



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA**

**Caracterização de proteases secretadas por**  
*Sclerotinia sclerotiorum*

**Orientanda: Elda Bueno Alves**

**Orientadora: Dra. Silvana Petrofeza da Silva**

**Goiânia – Goiás**

**Maio – 2009**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS  
DE TESES E  
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**     **Dissertação**     **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

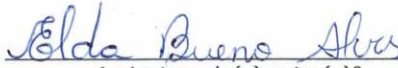
Nome completo do autor: Elda Bueno Alves

Título do trabalho: "Caracterização de proteases secretadas por *Sclerotinia sclerotiorum*"

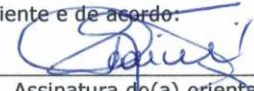
**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  **SIM**     **NÃO**<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 12 / 02 / 2019

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

# **Caracterização de proteases secretadas por** *Sclerotinia sclerotiorum*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Biologia molecular.

**Elda Bueno Alves**

**Goiânia – Goiás**

**Maior – 2009**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

ALVES, Elda Bueno

Caracterização de proteases secretadas por *Sclerotinia sclerotiorum* [manuscrito] / Elda Bueno ALVES. - 2009.  
f.: il.

Orientador: Prof. Silvana Petrofeza da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Cidade de Goiás, 2009.

Bibliografia.

1. Proteinase. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. *Sclerotinia sclerotiorum*. 4. mofo branco. 5. expressão. I. Silva, Silvana Petrofeza da, orient. II. Título.

CDU 577.15




UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
Nº 332

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO – Aos vinte e cinco dias do mês de maio do ano de 2009 (25/05/2009), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profª. Dra. Silvana Petrofeza da Silva - Orientadora; Profª. Dra. Rosângela Vieira de Andrade; Profª. Dra. Fabrícia Paula de Faria para sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no Mini-Auditório do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, procederm à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES SECRETADAS POR *Sclerotinia sclerotiorum*”** em nível de mestrado, de autoria de ELDA BUENO ALVES, discente do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora, Profª. Dra. Silvana Petrofeza da Silva que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida à autora da dissertação que, em 40 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 572/2002 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia e procedidas às correções recomendadas, a Dissertação foi APROVADA por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido o requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA, na área de concentração em Biologia Celular e Molecular pela

Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretária do PPGB da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. A banca examinadora recomenda a publicação de artigo(s) científico (s) oriundo(s) dessa dissertação em periódicos de circulação nacional e, ou, internacional, depois de procedidas as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17:00 horas a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado e para constar eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, secretária do PPGB lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.

  
Prof.ª. Dra. Silvana Petrofeza da Silva  
Presidente da Banca  
Universidade Federal de Goiás

  
Prof.ª. Dra. Rosângela Vieira de Andrade  
Universidade Católica de Brasília

  
Prof.ª. Dra. Fabrícia Paula de Faria  
Universidade Federal de Goiás

*Aos meus pais Osmar Alves e Elza Bueno Alves,  
e meus irmãos Jose Geraldo, Ilma, Paulo Sergio,  
Davi, Gideão e Cláudia pelo amor, carinho e  
incentivo, dedico.*

*Ao meu esposo Girley Soares da Silva, pela  
compreensão, incentivo, ofereço.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força, otimismo, serenidade e determinação para perseverar diante das dificuldades para cumprir esta jornada.

A Dra. Silvana Petrofeza, pela orientação, confiança, presteza, paciência e apoio na realização deste trabalho.

Aos meus colegas do laboratório Biologia molecular de fungos filamentosos, Amarildo, Lucas, Marília, Deyze, Ana Paula e Elvira que colaboraram nos trabalhos de bancada.

Ao Dr. Cirano Ilhoa pela boa vontade em ceder o espaço do laboratório de enzimologia para realização de alguns experimentos.

A capes pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os professores do programa, pela contribuição em minha formação acadêmica.

A todos os funcionários da Universidade Federal de Goiás, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste mestrado.

As minhas queridas amigas, Beronicia, Nilva, Elaine, Kátia, Ana Lúcia e Inês, pela ajuda, disponibilidade em todos os momentos que precisei e pela grande amizade.

Ao meu querido amigo Douglas, pelo incentivo, apoio, amizade e companheirismo.

A toda minha família (pais, esposo, irmãos, irmãs, sobrinhos, sogro e sogra, cunhados e cunhadas, tios e primos) pelo carinho e apoio constante.

## SUMÁRIO

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. Revisão bibliográfica.....	13
1.1. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	13
1.2. Enzimas Hidrolíticas.....	18
1.3. Enzimas proteolíticas.....	19
2. Objetivos.....	23
2.1. Objetivos específicos/metás.....	23
3. Materiais e Métodos.....	24
3.1. Estabelecimento do processo de infecção.....	24
3.2. Crescimento do fungo <i>S. sclerotiorum</i> em meio de cultura com diferentes fontes de carbono.....	24
3.2.1. Cultura primária <i>in vitro</i> .....	24
3.2.2. Cultura secundária <i>in vitro</i> .....	25
3.2.3. Cultura terciária <i>in vitro</i> etapa de indução.....	25
3.2.4. Análise do meio de cultura.....	26
Determinações de proteínas totais.....	26
Ensaio para determinação da atividade proteolítica.....	27
3.2.5. Análise da expressão dos genes de proteases.....	27
Extração e isolamento do RNA total.....	27
Quantificação do RNA total por espectrofotometria UV.....	29
Qualidade do RNA total.....	29
Quantificação e qualidade do material em gel de agarose 1%.....	29
Purificação do RNA total.....	30
PCR em tempo real.....	30
4. Resultados e Discussões.....	32
4.1. Caracterização da atividade proteolítica secretadas por <i>S. sclerotiorum</i> .....	32
4.1.1. O efeito das diferentes fontes de carbono na atividade proteolítica.....	32
4.1.2. Efeito do Ph e diferentes inibidores na atividade protolítica.....	33
4.1.3. Atividade proteolítica durante a infecção em plantas de feijoeira.....	35
4.2. Expressão das proteases.....	35
4.2.1. Efeitos do Ph em diferentes fontes de carbono na expressão dos genes	

<i>aspS</i> e <i>acp1</i> .....	35
4.2.2. Expressão dos genes <i>aspS</i> e <i>acp1</i> durante a infecção de plantas de feijoeiro.....	37
5. Conclusões.....	39
5. Perspectivas.....	40
6. Referências bibliográficas.....	41

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Os sintomas causados por *Sclerotinia sclerotiorum* e estruturas típicas.  
**Pag.11**

**Figura 2:** Esquema do ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pag. 13**

**Figure 3:** Cinética da atividade proteolítica durante a interação do fungo *S. sclerotiorum* com diferentes fontes de carbono (pectina, CWPv e glicose).  
**Pag. 29**

**Figure 4:** Efeito do pH e dos inibidores sobre a atividade da proteinase no meio de cultura do fungo *S. sclerotiorum* após inoculação com pectina e parede celular de *P. vulgaris*. **Pag. 30**

**Figure 5:** Análise por real time dos padrões de transcrição de genes ativos *aspS* e *acp1* durante o cultivo do fungo *S. sclerotiorum* em meio de cultura com pectina e parede celular de *P. vulgaris* **Pag. 32**

**Figure 6:** Atividade proteolítica durante a infecção do fungo *S. sclerotiorum* em caules de *P. vulgaris*. **Pag. 34**

## RESUMO

Alves, Elda Bueno, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – Goiás, Maio de 2009.

