'-3')	Tamanho fragmento amplificado	TM (°C)
<i>ssp1</i>	Endopoligalacturonase	L1202	-TCTTGCAAGCAGTCGAGAAGA- -GTGTTGTGTCCGAGGGAGTT-	495	60
<i>ssp3</i>	Endopoligalacturonase	AY312510	-ACCCACCACTTTGGCTACTG- -TGAGACGGTAAGACCCTTGG-	448	60
<i>ssp5</i>	Endopoligalacturonase	<u>CD646235</u>	-TGTCCAAGTTTTCAGTATT- -CTACCAGCATTTCCATTAT-	452	60
<i>ssp6</i>	Endopoligalacturonase	CD645962	-AAGCTTATGGAATGGGTAT- -CTGGAGTTGACGATTTGACTA	462	60
<i>ssp7</i>	Endopoligalacturonase	CD645693	-TCCGGTTACGAGGATGTTA- -GTCCTGGACACGTCATT-	380	60
PacC	Transcription factor PacC	SS1G07355.1	-GCAGCCAATCCTATGGGTTA- -GACGGAAGTTGAGAGCTTGG-	592	60
rDNA	28S		-GGTGGAGTGATTTGTCTG- -CTTACTAGGGATTCTCTCG-	617	65

▪ RT- PCR (Transcriptase Reversa):

Para a síntese do cDNA 1µg de RNA total, sem DNA, foi colocado em microtubo de PCR e a este foram acrescentados 1µl de oligo (dT) (50 µM) Invitrogen e 1µl de dNTP mix (10mM) (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP em pH neutro). Os volumes foram ajustados com água para 13µl. As amostras foram aquecidas a 65° C por 5 min e incubadas em gelo por 1 min. A transcrição reversa foi feita utilizando o kit da *Invitrogen Super Script™ III Reverse Transcriptase*. Em cada um dos tubos foram adicionados 6 µl do mix contendo: 4µl do tampão *First-Stand* (5X); 1µl DTT (0,1 M); 1µl *Super Script™ III RT* (200 unidades/µl). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 min. A seguir, no termociclador, incubou-se a 50° C por 60 min; a reação foi inativada, aquecendo-a a 70° C por 15 min.

- Reação da Polimerase em Cadeia (PCR):

Para as reações em cadeia de polimerase utilizou-se o kit da *Invitrogen Platinum Taq DNA polimerase*. Para cada um dos tratamentos e para cada um dos pontos coletados foi observada a expressão gênica de cinco (05) isoformas das Poligalacturonases (*spsg1*, *spsg3*, *spsg5*, *spsg6* e *spsg7*) e do gene *pacC*. A PCR semi-quantitativa foi feita utilizando o oligo do rDNA 28 S como controle interno para as PGs e para o gene da PACc utilizou-se o oligo da actina como controle interno. Em microtubos de PCR uma alíquota correspondente a 1/5 da reação de síntese de cDNA foi submetida à reação de amplificação em volume final de trinta (30) µl contendo: três (03) µl do tampão *Taq DNA polimerase* (10X); 0,9µl Mg Cl₂ (50mM); 0,3 µl DNTP (25 mM); um (01) µl *sense primer* e um (01) µl *antisense primer* das PGs; um (01) µl *sense primer* e um (01) µl *antisense primer* para os oligos de controle interno; e 0,5 µl da enzima *Taq DNA polimerase* (5U/µl). No termociclador as amostras foram aquecidas a 95° C por dois (02) minutos para a desnaturação; vinte e cinco (25) ciclos de 92° C por um (01) minuto e trinta (30) segundos; 45° C por um (01) minuto; 72° C por um (01) minuto e trinta (30) segundos; e uma extensão final de 72 °C por cinco (05) minutos. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Para isso utilizou-se o tampão TBE e brometo de etídeo para visualização das bandas em luz UV.

- Quantificação dos níveis de expressão gênica:

A análise dos resultados obtidos visando à quantificação dos níveis de expressão do gene de interesse foi feita por densitometria, utilizando-se o programa “*Scion*

Image”, disponível no endereço da internet <http://www.scioncorp.com>. Os níveis de expressão do gene rDNA 28S, constitutivo para *S. sclerotiorum*, permitiram a normatização dos resultados. A partir dos valores obtidos por densitometria, referentes a cada fragmento amplificado, foi determinada a razão entre o nível de expressão dos genes de Poligalacturonases em relação à expressão do gene controle (rDNA 28S), para cada uma das condições (tratamento e controle) empregadas.

4- RESULTADOS

4.1- Resposta de *Sclerotinia sclerotiorum* a diferentes concentrações de cafeína em meio sólido:

Para a análise de crescimento micelial em placa de Petri foi observado um comportamento diferenciado de *S. sclerotiorum* frente às variações na concentração de cafeína, de um (01, cinco (05), dez (10) e vinte (20) mM. Os resultados demonstraram um crescimento micelial diferenciado significativo, dado em milímetros (mm), sendo máximo e em uma velocidade maior na concentração de um (01) mM quando comparado ao controle negativo. À cinco (05) mM, a curva de crescimento foi mais uniforme e nas concentrações de dez (10) e vinte (20) mM o crescimento foi mais lento. Os dados foram analisados de acordo com o figura 4.

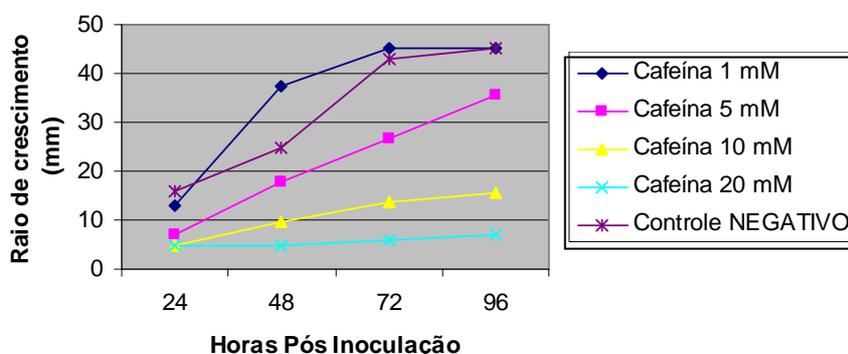


Figura 4: Análise do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* submetida à diferentes concentrações de cafeína O isolado SPS foi inoculado em Meio Mínimo e 1,7% de Ágar, submetida à diferentes concentrações de cafeína, sendo 1, 5, 10 e 20 mM mais controle negativo, a uma temperatura de 20° C em estufa BOD.

Conforme foram aumentadas as concentrações de cafeína, as hifas tornaram-se mais grossas e compactas, sendo que nas concentrações de dez (10) e vinte (20) mM houve o aumento na pigmentação a ocupação incompleta da placa de Petri no decorrer de dez (10) dias de experimento, de acordo com a figura 5.