### **Caracterização de proteases secretadas por *Sclerotinia sclerotiorum***

*Sclerotinia sclerotiorum* é um fitopatogeno que infecta muitas plantas economicamente importantes. A produção de ácido oxálico, diminuição do pH do meio e a secreção de enzimas hidrolíticas, como as proteases, são fatores determinantes para a infecção deste patógeno. Proteases secretadas pelo fungo *S. sclerotiorum* degradam proteínas da parede celular do hospedeiro e proteínas antifúngicas secretadas pela planta durante o processo de invasão. Este trabalho teve como objetivo caracterizar molecular e bioquimicamente proteases em *S. sclerotiorum*, durante o processo de invasão em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e em meio de cultura suplementados com pectina, extrato de parede de feijoeiro e glicose, como fontes de carbono. A secreção destas proteases foi detectada por meio de ensaios enzimáticos com inibidores específicos e meios tamponados em diferente pH. O nível de expressão dos genes que codificam para a aspartil protease (*aspS*) e a protease acida (*acp1*), respectivamente, foram detectados através da técnica qRT-PCR. Atividade enzimática foi verificada em todas as fontes de carbono, mas níveis mais altos foram encontrados quando foi utilizado pectina como única fonte de carbono. Ensaios proteolíticos com diferentes inibidores mostraram que Pepstatin A inibidor específico para aspartil proteases, foi o inibidor que teve maior ação nos meios de cultura analisados, indicando a secreção de prováveis aspartyl proteases. Experimentos de qRT-PCR mostrou que a expressão dos genes *aspS* e *acp1* foi aumentados em *S. sclerotiorum* tanto em meio de cultura suplementados com pectina ou extrato de parede celular de feijoeiro, quanto durante a infecção em plântulas de feijoeiro. Estes resultados sugerem que o fungo secreta proteases durante a infecção da planta hospedeira. E as diferentes fontes de carbono avaliadas, similares a componentes da parede celular de plantas hospedeiras, são efetivas para a indução da expressão gênica (*aspS* e *acp1*) em *S. sclerotiorum*. Desta forma, as proteases têm sido consideradas um importante fator de virulência aumentando a eficiência do fungo no ataque a plantas.

**Palavras chaves:** proteinase; *Phaseolus vulgaris*, *Sclerotinia sclerotiorum*; mofo branco; fontes de carbono; expressão

## ABSTRACT

Alves, Elda Bueno, Universidade Federal de Goias, Goiania – Goias, May 2009.

### **Characterization of proteases secreted by *Sclerotinia sclerotiorum***

*Sclerotinia sclerotiorum* is a fungus that infects many economically important plants. The production of oxalic acid, decreased the pH of the medium and the secretion of hydrolytic enzymes such as proteases, are determining factors for the infection of this pathogen. Proteases secreted by the fungus *S. sclerotiorum* degrade the cell wall proteins of the host and antifungal proteins secreted by the plant during the invasion. This study aimed to characterize molecular and biochemical proteases in *S. sclerotiorum*, during the invasion in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and in culture medium supplemented with pectin, the wall of bean extract and glucose as carbon sources. The secretion of these proteases was detected by enzymatic assays with specific inhibitors and buffered media at different pH. The level of expression of genes encoding for the protease aspartyl (*aspS*) and acid protease (*acpI*), respectively, were detected by qRT-PCR technique. Enzyme activity was detected in all sources of carbon, but higher levels were found when pectin was used as the sole carbon source. Tests with different proteolytic inhibitors showed that Pepstatin A specific inhibitor for aspartyl protease-inhibitor that has been the greatest action in culture media, indicating the probable secretion of aspartyl proteases. Of qRT-PCR experiments showed that the expression of genes *aspS* and *acpI* was increased in *S. sclerotiorum* both in culture medium supplemented with pectin or extract of the cell wall of bean, as during the infection in bean seedlings. These results suggest that the fungus secret proteases during the infection of the host plant. And the different carbon sources evaluated, similar to components of the cell wall of host plants, are effective for the induction of gene expression (*acpI* and *aspS*) in *S. sclerotiorum*. Thus, the proteases have been considered an important virulence factor in increasing the efficiency of fungal attack in plants.

**Key words:** proteinase, *Phaseolus vulgaris*, *Sclerotinia sclerotiorum*, white mold, carbon sources, the gene expression

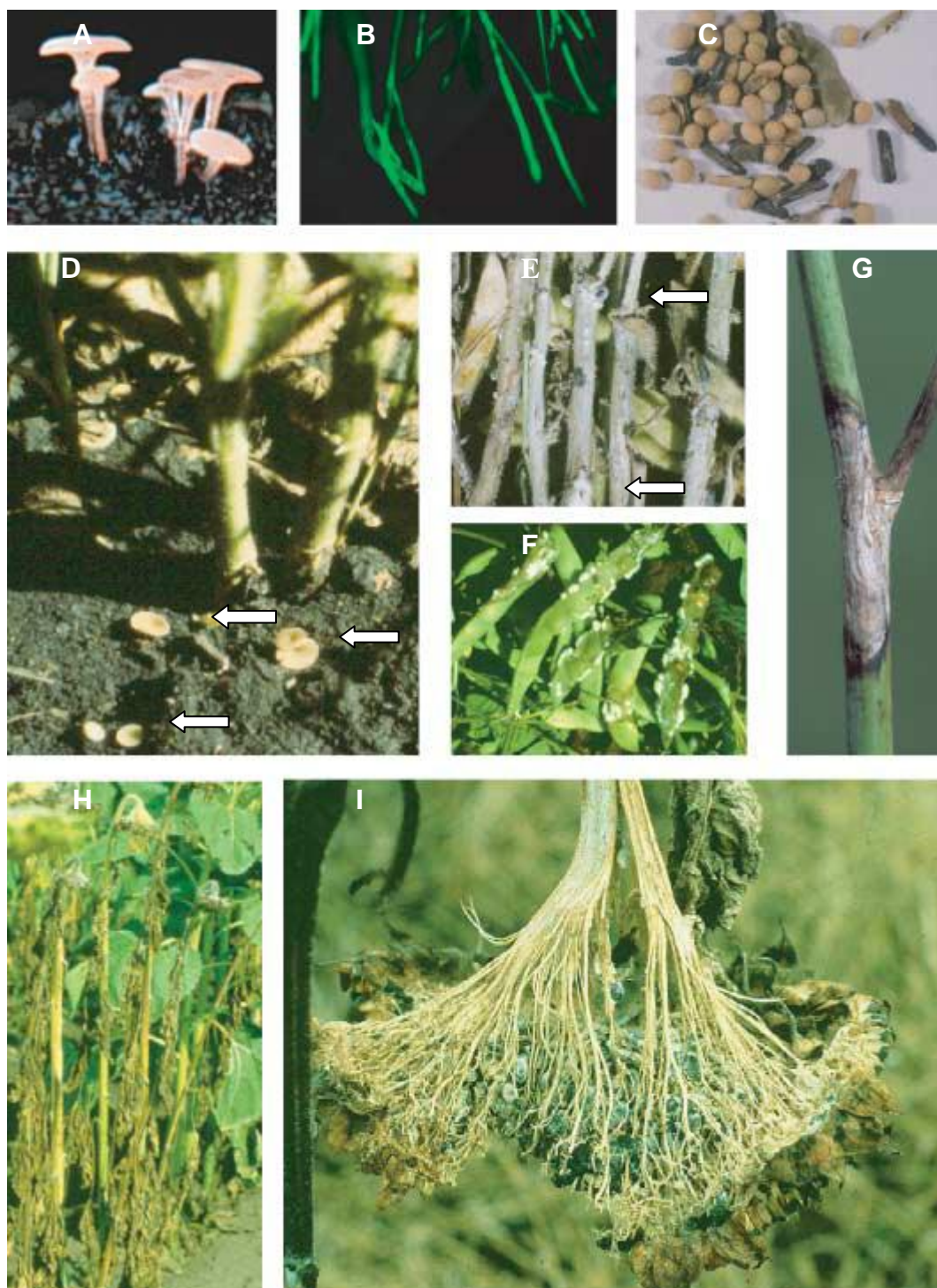
## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* pertence à família **Sclerotiniaceae**, da ordem **Leotiales**, filo **Ascomycota**, causa a enfermidade conhecida como mofo branco ou murcha de sclerotinia, e tem preocupado produtores de várias culturas, como o feijoeiro, o algodoeiro, a soja e o girassol, entre outras. Este fungo possui baixa especificidade ao hospedeiro, atacando mais de 400 espécies, em geral dicotiledôneas (Boland & Hall, 1994).