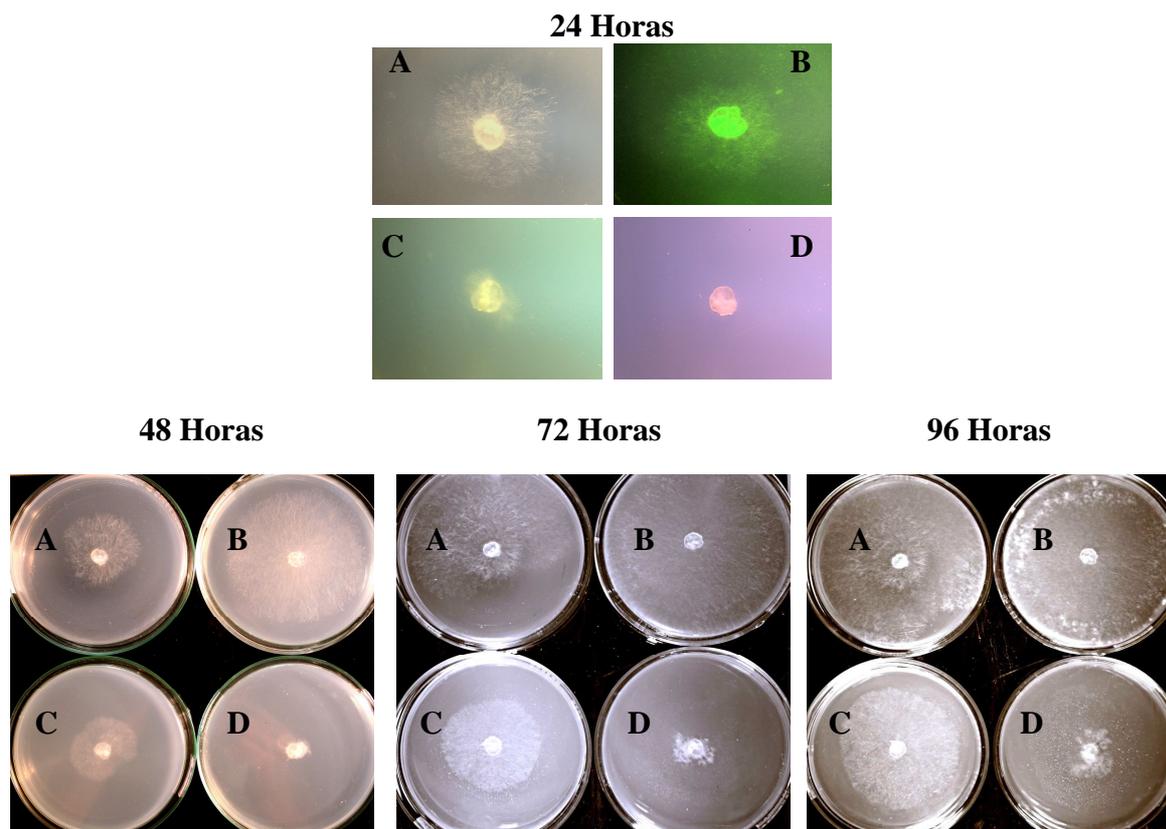


Figura 5: Comparação do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em Meio Mínimo – Ágar 1,7 % tratados com diferentes concentrações de cafeína. Sendo: (A) Controle Negativo; (B) Cafeína 1 mM; (C) Cafeína 5 mM e (D); Cafeína 10 mM.

Em relação à esclerogênese, foi apresentado um desenvolvimento mais lento das fases de iniciação e de maturação dos escleródios, além de alterações durante a agregação das hifas, resultando em estruturas menores nos tratamentos com cafeína, quando comparadas ao controle negativo para este tratamento. A análise foi feita no ponto final de dez (10) dias, sendo que neste ponto, nas concentrações de dez (10) e vinte (20) mM de cafeína, não houve formação de escleródios (Figura 6).

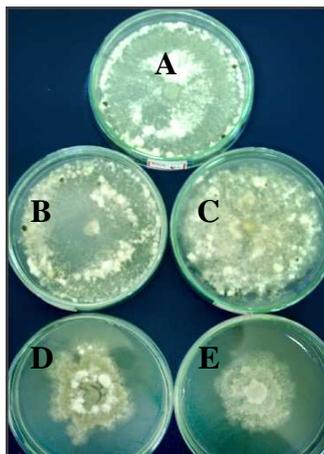


Figura 6: Comparação do padrão de crescimento e do desenvolvimento da esclerogênese de *Sclerotinia sclerotiorum* em cultura de Meio Mínimo e Agar 1,7%, tratados com diferentes concentrações de cafeína. Sendo: (A) Controle negativo; (B) Cafeína 1 mM; (C) Cafeína 5 mM; (D) Cafeína 10 mM; e (E) Cafeína 20 mM. As amostras foram avaliadas a cada vinte e quatro (24) horas e fotografadas no ponto final de dez (10) dias.

4.2- Análise da ação dos níveis de AMPc de *Sclerotinia sclerotiorum* na produção de Ácido Oxálico e Poligalacturonases e na expressão gênica das *sspgs* e *pacC*, em condições de indução com pectina:

4.2.1- pH:

A análise do sobrenadante da cultura demonstrou uma discreta alteração nos valores de pH quando comparados os tratamentos com a presença e a ausência de cafeína. A secreção de ácido oxálico foi maior nas culturas que receberam a cafeína durante o processo de indução (Figura 7).

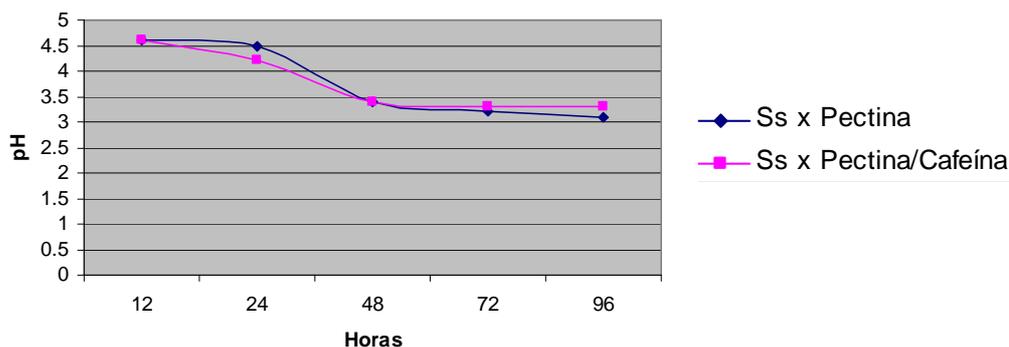


Figura 7: Valores de pH obtidos em cultura de *Sclerotinia sclerotiorum* em MM. Avaliação das variações de pH durante a cinética de crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio suplementado com Pectina. A cafeína foi adicionada em um dos tratamentos a uma concentração final de 5 mM.

Foi obtido nesta avaliação um decréscimo nos valores de pH em ambos os tratamentos, partindo de um valor de 4,6 no ponto de doze (12) horas após a indução, para valores de 3,4 no ponto de quarenta e oito (48) horas, e a partir deste ponto, os valores permaneceram relativamente constantes até o término do período avaliado (Figura 7).

4.2.2.- Atividade enzimática:

A cafeína antecipou a atividade enzimática durante a cinética pesquisada, com um valor estatisticamente significativo no período de vinte e quatro (24) horas, enquanto que o tratamento sem este inibidor mantém o ponto de maior atividade no tempo de quarenta e oito (48) horas. Os resultados também demonstraram uma conservação de alta atividade até o período de noventa e seis (96) horas no tratamento com cafeína, em oposição ao meio sem este inibidor, conforme figura 8.