No Brasil, perdas na produção de diversas culturas causadas por *S. sclerotiorum* vêm chamando a atenção de produtores e pesquisadores, como em lavouras de feijão e soja, irrigadas por pivô central em diversas regiões do país (Lobo Júnior & de Abreu, 2000; Bueno et al., 2006). Dentre as culturas comerciais afetadas, a do feijoeiro é a que mais sofre perdas na produção, sendo o número de sementes por planta e seu peso os componentes de rendimento mais afetados trazendo enorme prejuízo ao país por sua importância sócio-econômica (Hall & Nasser, 1996; Napoleão et al., 2005). As condições de clima favoráveis para seu desenvolvimento são alta umidade e temperaturas amenas. Nessa situação, uma lavoura de feijão pode sofrer em média perdas de 30% ou mais, podendo chegar a 100 % em períodos chuvosos e quando medidas preventivas não são tomadas.

Os sintomas iniciais são lesões encharcadas nas folhas ou outras partes aéreas da planta que normalmente entram em contato com as flores infectadas. As lesões espalham-se rapidamente para as hastes, ramos e vagens (Fig. 1D,E). Nos tecidos infectados, aparece uma eflorescência que lembra algodão, constituindo os sinais característicos da doença (Fig. 1G). Até o feijoeiro florescer, dificilmente a doença torna-se importante; depois que a florada cai, a doença é disseminada rapidamente porque a flor é fonte primária de energia, servindo de alimento para o fungo iniciar a infecção (Oliveira, 2005).



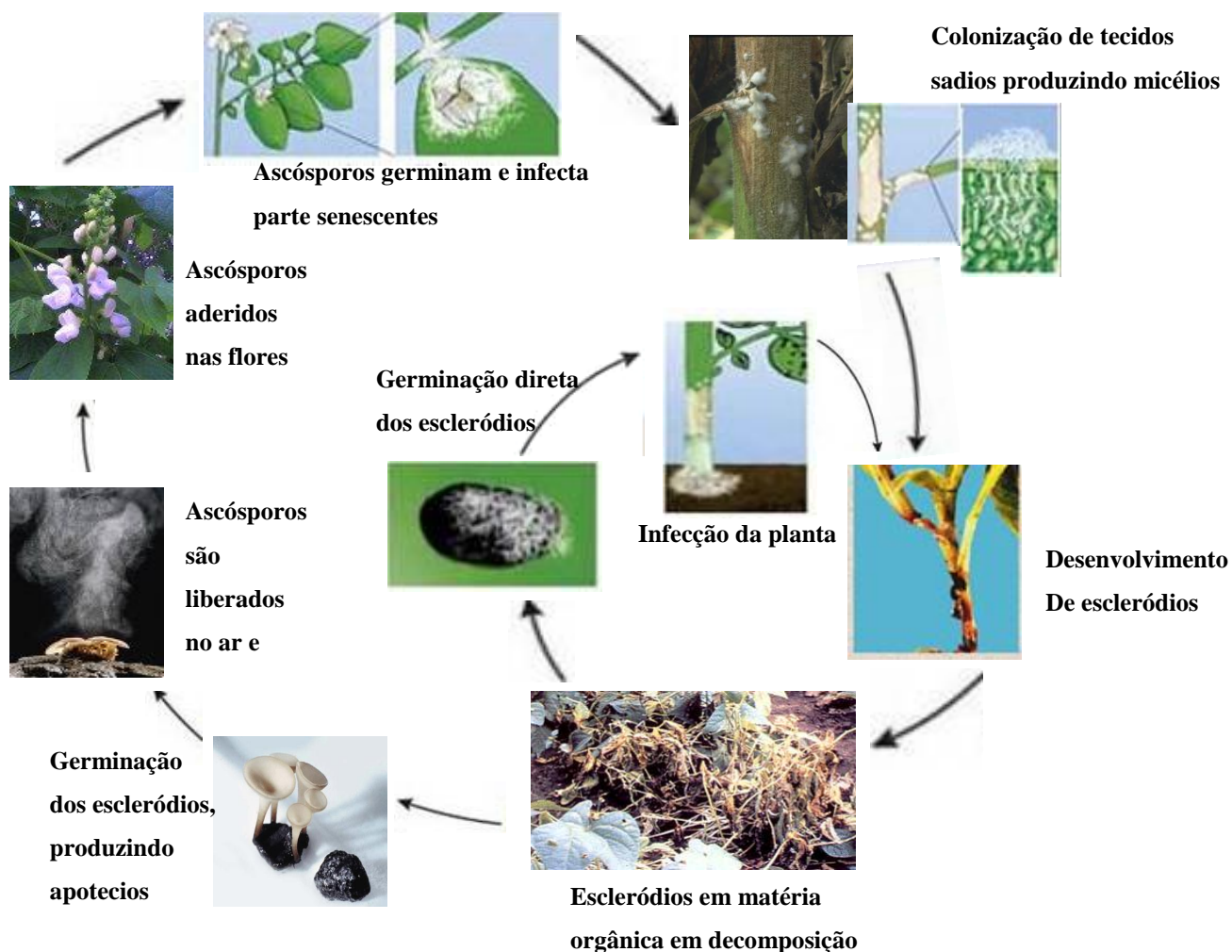
**Fig. 1- Os sintomas causados por *Sclerotinia sclerotiorum* e estruturas típicas em diferentes culturas.** (A) Germinação carpogênica de esclerócios resultando em apotécios que pode produzir ascósporos. (B) In vitro GFP-tagged *S. sclerotiorum* sob microscopia de fluorescência (De Silva et al., 2005). (C) Amostra de esclerócios de uma colheita de soja. (D) Apotécios (seta). (E) Mofo branco em caules feijoeiro com esclerócios (seta). (F) Sintomas típicos da podridão branca em feijão. (G) Caule de algodão infectado com *S. sclerotiorum* mostrando o tecido branqueado e necrosado. (H) O murchimento é um sintoma típico da

infecção por *S. sclerotiorum* em girassol (I) **Amostra de tecidos vasculares de girassol com** uma grande quantidade de escleródios (Fonte: Bolton *et al.*, 2006).

Na ausência de hospedeiro suscetível, como as culturas citadas, o fungo pode persistir por um longo período no solo, por meio de suas estruturas de resistência, de coloração escura, conhecidas por escleródios (Fig. 1H). Estes desempenham um papel importante no ciclo da doença, porque são as principais estruturas de sobrevivência (Willettts & Wong, 1980). Um escleródio é um agregado 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 ativação dos escleródios dormentes conhecidas como germinação carpogênica e germinação miceliogênica (Fig. 2) (Hegedus & Rimmer, 2005). Na germinação miceliogênica o patógeno produz hifas que podem atacar diretamente tecidos vegetais (Bardin & Huang, 2001; Le Tourneau, 1979). Os escleródios que germinam carpogenicamente produzem apotécios e posteriormente ascósporos que infectam partes superiores das plantas hospedeiras. Hifas resultantes de qualquer tipo de germinação são hialinas, septadas, ramificadas e multinucleadas com o aparecimento de micélio branco na planta.

Na germinação carpogênica a formação de apotécio é estimulada por períodos de solo úmido onde este cresce e libera os ascósporos no ar. Os apotécios são formados na superfície do solo e o processo de infecção em campo pode iniciar-se através da dispersão aérea de ascósporos (Hegedus & Rimmer, 2005). Estes se instalam em partes vegetais senescentes como pétalas, folhas, frutos ou caule, geralmente o ataque diretamente a tecidos saudáveis não ocorre (Lumsden, 1976).

Na germinação miceliogênica de escleródios, resulta a formação de micélios que pode atacar diretamente o tecido vegetal (Le Tourneau, 1979) e ocorrem em algumas culturas, como girassol e alguns legumes. Os escleródios que estão na superfície do solo podem colonizar a matéria orgânica morta com infecção subsequente de plantas vivas adjacentes. Em algumas safras, por exemplo, de girassol, a germinação miceliogênica dos escleródios pode iniciar o processo da infecção na raiz e posteriormente o apodrecimento do caule (Huang & Dueck, 1980).



**Figura 2 - Esquema do ciclo de vida de *Sclerotinia sclerotiorum*.** Demonstração das vias carpogênicas e miceliogênicas de propagação. (Fonte: [www.potatodiseases.org](http://www.potatodiseases.org))

O micélio pode penetrar na cutícula da planta hospedeira através da força mecânica através dos apressórios (Lumsden, 1976). Os apressórios são estruturas multicelulares formadas pela ramificação de uma única hifa que penetram através da cutícula da planta (Hegedus & Rimmer, 2005). Após a penetração ocorre a formação de uma vesícula na ponta do apressório formada por várias enzimas de degradação. Os apressórios fornecem uma forte ligação entre o fungo e a superfície do hospedeiro exercendo força mecânica que auxilia na penetração do fungo na planta.

Em *S. sclerotiorum*, um fator essencial para a infecção é a produção do ácido oxálico (Hegedus & Rimmer, 2005; Bolton *et al.*, 2006; Lugtemberg *et al.* 2002; Cessna *et al.* 2000; Guimarães *et al.* 2004; Durman *et al.* 2005). A síntese do ácido oxálico é catalisada pela enzima oxalacetato acetil-hidrolase, e a sua atividade enzimática aumentam 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 & Dickman, 2001). O pH neutro ou ligeiramente alcalino do tecido do hospedeiro estimula a síntese de ácido oxálico, 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 & Dickman, 1998).

O maior efeito do ácido oxálico é a regulação transcricional de genes necessários para o desenvolvimento da patogenicidade e do ciclo de vida de *S. sclerotiorum*, por exemplo, fator de transcrição conhecido como *PacC*. Rollins & Dickman (2001) baseado na seqüência homóloga de *Aspergillus nidulans*, identificaram em *S. sclerotiorum* uma sequência *pacC* homóloga, denominada de *pac1*. Em 2003, Rollins *et al* demonstraram que a perda da função da PAC1 em mutantes de *S. sclerotiorum* acarretava a má formação de escleródios, diminuição da produção de ácido oxálico e consequentemente o decréscimo da virulência. E posteriormente Kim *et al.*, (2007) verificaram que em *S. sclerotiorum*, o gene *pac1* é regulado pelo pH do ambiente.

Mecanismos de ativação gênica, disparados pelo pH do meio, foram descritos 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.

A secreção de oxalato pode aumentar a virulência de *S. sclerotiorum* por três modos de ação (revisado em Bolton *et al.*, 2006). Primeira: várias enzimas secretadas por estes fungos durante a invasão de tecidos vegetais como, por exemplo, poligalacturonase e proteases ácidas, têm máxima atividade em baixo pH, e também inibe a ação de eventuais enzimas inibidoras de poligalacturonases liberadas pela planta na tentativa de combater o ataque do fungo (Favaron *et al.*, 2004). Segundo: o ácido oxálico secretado além de ser diretamente tóxico à planta, funciona como quelante de íons cálcio desestabilizando o sistema bioquímico funcional do hospedeiro e sequestrando cálcio da parede celular (Guimarães e Stotz 2004). E terceiro: suprime o estresse oxidativo gerado pela planta, pela neutralização das espécies reativas de oxigênio (Rollins, *et al.* 2001).

Godoy *et al* (1990) demonstraram que indivíduos mutantes que não produzem ácido oxálico perderam sua patogenicidade. Similar resultado foi obtido usando *Arabidopsis thaliana* como hospedeiro (Dickman & Mitra, 1992). Guimarães e Stotz (2004) demonstraram que o ácido oxálico produzido durante a infecção por *S.*

*sclerotiorum* está envolvido na regularização das células guardas, induzindo a abertura dos estômatos e inibindo a ação do ácido abscísico, cuja função é induzir o fechamento dos estômatos, causando uma desidratação foliar. Outro ponto é o fato de que, ambientes mais ácidos elevam os níveis de expressão de genes ligados às enzimas que degradam a parede celular do hospedeiro (Caddick *et al.*, 1986; Tilburn *et al.*, 1995).

## **1.2. Enzimas hidrolíticas e o processo de patogênese.**

As células vegetais possuem em sua composição uma complexa rede de microfibrilas de celulose, moléculas de hemicelulose, pectina e uma gama de proteínas cuja maioria é glicosiladas, que desempenham funções estruturais, de reconhecimento e catalíticas. Pectina 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 formando uma verdadeira barreira física (Vries *et al.* 2001). 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). E durante a interação da planta com o patógeno *S. sclerotiorum* ocorre à secreção de enzimas extracelulares que degradam estes componentes da parede celular.

As enzimas que degradam a parede celular da planta, não só contribuem para assimilação de nutrientes, mas também facilitam a penetração, colonização e maceração do tecido do hospedeiro (Poussereau *et al.*, 2001 a,b). Dentre estas enzimas estão as: pectinases, beta-1,3-glucanases, glicosidades, celulases, xilanase, cutinases e proteases que atuam no processo de infecção do hospedeiro. Muitas dessas são isoenzimas que diferem pelo seu ponto isoelétrico, peso molecular, processamento e regulação transcricional (Keon *et al.*, 1987, Poussereau *et al.*, 2001b). Em cultura, a expressão dos genes que codificam estas enzimas pelo fungo *S. sclerotiorum* é regulada por diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Tal mecanismo permite o fungo metabolizar outras fontes de carbono adaptando a outras disponibilidades de glicose. Além disso, o pH do ambiente pode regular os níveis de transcritos de enzimas que degradam a parede celular do hospedeiro (Cotton *et al.*, 2002; Rollins & Dickman, 2001).

E sabendo que 10% da parede celular são constituindo de proteínas, enzimas proteolíticas representa um importante papel na patogênese (Carpita & Gibeau, 1993). Em *S. sclerotinia* e *Botrytis cinérea* a atividade de enzimas proteolíticas parece estar correlacionada ao desenvolvimento dos sintomas (Urbanek, *et al.*, 1985; Poussereau, *et al.*, 2001 a; Have *et al.*, 2004) sendo estas enzimas consideradas importantes fatores de virulência (Staples & Mayer, 1995).

### **1.3. Enzimas proteolíticas / Proteases**

As proteases são enzimas proteolíticas, encontradas em todas as células e tecidos, onde degradam proteínas que se tornaram desnecessárias ou danificadas, além de ajudarem na digestão dos alimentos protéicos (Lehninger, 1995). A ligação covalente mais importante que une os aminoácidos para formar peptídeos e proteínas é denominada ligação péptica. As ligações peptídicas podem ser hidrolisadas por determinadas enzimas chamadas proteases, proteinases ou enzimas proteolíticas, encontradas em todas as células e tecidos, onde degradam proteínas que se tornaram dispensáveis ou lesadas. As proteases pertencem ao grupo das hidrolases as quais têm em comum o envolvimento da água na formação do produto. E catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, ocorrendo à transferência de componentes do substrato para a água (Whitaker, 1994). Em vários microrganismos, como bactérias, protozoários e fungos são encontrados proteases. Elas podem ser extracelulares e intracelulares, ligadas ou não a membrana (Neurath, 1989).