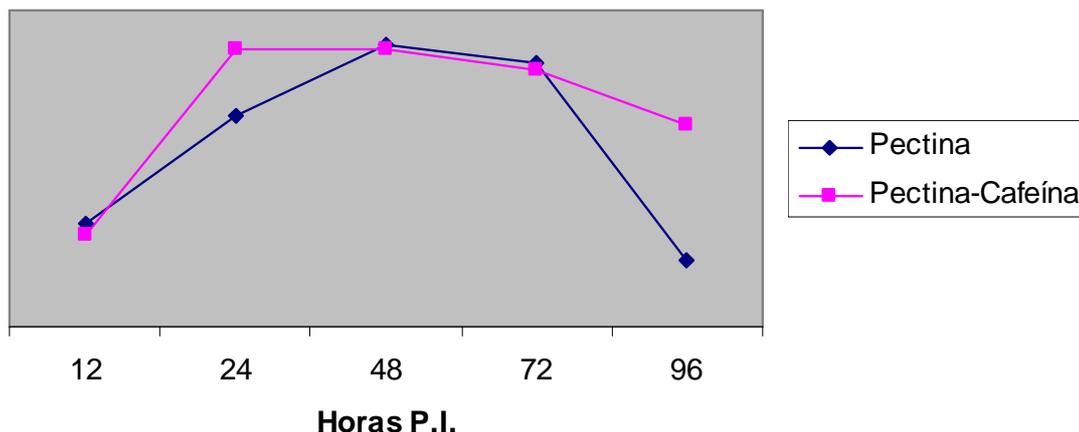


Figura 8: Atividade enzimática das Poligalacturonases secretadas por *Sclerotinia sclerotiorum* cultivada em MM suplementado com 1%Pectina. Análise comparativa entre a atividade enzimática, pela metodologia do DNS, presentes no meio líquido de cultura na presença e na ausência de cafeína 5 mM. A figura representa valores de absorbância obtidos por espectrofotometria em 575 nm, corrigidos pela concentração de proteínas totais (Bradford) presentes nas amostras, em função do tempo de crescimento em cultura pós indução (P.I.).

4.3.3- Análise da expressão dos genes de poligalacturonases.

Os resultados obtidos pela análise de expressão gênica das poligalacturonases *sspg1*, *sspg3*, *sspg5*, *sspg6* e *sspg7* durante o confronto entre os dois tratamentos demonstraram um aumento da expressão dos genes de *sspg1* e *sspg7* nas culturas que receberam a cafeína. Os demais genes pesquisados tiveram uma variação na cinética de expressão, principalmente no ponto de noventa e seis (96) horas. Estes dados podem ser observados pela análise da RT-PCR na cinética de indução conforme a análise das figuras 9 e 10, sendo esta última obtida por densitometria através do programa “*Scion Image*” (www.scioncorp.com).

É importante ressaltar que na confecção da RT-PCR, a amplificação foi conjunta, ou seja, o fragmento do gene rDNA 28S foi amplificado juntamente com o gene de interesse em cada amostra, sendo um controle interno da reação. Com este procedimento, a expressão obtida foi lançada no programa *Scion Image*, calibrado de acordo com a intensidade mostrada nas ampliações do fragmento de rDNA 28S, desta

forma, os valores resultantes foram normatizados para a concentração de mRNA (um micrograma) possibilitando a comparação entre os tratamentos.

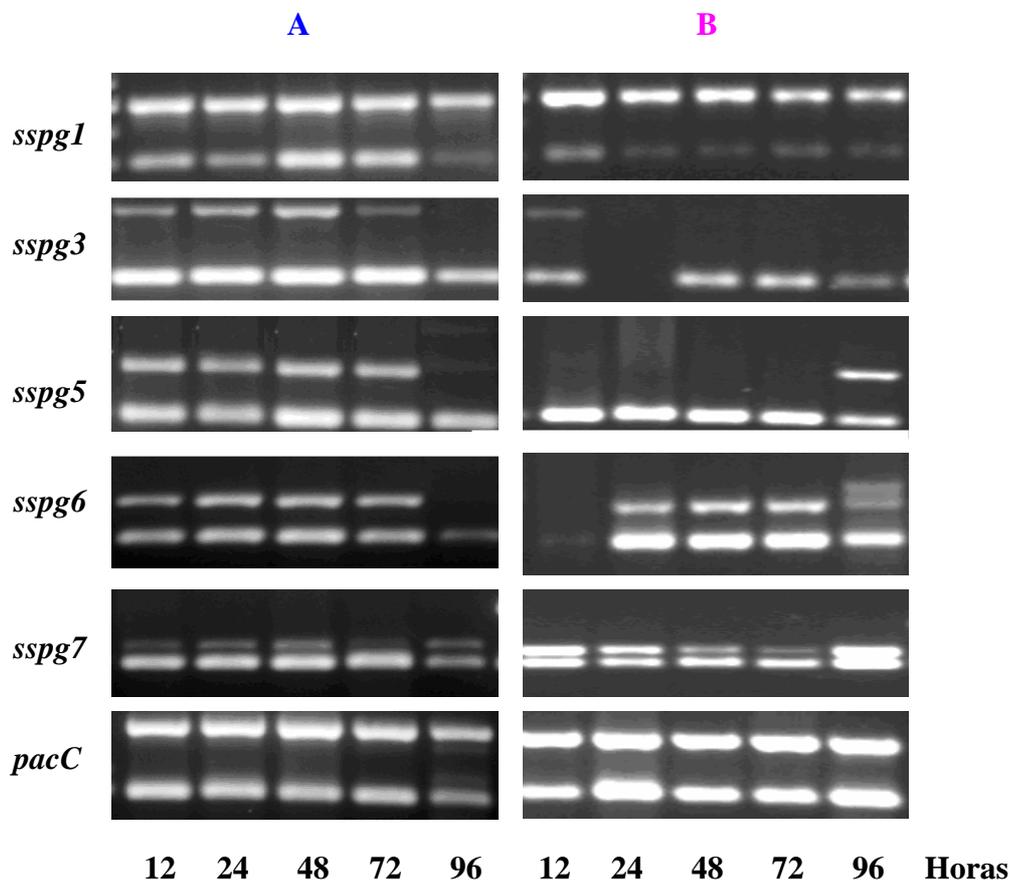


Figura 9: Análise comparativa da expressão dos genes de Poligalacturonases (*pg*) e PacC de *S. sclerotiorum* quando do cultivo do fungo por diferentes intervalos de tempo em meio contendo 1 % de pectina (MM-pectina) como única fonte de carbono. (A) MM-Pectina e (B) MM-Pectina-Cafeína 5 mM. A verificação dos níveis de expressão gênica foi feita por meio de RT-PCR semiquantitativa. A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 1 µg de RNA total isolado de *S.sclerotiorum*, após cultivo em meio mínimo suplementado com 1% de pectina (Sigma). Uma alíquota correspondendo a 1/5 da reação de síntese de cDNA (5µL), foi empregada como molde para amplificação, em uma mesma reação, de um fragmento do gene de interesse (*pgs* ou *pacC*) e do gene constitutivo rDNA 28S. Para todos os experimentos, o fragmento de DNA inferior representa a porção amplificada do gene rDNA, empregado como controle interno da reação. Vinte µL da PCR foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. Poços 2, 3, 4, 5 e 6: RT-PCR feita a partir do RNA total de *S.sclerotiorum* cultivado em meio MM-pectina por 12h, 24h, 48h, 72h e 96h, respectivamente.. MM: Marcador de massa molecular “1 Kb ladder”, Promega.

Pela análise densitométrica, *sspg1* (Figura 9-A) foi o mais expresso nas primeiras quarenta e oito (48) horas após o processo de indução, tanto no meio sem a

caféina quanto em sua presença. A diferença entre os dois tipos de tratamento está na antecipação desta expressão, que foi evidente e em maior quantidade na presença de caféina no ponto de doze (12) horas, resultados semelhantes aos encontrados para o gene *speg7* (Figura 10-E). As análises dos outros genes *speg*s, 3, 5 e 6, demonstraram um perfil também diferenciado entre os dois tratamentos, com uma expressão bem significativa no ponto final de noventa e seis (96) horas (Figura 10-B, C e D).