De acordo com o comitê de nomenclatura da União Internacional de bioquímica e Biologia Molecular (IUB, 1992), as proteases são classificadas em dois grupos principais, que são as exopeptidases ou carboxipeptidases e endopeptidases ou proteinases, dependendo do sítio de ação dessas enzimas na proteína (Bertenshaw & Bond, 2000). As exopeptidases iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino (N) ou carboxi-terminal (C) das proteínas, produzindo pequenos peptídeos ou mesmo aminoácidos. As endopeptidases clivam a proteína alvo na sua parte interna, longe das extremidades amino e carboxi-terminal, gerando dessa forma, peptídeos maiores.

As proteases são divididas em quatro subgrupos baseados no seu mecanismo catalítico em: (1) serina proteases, (2) aspartico proteases, (3) cisteína protease e (4) metolo protease (Rawlings & Barrett, 1993).

Serina protease tem como característica a presença de um grupo serina no seu sítio ativo. É abundante e distribuído entre vírus, bactérias e eucariotes, o que é indicativo de que ela seja vital aos organismos. De acordo com as suas semelhanças estruturais, as serinas proteases se agrupam em 20 famílias que foram posteriormente subdivididas (Barett, 1994). Outra interessante característica da serina protease é a conservação de resíduos de glicina próximo ao sítio catalítico contendo a serina, formando o motivo Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly (Brenner, 1988). Serinas proteases alcalinas que são ativas em pH altamente alcalino representam o maior subgrupo de serinas proteases. São produzidas por várias bactérias, leveduras e fungos. Elas hidrolisam uma ligação peptídica que tem tirosina, fenilalanina ou leucina na região carboxila. A subtilisina originada de *Bacillus* representa a segunda maior família de serinas proteases. Foram identificados dois tipos diferentes de protease bacteriana Nagase (BPN'). Ambas as enzimas apresentam uma larga especificidade de substrato e tem uma tríade no sítio catalítico composto de Ser221, His64 e Asp32. A conformação do sítio catalítico da subtilisina é semelhante à tripsina e quimiotripsina apesar da sua diferença global nos arranjos moleculares.

A aspártico protease, conhecido como protease ácida, é uma endopeptidase que depende de um resíduo de ácido aspártico para a sua atividade catalítica. Proteases ácidas se agrupam em três famílias, (A1) pepsinas, (A2) retopepsinas e (A3) enzimas de paratovirose (Barett, 1995), e foram colocadas na família AA. Os componentes da família são conhecidos como A1 e A2. O resíduo de ácido aspártico do sítio catalítico da protease situa-se dentro do motivo Asp-Xaa-Gly, onde Xaa pode ser uma Ser ou Thr (Sielecki et al., 1991).

As cisteínas proteases são encontradas em procariotos e eucariotos. Aproximadamente 20 famílias de cisteínas proteases foram reconhecidas. Sua atividade depende de uma díade catalítica que consiste em uma cisteína e uma histidina. A ordem dos resíduos Cys ou His (Cys-His ou His-Cys) difere entre as famílias. Geralmente são ativas somente na presença de agentes redutores tais como HCN ou cisteína. Segundo Barett (1994), com base na especificidade no sítio de clivagem na proteína, elas são divididas amplamente em quatro grupos: (1) papaína, (2) tripsina, com preferência pelo resíduo de arginina, (3) específico para ácido glutâmico, e (4) outros (caspase, VPE).

As metalo proteases representam os mais diversos tipos catalíticos de proteases, que incluem enzimas de uma grande variedade de origens como as collagenases de

organismo superiores, toximas hemorrágicas de veneno de cobras e termolisina de bactérias. Tem como característica a exigência de um íon metal divalente para a sua atividade (Hibbs et al., 1985). Foram reconhecidas aproximadamente 30 famílias de metalo proteases, das quais 17 são endopeptidases, 12 exopeptidases, e 1 (M3) contem ambos. Dependendo da sua especificidade de ação, as metalo proteases podem ser divididas em quatro grupos, (1) neutro, (2) alcalino, (3) Mixobacter I e (4) Mixobacter II. As proteases neutras mostram especificidade para aminoácidos hidrofóbicos, enquanto as proteases alcalinas possuem uma larga especificidade. Mixobacter I são específicos para resíduos de aminoácidos pequenos em qualquer lateral da cadeia polipeptídica, considerando que Mixobacter II é específico para resíduo de lisina no lado amino da cadeia peptídica (Barett, 1995).

As proteases realizam uma grande variedade de complexas funções fisiológicas. Tem grande importância no metabolismo e funções regulatórias, o que torna evidente a sua ocorrência em todos os tipos de organismos vivos. Em humanos e animais, proteases apresentam um papel crucial dentro de muitos processos fisiológicos e patológicos, como o catabolismo de proteínas, coagulação sanguínea, crescimento de tumores e metástases, ativação de zimogênio, liberação de hormônios, e transporte de proteínas secretoras através das membranas (Godfrey & West, 1996). Em plantas e microorganismo, das diversas atividades desempenhadas pelas proteases, podemos destacar a esporulação e liberação conidial, germinação, modificação de proteínas, regulação da expressão gênica, morte celular programada e resistência de plantas (Tornero et al., 1996; Beers et al., 2004).

#### **1.4. Proteases em fitopagogenos**

Nos fungos, as proteases facilitam a penetração do patógeno, quebrando as fibras estruturais da parede celular da planta e também providencia nutrientes para o fungo durante o processo de invasão (Poussereau, et al.; 2001 a). Proteases também são consideradas antagonistas de proteínas antifúngicas secretadas pela planta como parte da resposta de defesa (Mohavedi, et al., 1990).

A secreção de proteases alcalinas ou neutras como, as metaloproteinases, cisteína protease, serina protease e proteases ácidas como, aspartyl proteases e non-aspartyl protease ácida têm sido encontradas em tecidos de planta infectadas por vários fitopatógeno (Bidochka et al., 1999; Sreedher et al., 1999; De Pietro et al., 2001). Muitos fungos filamentosos e algumas leveduras secretam aspartyl protease como, por

exemplo, *C. albicans* um fungo patógeno comum em humanos, possuem pelo menos oito genes que codificam para esta enzima (Hube, 1998). E em *Gromerella cingulata* a secreção da aspartyl protease causa a degradação dos componentes da parede celular da planta (Clark et al., 1997).

Em *Botrytis cineria*, aspartyl protease tem sido identificada como um importante fator de virulência durante a infecção (Mohavedi & Heale, 1990; Have et al., 2004). E em *S. sclerotiorum* durante o processo de infecção de vários hospedeiros as aspartyl protease são capazes de causar a morte das células do hospedeiro e esta enzima é um importante fator de virulência (Poussereau et al., 2001 a, b).

Em *S. sclerotiorum*, dois genes codificam respectivamente uma non-aspartil protease ácida (*aspI*) e uma aspartyl protease (*aspS*) tem sido caracterizado. Poussereau et al., (2001 a, b) e Girard et al, (2004), demonstraram a atuação do cAMP como um provável intermediário na cascata celular que conduz a produção da non-aspartyl protease ácida em *S. sclerotiorum*. A expressão do gene *aspS* e a ausência de total regulação da sua expressão pode dar a *S. sclerotiorum* a capacidade de produzir, no começo da infecção, uma enzima capaz de atacar proteínas estruturais da parede e de degradar proteínas da defesa do hospedeiro (Poussereau et al., 2001b).

## 2. OBJETIVOS

É conhecido que *S. sclerotiorum* produz múltiplas enzimas hidrolíticas que promovem a degradação da parede celular da plantas, conhecidas como fatores de patogenicidade. Porém pouco foi estabelecido de como e quais destas enzimas são importantes na patogênese ou qual o papel específico durante o processo de infecção em diferentes culturas.

Neste sentido, este trabalho tem como objetivo: A caracterização molecular e bioquímica de proteases em *S. sclerotiorum*, durante o processo de invasão em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e em meio de cultura utilizado diferentes fontes de carbono.

### 2.1. Objetivos específicos/metás:

1 - Determinar a produção de proteases durante o processo de interação de *S. sclerotiorum* com plantas de feijoeiro (interação parasitária), bem como durante o crescimento em diferentes fontes de carbono (interação saprofítica).

2 - Analisar comparativamente, por meio da técnica de qRT-PCR, a expressão do gene *aspS* e *asp1* que codifica para a aspartyl protease e protease acida, respectivamente, em *S. sclerotiorum*, durante a interação parasitária e saprofítica deste fungo.

### 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 placas de Petri com 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. Estabelecimento do processo de infecção:

O isolado de *S. sclerotiorum* previamente caracterizado, crescido em meio BDA, foi utilizado para o inoculo de plântulas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L), 15 dias após a emergência, segundo o método descrito por Hunter *et al.* (1981). Três vasos por tratamento foram utilizados para cada hospedeiro (5 plantas por vaso). As plantas foram inoculadas pelo método do palito de dente e mantidas sob condições controladas de temperatura e fotoperíodo. Palitos de dentes de madeira foram cortados a aproximadamente 1 cm da extremidade, autoclavados a 121°C por 30 minutos. Escleródios do isolado foram incubados concomitantemente com os palitos, por 5 dias em BOD a 20 °C. Desta forma, o micélio do fungo cresceu ao redor dos palitos, sendo então estes espetados nos caules das plantas.

Durante o período de 10 dias, descrito para o estabelecimento da infecção (MIKLAS & GRAFTON, 1992), o micélio da região infectada (tecido da planta infectado) foi retirado para extração de RNA e proteína total, seguindo os seguintes tempos: controle, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 240 horas.

#### 3.2. Crescimento em meio com diferentes fontes de carbono

##### 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 5 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 prevenir 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:**

O inoculo obtido foi utilizado 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%, pectina 1% e extrato de parede de feijoeiro 2%. 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.

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.

#### **3.2.4- 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:

##### **Determinação de proteínas totais:**

Os ensaios para verificação da concentração de proteínas totais seguiram a metodologia de Bradford (Bradford, 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.. Os testes foram feitos em triplicata, utilizando trinta e três (33)  $\mu\text{L}$  das amostras do meio líquido de cultura aliquotadas, sessenta e sete (67)  $\mu\text{L}$  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 onda de 595 nm para anotação das absorbâncias, multiplicando-se os valores pelo fator t03, devido a proporção necessária para a reação ser de 1:3. O branco da reação foi preparado com 1 mL do reagente de Bradford adicionado com 100  $\mu\text{L}$  de água destilada. Os valores das absorbâncias obtidas foram plotados na curva padrão de BSA e anotadas as respectivas concentrações protéicas.

### **Ensaio para determinação da atividade proteolítica**

Para determinação da atividade enzimática foi utilizada a metodologia citada por (Macdonald & Odds, 1980). Cada mistura das amostras conteve 0,6 ml 1%BSA em 50mM tampão citrato de sódio, pH 3.2 - 8.0, e 0,2 ml do sobrenadante de *S. sclerotiorum*. A solução foi agitada suavemente para evitar a formação de espuma, e a solução foi incubada a 37° C por 2 horas. A reação foi paralisada pela adição de 0.4 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% (w / v) em cada amostras. O branco foi preparado combinando TCA com a solução a ser testada e então adicionou o substrato. A seguir os tubos foram incubados no gelo por 10 minutos e depois centrifugados a 13.000 x g por 10 minutos. Inibidores específicos foram incubados com a enzima por 30 minutos antes do teste da atividade da protease. A concentração final para os inibidores da protease (Sigma) foram usadas 1M mercaptaethanol Beta (um inibidor da protease cisteína), 0.04M PMSF (um inibidor de protease serina), 0,05 M EDTA (um inibidor de metaloproteases), e 0.1M pepstatin A (um inibidor da protease aspartil) . A leitura de absorvância do sobrenadante foi realizada com via óptica de 4mm a 280nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima para causar um aumento de 0,01 U na absorvância a 280nm sob ás condições das amostras. Todos os ensaios da protease foram executados em triplicata e os dados são apresentados como média e desvio padrão.

### **3.2.5- Análise da expressão dos genes de proteases**

#### **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 5 mL do reagente Trizol e ressuspendidos em vórtex por 15 minutos, deixado em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente, permitindo uma eficiente dissociação das ribonucleoproteínas de interesse. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio por mL de reagente Trizol, homogeneizados vigorosamente no vórtex e deixadas novamente em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente. Após este prazo, foram centrifugadas 9000 r.p.m. por 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 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 ressuspendido e lavado com etanol 75% gelado, com um volume de 1 ml, homogeneizados em vórtex e novamente centrifugado em 12000 r.p.m. à 4°C por 15 minutos. Na temperatura ambiente, o etanol sofreu evaporação, permanecendo o pellet úmido, que foi ressuspendido em 50 µL de água milli-q tratada com DEPC, incubado a 60° C por 10 minutos e congelado no freezer. As amostras congeladas estavam aliquotadas 3 Eppendorfs para cada tratamento em todos os pontos, sendo necessária uma etapa de separação, que consiste em ressuspende o RNA total em um único Eppendorf, sendo levadas ao banho-maria a uma temperatura de 65° C por 5 minutos e imediatamente colocadas em banho de gelo, em seguida, centrifugadas a 9000 r.p.m. por 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 1998 µL de água milli-q para dois (02) µL de RNA total, homogeneizados e levados à leitura das absorvâncias (Abs) em espectrofotometria com ultra-violeta (UV) e cubetas de quartzo, nos comprimentos de onda em 260 nm e de 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 µg/µL.

### **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 ( $Concentração\ em\ \mu g/\mu L = Abs\ 260\ nm \times 1000 \times 40 / 1000$ ),  $C_2$  a concentração final de um (01) µg/µL 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 1 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.

### **PCR em tempo real**

As seqüências dos primers utilizados foram de protease (ácido ACP1) (Gene Bank / EMBL EU314718 número de adesão) [ACP1 F-5 'CCG ACC CAA AAC GGA GAA T 3' e ACP1-R 5 'GAG ACG GTG GAG AGG TTT TGT T 3']; aspartil protease (ASPS) (Gene Bank / EMBL número de adesão DV643778) [ASPS-F 5' TGC TAC TGG GTC CAA CAT CGT 3' e ASPS-R 5' TGA GCT TGC TGC ACT TGG 3']; gene de actina (act) (Gene Bank / EMBL Q11197 número de adesão) [acto F-5 'act 3', CCCCAGCGTTCTACGTCT-R 5 'CAT GTC AAC ACG AGC AAT G 3']. O

tamanho de todos os fragmentos amplificados foi de 99 pb, 106 pb e 106 pb para protease ácida, aspartil protease e gene de actina, respectivamente.