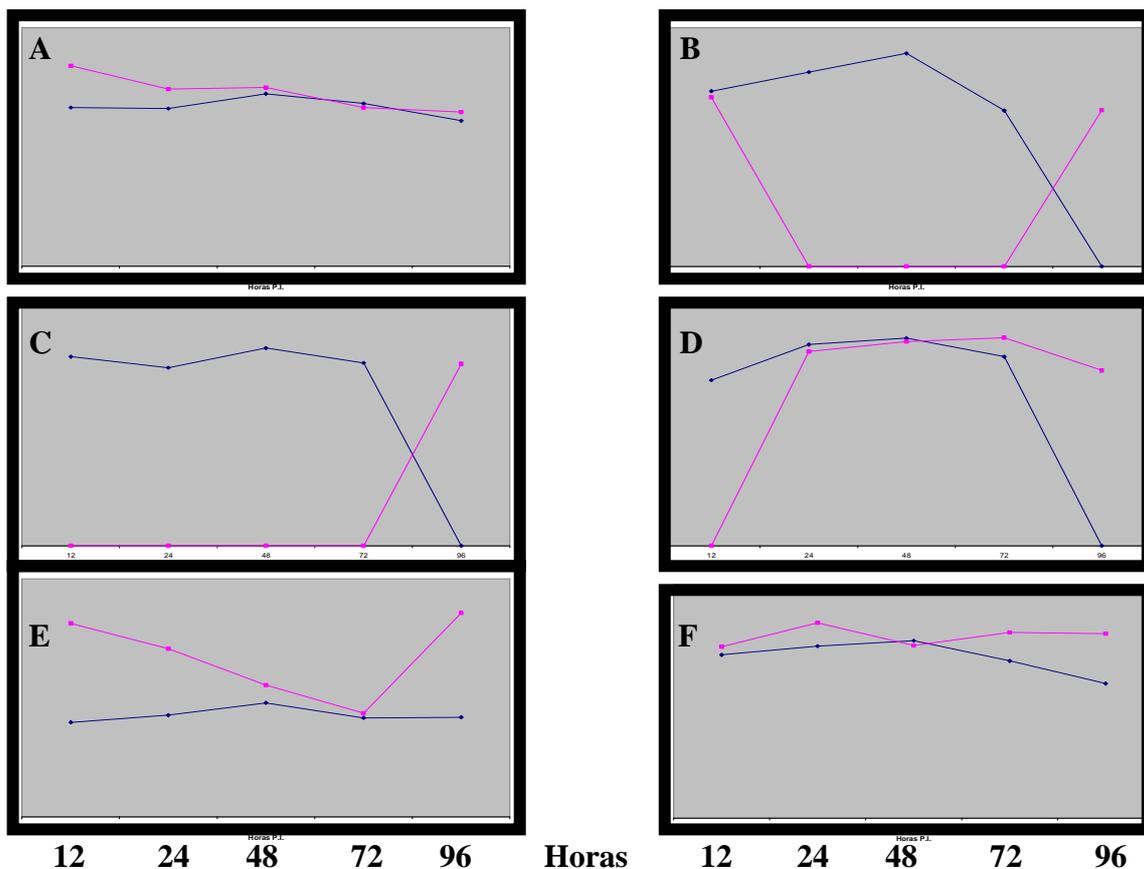


Figura 10. Análise semiquantitativa dos níveis de expressão dos genes de Poligalacturonase (*speg*) e *pacC* de *S. sclerotiorum* feita utilizando-se ferramentas do programa “Scion Image”. Os resultados referentes aos níveis de expressão dos genes *speg1*, *speg3*, *speg5*, *speg6*, *speg7* e *pacC* foram quantificados por densitometria empregando-se o programa “Scion Image” (<http://www.scioncorp.com>). O gráfico representa a média das razões entre o nível de expressão dos genes de Poligalacturonases e PacC de *S. sclerotiorum*.

- PacC:

Os resultados sobre a expressão do fator de transcrição *pacC* entre os dois tratamentos demonstraram uma indução positiva na transcrição deste gene na presença de cafeína, com uma expressão acentuada no ponto de vinte e quatro (24) horas, e que esta se manteve relativamente constante em relação à cultura sem este inibidor, evidenciado pelas análises na RT-PCR e densitometria nas figuras 9 e 10-F, respectivamente.

5- DISCUSSÕES

5.1- Resposta de *Sclerotinia sclerotiorum* a diferentes concentrações de cafeína em meio sólido:

A avaliação dos resultados do experimento que analisa o comportamento de *Sclerotinia sclerotiorum* frente a diferentes concentrações de cafeína identifica-se com os trabalhos já descritos por Rollins e Dickman (1998); Lee e Dean (1993); Chem *et al.* (2007) e Kuranda *et al.* (2006), que traçaram relações entre moléculas de AMPc e fatores de virulência em diversos microorganismos, em especial o trabalho de Rollins e Dickman (1998), que analisaram a influência das variações da concentração do AMPc na produção de escleródios deste fitopatógeno. Os resultados obtidos, nesta pesquisa, mostraram que ocorre uma influência positiva da cafeína na bioquímica de *Sclerotinia sclerotiorum*, aumentando a concentração de moléculas de Adenosina 5'-Monofosfato cíclico, e conseqüentemente alterando os processos celulares envolvidos no crescimento.

Em Girard *et al.* (2004), ficou demonstrado a relação entre os níveis de AMPc e a síntese de uma protease ácida, *Asp1*, sendo que a cafeína em uma concentração de um (01) mM não teve efeito positivo na produção de Poligalacturonases. Em nossas análises, ficou demonstrada uma correlação positiva entre o uso da cafeína e alterações na expressão gênica de fatores de virulência, entre eles as poligalacturonases. Para a pesquisa principal deste trabalho, foi colocado como tratamento a cafeína em uma concentração de cinco (05) mM, diferindo do trabalho citado acima.

Concentrações superiores a dez (10) mM de cafeína tornaram-se inibidoras do crescimento micelial em Meio Mínimo, talvez por interferir direta ou indiretamente em

outros processos celulares além dos de patogênese, uma vez que moléculas de AMPc possuem uma infinidade de funções intra-celulares ainda não descritas.

5.2- Análise comparativa dos efeitos da cafeína na produção de fatores de patogenicidade de *Sclerotinia sclerotiorum*:

A acidificação do meio é essencial para a continuidade do processo de invasão de *Sclerotinia sclerotiorum* nos tecidos vegetais, e esta diminuição do pH é resultante da secreção de ácido oxálico pelo fungo. Esta acidificação ativa seletivamente genes de ataque sobre as barreiras do hospedeiro. Em Cotton *et al.* (2003), foi apresentada a importância do ambiente de pH ácido como o determinante da patogenicidade, ativando fatores transcricionais específicos de genes envolvidos no ataque proteolíticos, pectinolíticos entre outros. Isto também foi encontrado em nossos resultados que demonstraram uma alta atividade das poligalacturonases quando os valores de pH diminuíram nas primeiras quarenta e oito (48) horas após o processo de indução com pectina. Estas análises são corroboradas com o trabalho de Rollins *et al.* (2001) ao evidenciar que as enzimas secretadas por *Sclerotinia sclerotiorum* apresentam um pH ótimo de atividade em condições ácidas. A liberação de ácido oxálico, no tecido hospedeiro, além de favorecer o pH ótimo para as enzimas hidrolíticas em geral, é diretamente tóxico para o hospedeiro, atuando também como quelante de íons cálcio, desestruturando a bioquímica celular das plantas, conforme discutido em Cessna *et al.* (2000).