Quantidades iguais de RNA (0,5 g) foram reverso transcrito usando oligo (dT) 12-18 primer e submetidas à PCR em tempo real. Ensaio de amplificação foram realizadas com um sistema de detecção de sequência 7900HT instrumento ABI PRISM (Applied Biosystems, E.U.A.) em 12 reações l contendo 0,4 mM de cada primer acima descrito, 6 µl de SYBR Green PCR Master Mix (2 ×) e 0,2 µl modelo de DNA. Após desnaturação inicial a 95 ° C por 10 min, amplificações foram realizadas por 40 ciclos a 95 ° C/15 s, 60 ° C / 1 min. O CT comparativa (cruzamento de limiar) método, que emprega o constitutivo de *S. sclerotiorum* actina dados da expressão do gene para a normalização, foi utilizado para avaliar a fold-change de cada gene de interesse em amostras de indução quando comparado ao controle. Cada amostra foi analisada em triplicata para todos os genes analisados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSAO

### 4.1. Caracterização da atividade das proteases secretadas por *S. sclerotiorum*.

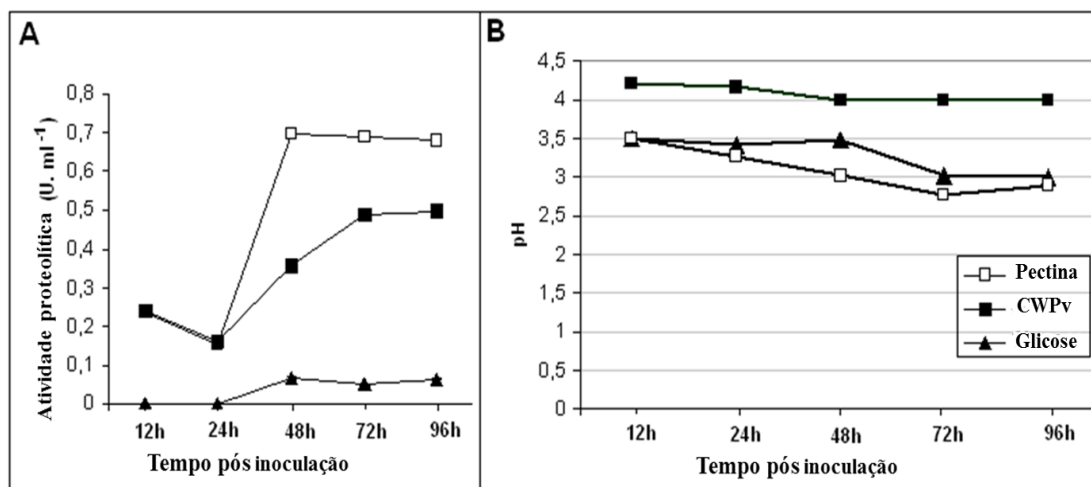
#### 4.1.1. O efeito da fonte de carbono na atividade da protease.

Os efeitos de diferentes fontes de carbono na produção de protease por *S. sclerotiorum* SPS, foram testados em meio salino mínimo suplementado com pectina, glicose ou extrato da parede celular de *P. vulgaris* (CWPv). As culturas foram cultivadas durante 12-96 horas, colhidas e a atividade enzimática determinada diariamente. *S. sclerotiorum* produziu proteases em todas as fontes de carbono testadas, mas os níveis de atividade variaram dependendo das fontes utilizadas (Fig. 1A). Níveis máximos de atividade foram alcançados após 48-72 horas após a transferência para meio suplementado com pectina ou CWPv, esta atividade enzimática foi máxima e permaneceu estável por várias horas (Fig. 3A). A maior atividade específica foi obtida com pectina (0,69 U.mg<sup>-1</sup>) e CWPv (0,49 U.mg<sup>-1</sup>). Não foram encontrados níveis significativos de atividade específica de proteases na presença de glicose (0,065 U.mg<sup>-1</sup>).

Em meio de cultura suplementado com glicose, houve redução na atividade enzimática. As enzimas induzidas quando submetidas à fonte extra de carbono, têm repressão catabólica. Esse comportamento é comumente encontrado em *Aspergillus nidulans*. Conforme Mathieu & Felenbok (1994) e Panozzo et al. (1998), este fungo preferencialmente usa glicose como fonte de energia, portanto a biossíntese de enzimas envolvidas na degradação de proteínas só é observada na ausência de carbono metabolizado facilmente, como glicose. Vautard - Mey & Fevre (2002), mostraram que quando o fungo *S. sclerotiorum* cresce na presença de glicose aumenta a expressão do gene cre1 e, conseqüentemente, o aumento dessa expressão pode contribuir para a repressão de genes que codificam enzimas que degradam a parede celular do hospedeiro, como proteases.

Após a transferência, o pH da cultura caiu rapidamente de 3,5 (12 horas após a inoculação) para 2,8 (72 horas após a inoculação) em meio contendo pectina (Fig. 3B). Em meio de cultura suplementado com CWPv diminuiu de 4,2 (12 horas após a inoculação) para 3,9 (48 horas após a inoculação), e depois permaneceu constante. Curiosamente, a natureza das proteases que estão sendo produzidas pelo patógeno se

correlaciona com a acidificação do meio de cultura: quando o pH do meio cai abaixo de 4,0, foi observado um aumento da atividade proteolítica das proteases ácidas.



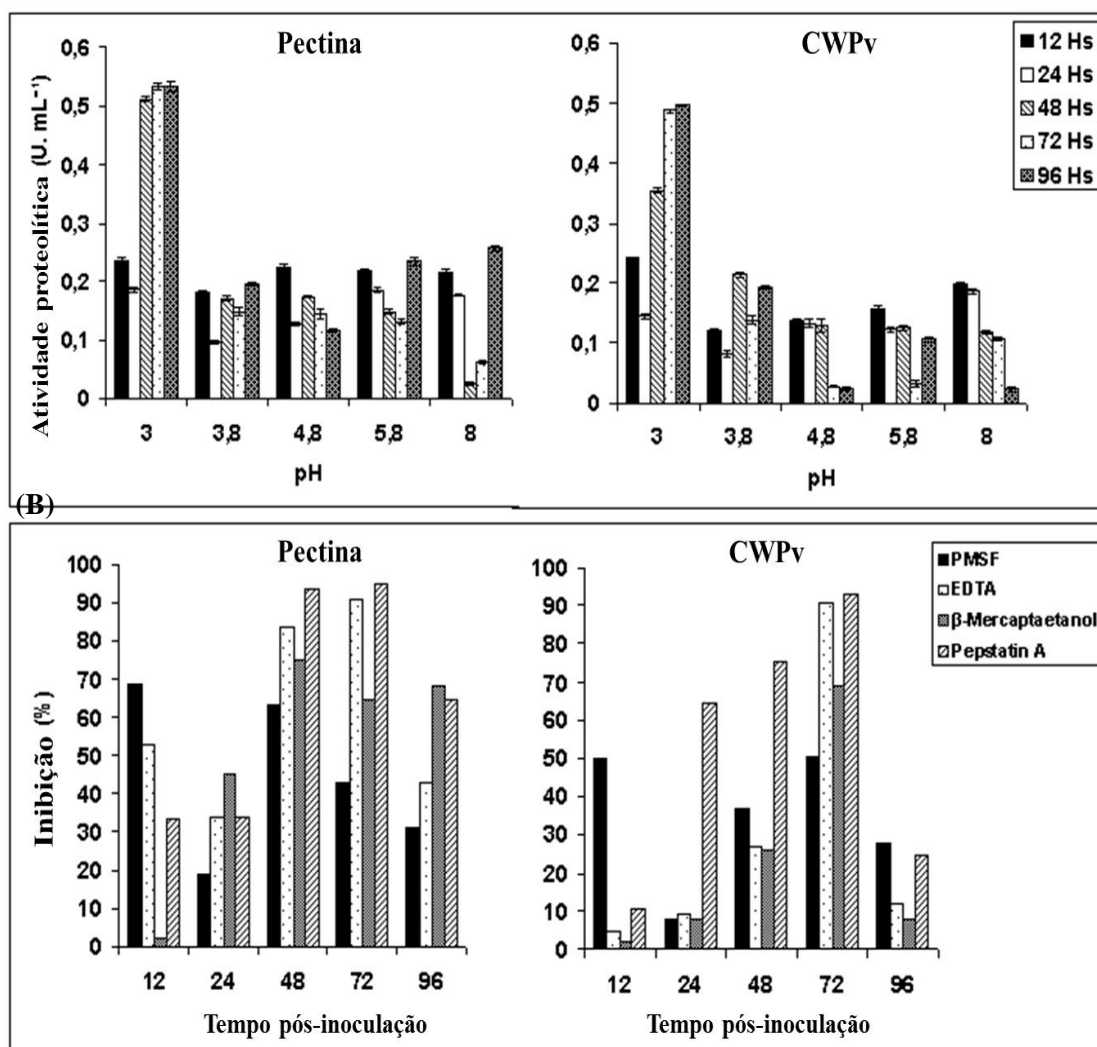
**Fig 3.** Cinética da atividade proteolítica durante a interação do fungo *S. sclerotiorum* com diferentes fontes de carbono (pectina, CWPv e glicose) (A) e comparada a evolução do perfil de pH no meio de cultura (B). A cinética enzimática foi realizada em tampão citrato com pH 3,2 utilizando BSA como substrato, incubado a 37 ° C. Os testes da atividade proteolítica foram realizados em triplicatas. Os valores mostrados representam o desvio padrão médio dos erros mostrados em barras.