Pelos dados obtidos no decorrer dos experimentos, podemos observar a ação positiva da cafeína nos processos de patogenicidade, como a antecipação no aumento da

atividade enzimática e diminuição do pH, além do aumento na expressão dos genes *spg1*, *spg7* e do *PacC*.

A cafeína, sendo um inibidor de uma fosfodiesterase específica, aumenta os níveis de AMPc intracitoplasmático, com isto, há uma alteração significativa nos processos bioquímicos do fungo, uma vez que esta molécula possui uma série de funções, tanto de caráter constitutivo quanto patogênico. Desta forma, a elaboração de uma via única entre o processo de ativação por um elicitador até a secreção de Poligalacturonases fica comprometida, uma vez que o aumento da concentração de AMPc pode interferir na ativação de outras vias importantes do processo. Mas é certo que o papel do AMPc é importante no mecanismo de patogenicidade, o que podemos notar nos resultados da diminuição do pH, pelo aumento da expressão do *pacC*, que é o fator responsável pela transcrição das poligalacturonases, evidenciada também pelo aumento das expressões de *spg1*, iniciadora do processo de ação enzimática, e *spg7*.

De acordo com Kasza *et al* (2004), as Poligalacturonases que participam diretamente da etapa inicial de invasão, talvez possuam uma ação diferencial no sistema ou até mesmo podem sofrer uma maior repressão pelas altas concentrações de AMPc ou pelos produtos catabólicos da despolimerização da pectina presentes no meio de cultura nestas horas iniciais do processo. Diferente da análise feita *in vivo* por Kasza *et al.* (2004), o gene *spg5* foi expresso durante toda a cinética avaliada *in vitro*, sugerindo sua importância nas etapas de invasão e colonização do tecido do hospedeiro.

Pela análise dos níveis de atividade enzimática, podemos observar um resultado elevado no ponto de noventa e seis (96) horas dentro do tratamento com a cafeína. Este dado é corroborado com as avaliações de expressão gênica, que também tiveram como diferencial este ponto de noventa e seis (96) horas em todos os genes avaliados. Indicando que a ação da cafeína, e conseqüente aumento da concentração de AMPc

intracelular, resulta na ativação da transcrição e provavelmente da tradução dos genes de poligalacturonase avaliados.

Em Kuranda *et al.* (2006), trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae*, utilizou concentrações diferentes de cafeína objetivando-se analisar os efeitos inibitórios na cascata do AMPc, e ficou estabelecido que uma concentração a dois (02) mM de cafeína representa dez (10) % de inibição da fosfodiesterase específica da quebra do AMPc, não resultando em inibição, e vinte (20) mM representando uma concentração inibitória de cinquenta (50) %, denominada IC₅₀. Concentrações superiores a dez (10) mM resultaram em mutações na brotação destas leveduras. Girard *et al.* (2004) traz em seu trabalho o envolvimento do AMPc na produção de uma aspartil protease de *Sclerotinia sclerotiorum*, a asp1. Verificaram que este gene tem sua expressão aumentada quando o fungo foi submetido a um tratamento com cafeína, o que não ocorreu com os genes que codificam para as Poligalacturonases nas mesmas condições de cultura. Nossos resultados apresentaram discordância destes dados, mas vale ressaltar que as concentrações de cafeína utilizadas no sistema foram diferentes, de um (01) mM para cinco (05) mM, podendo ser este o motivo da distinção dos resultados. Rollins *et al.* (1998) apresentam as concentrações de AMPc obtidas da cultura de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de cinco (05) mM de cafeína, sendo duas (02) vezes maior que a concentração do controle negativo no ponto de setenta e duas (72) horas, e nove (09) vezes maior no ponto de noventa e seis (96) horas, demonstrando claramente que nesta concentração o aumento de moléculas de AMPc é bastante significante, facilitando a avaliação da importância da desta molécula no sistema bioquímico do fungo.

Time (h)	cAMP concn (fmol/mg)	
	Treatment	Controls
72	180 ± 30	80 ± 30
96	800 ± 30	90 ± 30
120	790 ± 50	110 ± 10
144	1,000 ± 260	170 ± 40
168	550 ± 130	100 ± 40
192	460 ± 100	340 ± 10
216	440 ± 260	50 ± 0

^a *S. sclerotiorum* 1980 cultures were grown on cellophane discs overlaid on PDA (controls) or PDA containing 5 mM caffeine (treatment) in 24-well tissue culture plates. The data for each time point are the mean ± standard deviation for cAMP concentrations determined by a radioimmunoassay as described in Materials and Methods.

Figura 11- Quantificação por Radioimunoensaio das concentrações de AMPc de *Sclerotinia sclerotiorum* submetida a um meio de cultura com cafeína 5 mM. Fonte: ROLLINS, J.A. and DICKMAN, M.B. Increase in Endogenous and Exogenous Cyclic AMP Levels Inhibits Sclerotial Development in *Sclerotinia sclerotiorum*, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, V. 64, n. 7, p. 2539–2544, July 1998.

6- PRINCIPAIS RESULTADOS

6.1- Resposta de *Sclerotinia sclerotiorum* a diferentes concentrações de cafeína, em meio mínimo (MM) solidificado em placa de Petri:

- Alterações da esclerogênese, com retardo no tempo de formação e comprometimento das fases de iniciação e desenvolvimento dos escleródios.

6.2- Análise dos efeitos da cafeína sobre os fatores de patogenicidade de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio mínimo (MM) líquido, suplementado com pectina:

- Alteração dos valores de pH, acidificação do meio resultado, provavelmente, do aumento na síntese de ácido oxálico.

- Antecipação e aumento da atividade enzimática das poligalacturonases.

- Aumento na expressão dos genes *ssgpg1* e *sspg7*, com alterações na cinética de expressão dos outros genes para poligalacturonases avaliados.

- Aumento na expressão do gene *pacC*.

7- CONCLUSÕES

Todas as avaliações feitas neste trabalho direcionam sobre a importância da molécula do AMPc na complexa bioquímica de *Sclerotinia sclerotiorum*. Complexa pelas possíveis interligações das várias vias existentes que são ativadas ora para reações saprofiticas, ora para reações necrotróficas, além dos efeitos inibitórios de uma sobre a outra. A utilização da cafeína no sistema de cultura *in vitro* trouxe a base para as comparações propostas neste trabalho, por aumentar as concentrações de AMPc produzidas pelo fungo. Com isto, as análises de pH, atividade enzimática, concentração de proteínas totais, expressão gênica, crescimento micelial e esclerogênese entre os diferentes tratamentos demonstraram diferenças reais durante o processo de indução, estabelecendo um papel central do AMPc na modulação dos fatores de patogenicidade.

Podemos concluir que a utilização da cafeína estimulou a expressão dos genes de poligalacturonases avaliados (*sspg*) e do gene que codifica para o fator de transcrição *pacC*, aumentando a acidificação do meio, favorecendo uma maior ativação enzimática das Poligalacturonases secretadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em meio mínimo suplementado com pectina. Da mesma forma, padrões de crescimento e formas de resistência foram alterados pela presença da cafeína, sendo diferenciados de acordo com a concentração utilizada deste inibidor, graças ao aumento das concentrações intracelulares de AMPc neste fungo.

7- PERSPECTIVAS

Este estudo busca contribuir com dados importantes sobre a biologia de *Sclerotinia sclerotiorum*, visando, futuramente, um possível meio de controle para o ataque deste microrganismo aos diversos hospedeiros.

Neste sentido, como perspectiva buscaremos identificar as isoformas das Poligalacturonases que estão agindo no ponto de maior atividade (pontos de vinte e quatro (24) e de quarenta e oito (48) horas, respectivamente) encontrado pela metodologia do DNS, no meio contendo Pectina como substrato, com e sem cafeína. Esta avaliação será obtida pelo preparo de Géis de Atividade para eletroforese bi-dimensional de isoeletrofocalização, das amostras do sobrenadante da cultura de *S. sclerotiorum*. Resultados este importantes para a compreensão do processo de patogenicidade no desenvolvimento do mofo branco.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01- ADACHI, K. AND HAMER, J.E. Divergent cAMP Signaling Pathways Regulate Growth and Pathogenesis in the Rice Blast Fungus *Magnaphorte grisea*. **The Plant Cell.**, 1998, v. 10, p.1361-1373, 1998.
- 02- ARÉCHIGA-CARVAJAL, E. T. and HERRERA, J.R. The *RIM101/pacC* Homologue from the Basidiomycete *Ustilago maydis* Is Functional in Multiple pH-Sensitive Phenomena. **Eukaryotic Cell**, p. 999–1008, June 2005.
- 03- BENEN, J.A.E., KESTER, H.C.M. and VISSER, J. Kinect characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. **Eur. J. Biochem.**, v. 259, p. 577-585, 1999.
- 04- BILLON-GRAND, G., POUSSEREAU, N. and FÈVRE, M. The extracellular proteases secreted *in vitro* in planta by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **J. Phytopathol.**, v.150, p. 507-511, 2002.
- 05- BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v. 16: p. 93-108, 1994.
- 06- BRADFORD, M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72: p. 248-254, 1976.
- 07- BROACH, J. R. RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. **Trends Genet.** v. 7, p. 28–33, 1991.
- 08- CARACUEL, Z., RONCERO, M.I.G, ESPESO,E.A, GONZÁLEZ-VERDEJO, C.I., GARCÍA-MACEIRA, F.I. and DI PIETRO, A. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*, **Molecular Microbiology** , 48 (3), p. 765–779, 2003.

- 09- CESSNA, S.G., SEARS, V.E., DICKMAN, M.B., and LOW, P.S. Oxalic Acid, a Pathogenicity Factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the Oxidative Burst of the Host Plant, **The Plant Cell**, v. 12, p. 2191–2199, November 2000.
- 10- CHEN, C., HAREL, A., GOROVOITS, R., YARDEN, O. and DICKMAN, M.B. MAPK Regulation of Sclerotial Development in *Sclerotinia sclerotiorum* Is Linked with pH and cAMP Sensing, **MPMI**, v. 17, n. 4, p. 404–413, 2004.
- 11- CHEN, C. and DICKMAN, M.B. cAMP blocks MAPK activation and sclerotial development via Rap-1 in a PKA-independent manner in *Sclerotinia sclerotiorum*, **Molecular Microbiology**, v. 55 (1), p. 299–311, 2005.
- 12- CHOI, W., DEAN, R.A. The adenylate cyclase gene *mac1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development, **Plant Cell**, v. 9, p. 1973–198, 1997.
- 13- COTTON, P., RASCLE, C., FÈVRE, M. Characterization of PG2, an early endoPG produced by *Sclerotinia sclerotiorum*, expressed in yeast. **FEMS Microbiol Lett**, v. 213, p. 239–244, 2002.
- 14- COTTON, P., KASZA, Z., BRUEL, C., RASCLE, C. and FÈVRE, M. Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, p. 163-169, 2003.
- 15- DIEZ, E., ALVARO, J., ESPESO, E.A., RAINBOW, L., SUAREZ, T., TILBURN, J. Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. **EMBO J**, v. 21, p. 1350–1359, 2002. .
- 16- DI PIETRO, A. and RONCERO, M. I. G. Cloning, expression and role in pathogenicity of *pgl* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 11, p. 91–98, 1998.

- 17- DOHLMAN, H.G.; THORNER, J.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 61, p. 653-688, 1991.
- 18- D'SOUZA, C.A., ALSPAUGH, J.A., YUE, C., HARASHIMA, T., COX, G.M., PERFECT, J.R. and HEITMAN, J. Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase Controls Virulence of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*, **Molecular and Cellular Biology**, p. 3179–3191, may 2001.
- 19- DURMAN, S.B., MENENDEZ, A.B., GODEAS, A.M., Variation in oxalic acid production and mycelial compatibility within field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*, **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 2180–2184, 2005.
- 20- DÜRRENBERGER, F.; WONG, K.; KRONSTAD, J.W. Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 5684-5689, 1998.
- 21- EL BARKANI, A., KURZAI, O., FONZI, W.A., RAMON, A., PORTA, A., FROSCH, M., and MÜHLSCHLEGEL, F.A. Dominant active alleles of RIM101 (PRR2) bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, p. 4635–4647, 2000.
- 22- FAVARON, F., SELLA, L. and D'OVIDIO, R. Relationships Among Endo-Polygalacturonase, Oxalate, pH, and Plant Polygalacturonase-Inhibiting Protein (PGIP) in the Interaction Between *Sclerotinia sclerotiorum* and Soybean. **MPMI**, v. 17, n. 12, p. 1402–1409, 2004.
- 23- FÉ I. GARCÍA-MACEIRA, A., DI PIETRO, M. DOLORES HUERTAS-GONZÁLEZ, M. CARMEN RUIZ-ROLDÁN, and M. ISABEL G. RONCERO. Molecular Characterization of an Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* Expressed during Early Stages of Infection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2191-2196, may 2001.

- 24- FRAISSINET-TACHET, L., REYMOND-COTTON, R., FEVRE, M. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Curr. Genet.**, v. 29, p. 96–100, 1995.
- 25- FRAISSINET-TACHET, L.; FEVRE, M. (1996) Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Current Microbiology**. V. 33, p. 49-53, 1996.
- 26- GIRARD, V., FÈVRE, M., BRUEL, C. Involvement of cyclic AMP in the production of the acid protease Acp1 by *Sclerotinia sclerotiorum*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, p. 227–233, 2004.
- 27- GODOY, G.; STEADMAN, J.R.; DICKMAN, M.B.; DAM, R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiol. Mol. Plant Pathol**, v. 37, p. 179-191, 1990.
- 28- GOLD, S., DUNCAN, G., BARRETT, K. AND KRONSTAD, J. cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*, **Genes & Dev**, v. 8, p. 2805-2816, 1994.
- 29- GONZÁLEZ-CARRANZA, Z.H., ELLIOTT, K.A. and ROBERTS, J.A. Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-12, october 10 - 2007.
- 30- GORBUNOVA, Y.V. and SPITZER, N.C. **Nature (London)**, v. 418, p. 93–96, 2002.
- 31- GUIMARÃES, R.L. and STOTZ, H.U. Oxalate Production by *Sclerotinia sclerotiorum* Deregulates Guard Cells during Infection. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3703–3711, november 2004.
- 32- HANCOCK, J. G. 1966. Degradation of pectic substances associated with pathogenesis by *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower and tomato stems. **PHYTOPATHOLOGY**, V. 56, P. 975-979, 1966.

- 33- HARCUS, D., NANTEL, A., MARCIL, A., RIGBY, T., WHITEWAY, M. Transcription pro.ling of cyclic AMP signaling in *Candida albicans*. **Mol Biol Cell**, v. 15, p. 4490–4499, 2004.
- 34- HEGEDUS, D.D. and RIMMER, S.R., *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen?, **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, p. 177–184, 2005.
- 35- HU, G., STEENA, B.R., LIANB, T., SHAM, A.P., TAM, N., TANGEN, K.L. and KRONSTAD, J.W. Transcriptional Regulation by Protein Kinase A in *Cryptococcus neoformans*, **Plos Pathogens**, v. 3, p. 1-18, issue 3, e42, March 2007.
- 36- JONES, D.L., PETTY, J., HOYLE, D.C., HAYES, A., RAGNI, E. Transcriptome proling of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with a constitutively activated Ras/cAMP pathway. **Physiol Genomics**, v. 16, p. 107–118, 2003.
- 37- JURICK II, W.M. and ROLLINS, J.A. Deletion of the adenylate cyclase (*sac1*) gene a Vects multiple developmental pathways and pathogenicity in *Sclerotinia sclerotiorum*, **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 521–530, 2007.
- 38- KANA-UCHI, A., YAMASHIRO, C.T., TANABE, S. and MURAYAMA, T. A ras homologue of *Neurospora crassa* regulates morphology. **Mol. Gen. Genet**, v. 254, p. 427–432, 1997.
- 39- KARS, I., KROOSHOF, G.H., WAGEMAKERS, L., JOOSTEN, R., BENEN, J.A.B. and KAN, J.A.L.V. Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. **The Plant Journal**, v. 43, p. 213–225, 2005.
- 40- KASZA, Z., VAGVOLGYI, C., FÈVRE, M., COTTON, P. Molecular Characterization and in planta detection of *Sclerotinia sclerotiorum* Endopolygalacturonase Genes. **Current Microbiology**, v. 48, p. 208–213, 2004.
- 41- KLEUSS, C.; RAW, A.S.; LEE, E.; SPRANG, S.R.; GILMAN, A.G. Mechanism of GTP hydrolysis by G-protein a subunits. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 9828-9831, 1994.

- 42- KURANDA, K., LEBERRE, V., SOKOL, S., PALAMARCZYK, G. and FRANÇOIS, J. Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways, **Molecular Microbiology**, v. 61 (5), p. 1147–1166, 2006.
- 43- LAMBERT, M., BLANCHIN-ROLAND, S., LE LOUEDEC, F., LEPINGLE, A., and GAILLARDIN, C. (1997) Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101/pacC homolog. **Mol Cell Biol**, v. 17, p. 3966–3976, 1997.
- 44- LEBERER, E., HARCUS, D., DIGNARD, D., JOHNSON, L., USHINSKY, S., THOMAS, D.Y., and SCHROPPEL, K.. Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Mol. Microbiol**, v. 42, p. 673–687, 2001.
- 45- LEE, N. and KRONSTAD, J.W., *ras2* Controls Morphogenesis, Pheromone Response, and Pathogenicity in the Fungal Pathogen *Ustilago maydis*, **Eukaryotic Cell**, p. 954–966, December 2002.
- 46- LI, R., RIMMER, R., BUCHWALDT, L., SHARPE, A.G., SÉGUIN-SWARTZ, G. AND HEGEDUS, D.D. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo- and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 754–765, 2004.
- 47- LUGTENBERG, B.J.J., CHIN-A-WOENG, T.F.C., BLOEMBERG, G.V. (2002) Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 81, p. 373-383, 2002.
- 48- MARTEL, M.B., LEËTOUBLON, R., FEÈVRE, M. Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 158, p. 133-138, 1998.

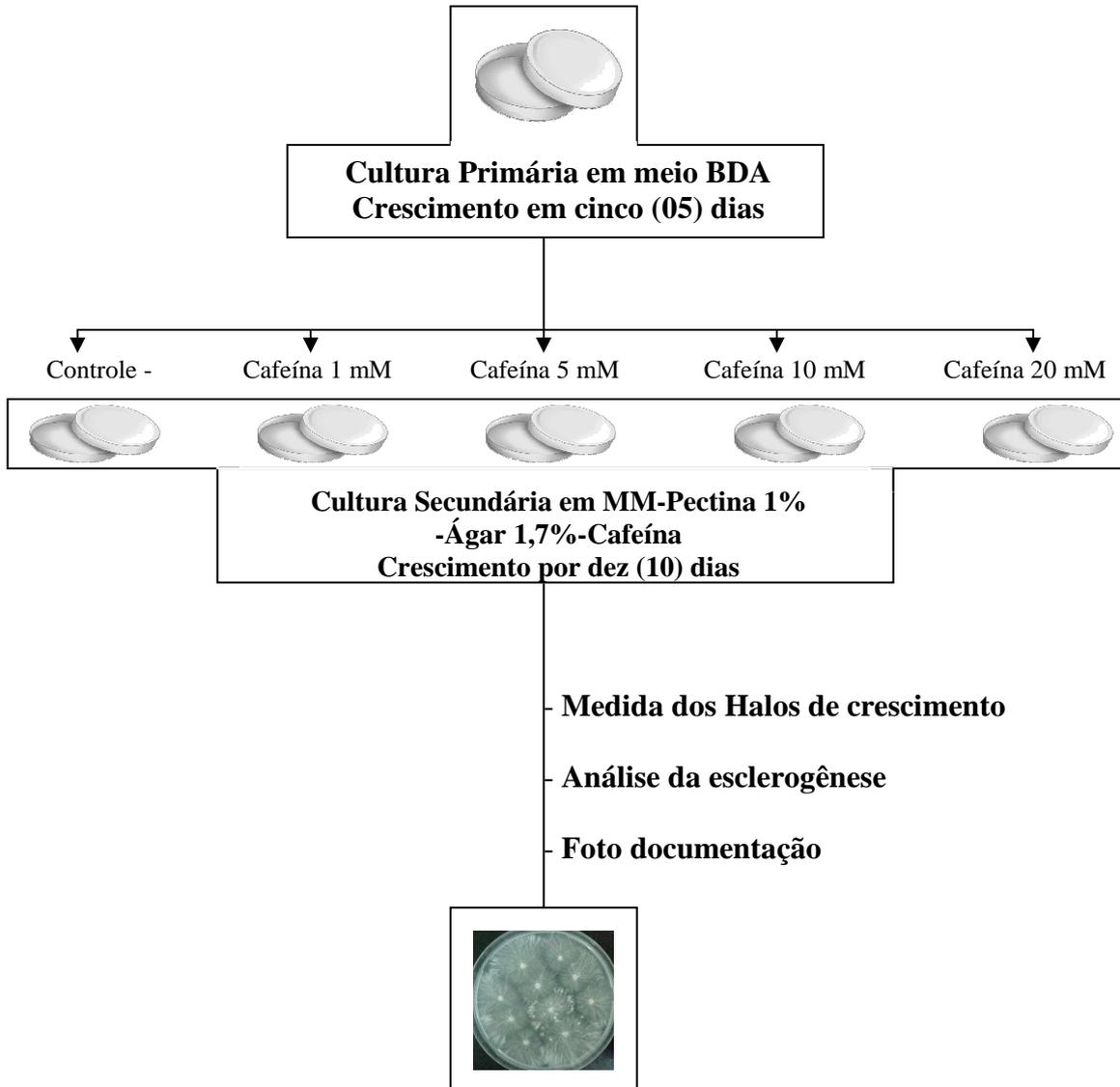
- 49- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 131, p. 426-428, 1956.
- 50- MUKHERJEE, M., MUKHERJEE, P.K. and KALE, S.P. cAMP signalling is involved in growth, germination, mycoparasitism and secondary metabolism in *Trichoderma virens*, **Microbiology**, v. 153, p. 1734–1742, 2007.
- 51- PARENICOVA, L., BENEN, J.A.E., KESTER, H.C.M., VISSER, J. *pgaA* and *pgaB* encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. **Biochem J.**, v. 345, p. 637–644, 2000.
- 52- PEÑALVA, M.A. and ARST, H.N. Jr. Regulation of Gene Expression by Ambient pH in Filamentous Fungi and Yeasts. **Molecular and Cellular Biology Reviews**, p. 426–446, September 2002.
- 53- PHILLIPS, A.J., CROWE, J.D. and RAMSDALE, M. Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*, **PNAS** , v. 103 (3), p. 726-731, January 17 2006.
- 54- RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira** , v. 28, p. 123-130, 2003.
- 55- ROLLINS, J.A. and DICKMAN, M.B., Increase in Endogenous and Exogenous Cyclic AMP Levels Inhibits Sclerotial Development in *Sclerotinia sclerotiorum*, **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2539–2544, july 1998.
- 56- ROLLINS, J.A. and DICKMAN, M.B. pH Signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a *pacC/RIM1* Homolog. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 01, p. 75-81, January 2001.
- 57- ROLLINS, J.A. The *Sclerotinia sclerotiorum pac1* Gene Is Required for Sclerotial Development and Virulence. **MPMI**, v. 16, n. 9, p. 785–795. 2003.

- 58- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed.** New York: **Cold Spring Harbor Laboratory**, v. 1, 2001.
- 59- VAUTARD-MEY, G., FÈVRE, M., Carbon and pH Modulate the Expression of the Fungal Glucose Repressor Encoding Genes, **Current Microbiology**, v. 46, p. 146–150, 2003.
- 60- VRIES, R.P. and VISSER, J. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology reviews**, p. 497–522, December 2001.
- 61- WILLETS, H.J.; WONG, J.A.L. The Biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **The Botanical Review**, v. 46, p. 101-165, 1980.
- 62- WILLOUGHBY, D. and COOPER, D.M.F. Ca²⁺ stimulation of adenylyl cyclase generates dynamic oscillations in cyclic AMP, **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 828-836, 2005.
- 63- WILSON, D., TUTULAN-CUNITA, A. , JUNG, W.H., HAUSER, N.C., HERNANDEZ, R., WILLIAMSON, T., PIEKARSKA, K., RUPP, S., YOUNG, T. and STATEVA, L. Deletion of the high-affinity cAMP phosphodiesterase encoded by *PDE2* affects stress responses and virulence in *Candida albicans*, **Molecular Microbiology**, v. 65 (4), p. 841–856, 2007.
- 64- XU, J.R. AND HAMER, J.E. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation, and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, **Genes & Development**, v. 10, p. 2696-2706, 1996.
- 65- ZUPPINI, A., NAVAZIO, L., SELLA, L., CASTIGLIONI, C., FAVARON, F., and MARIANI, P. An Endopolygalacturonase from *Sclerotinia sclerotiorum* Induces Calcium-Mediated Signaling and Programmed Cell Death in Soybean Cells, **MPMI**, v. 18, n. 8, 2005, p. 849–855, 2005.

ANEXO 1:

Esquematização dos Experimentos:

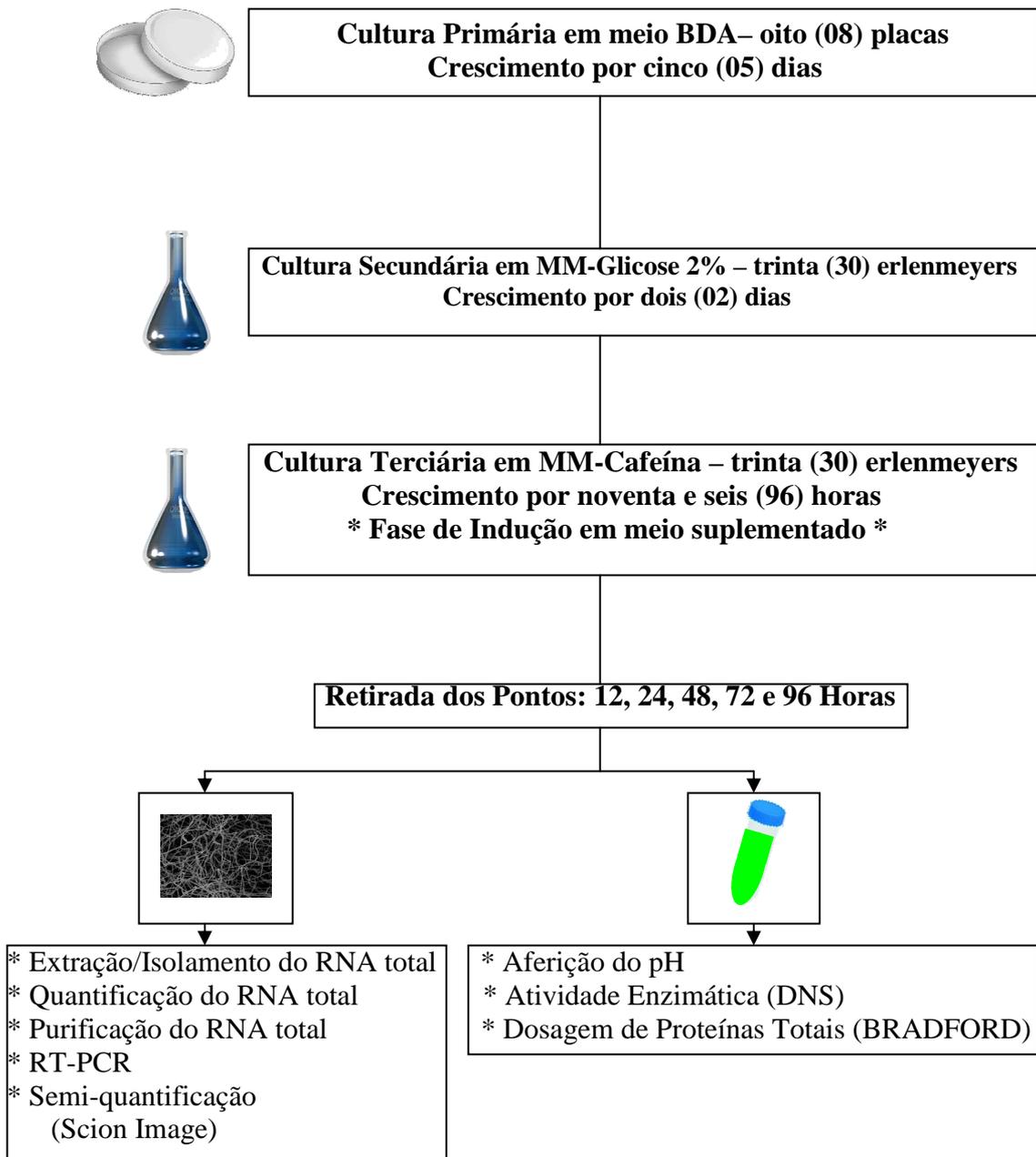
Resposta de *Sclerotinia sclerotiorum* a diferentes concentrações de cafeína



ANEXO 2:

Esquematização dos Experimentos:

Análise comparativa dos efeitos da cafeína na produção dos fatores de patogenicidade de *Sclerotinia sclerotiorum*



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)