#### 4.1.2. Efeito do pH e inibidores na atividade da proteases.

O pH ótimo da atividade das proteases foi determinado. O nível mais alto de atividade foi detectado em pH 3 e um pico menor foi repetidamente encontrado em pH 6-8 em filtrados de cultura de *S. sclerotiorum* cultivados em meio mínimo, suplementado com pectina ou extrato de parede celular de *P. vulgaris* (CWPv) (Fig. 4A). Em contraste, o pH não afetou a atividade da proteases produzida no estágio inicial (12-24 horas) dessas culturas. Estes dados indicam que a principal atividade de protease segregada para o meio corresponde a diferentes famílias de proteases, provavelmente ácidas e neutras, e foram sujeitas a influências temporais. Nenhuma diferença significativa foi observada no perfil de atividade de proteases entre os filtrados de cultura livre de células de *S. sclerotiorum* cultivados em meio mínimo, suplementado com pectina ou extrato de CWPv.

Em pH 3, também foi observado que a enzima responsável pela atividade da protease em 24 horas pós-inoculação parece pertencer a outra classe de protease ácida. Em pH 8,0 nos dois meios de cultura testados (pectina e CWPv) houve um aumento na atividade proteolítica 12 horas após a inoculação. Indicando que as proteases neutras

de *S. sclerotiorum* podem ser secretadas no início da infecção. Billon-Grand et al. (2002) demonstraram que a atividade das proteases de serina foi detectada em pH neutro nos dois meios de cultura.



**Fig. 4** – O efeito do pH e dos inibidores sobre a atividade da proteases do fungo *S. sclerotiorum* em diferentes meio de cultura, pectina e parede celular de *P. vulgaris*. (A) Perfil da atividade proteolítica em diferentes pH. (B) Efeito dos inibidores da protease na atividade proteolítica. Classificação de inibidores: PMSF (0,04 M) inibidor de serina proteases, EDTA (0,05 M) inibidor de metalo-proteinases, p-Mercaptoetanol (1M) de inibidor de cisteína-protease; Pepistatina A (0,1 M) inibidor de *aspartil* proteases. Testes na atividade proteolítica foram feitos em triplicatas. Os valores mostrados representam o desvio padrão médio dos erros mostrados em barras.

Diferentes inibidores de proteases foram testados para identificar o tipo de proteases responsável por essa atividade enzimática ácida (Fig. 4B). A atividade no pH

3 foi fortemente inibida (75%) pela pepstatina A em todo o período, no entanto foi mais pronunciada às 48-72 horas após a inoculação. Isto mostra que o agente patogénico pode ser secretado por proteases ácidas, provavelmente por aspartil-proteases, e estas enzimas podem estar envolvidas na patogenicidade. Poussereau et al (2001a) mostraram que a atividade proteolítica foi fortemente inibida pela pepstatina "A", indicando que muitas das proteases secretadas pelo fungo *S. sclerotiorum* são aspartil proteases. Em um estudo semelhante, Billon-Grand et al. (2002) também descobriram que a atividade proteolítica foi reduzida na presença de pepstatina "A", indicando que o fungo *S. sclerotiorum* secretou aspartil protease.

Outros inibidores como PMSF, EDTA e  $\beta$ -Mercaptoetanol, inibidores da serina protease, cisteína e metollo protease respectivamente, foram utilizados para verificar se o fungo *S. sclerotiorum* poderia ter outras proteases secretadas, e observamos que a inibição da atividade proteolítica sugere que os fungos também podem ter outras proteases secretadas durante a infecção. Billon-Grand et al. (2002) verificaram que em meio de cultura contendo extrato de girassol, não houve atividade de metollo e cisteína proteases em *S. sclerotiorum*.

#### **4.1.3. Atividade de protease durante a infecção do feijoeiro**

*In vivo*, plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris L*) foram infectadas por *S. sclerotiorum* pelo método palito. Atividade proteolítica durante a interação do fungo *S. sclerotiorum* em feijoeiro foi detectada 24 horas após a infecção, aumentando 72 horas após a infecção. Aumento da atividade proteolítica correlacionou com o aumento da intensidade de colonização e maceração do tecido hospedeiro pelo fungo *S. sclerotiorum* (Figura 6 A-B). No entanto, não é possível determinar se a atividade observada é derivada do fungo ou planta.

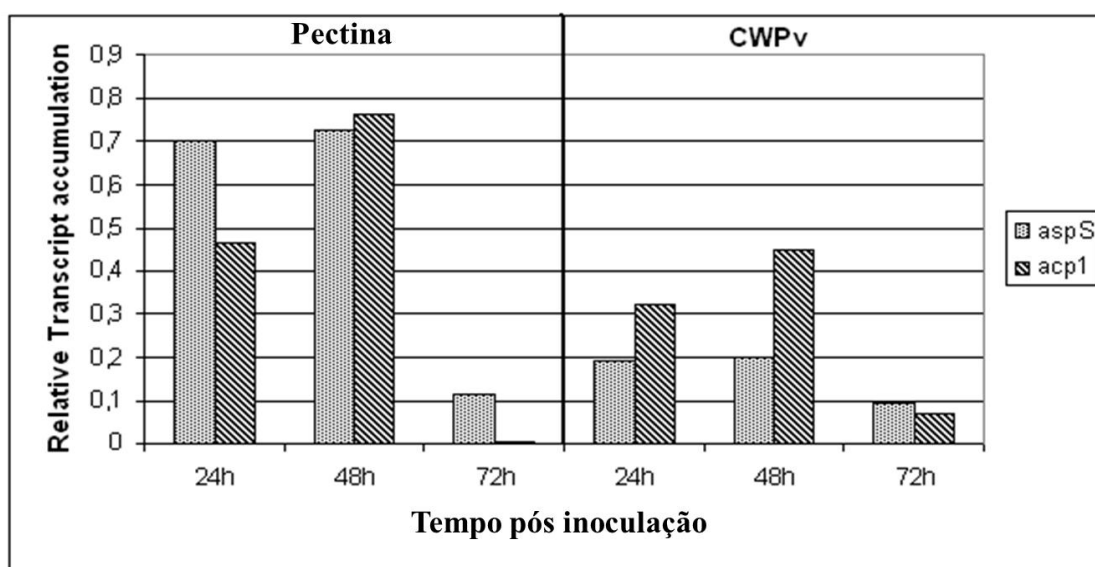
## **4.2. Expressão das proteases**

### **4.2.1. Efeitos do pH ambiente, fontes de carbono na expressão dos genes *aspS* e *acp1***

De modo a determinar o padrão da expressão de *acp1* e *aspS*, *S. sclerotiorum* crescido num meio mínimo foi transferido para meios de cultura contendo extratos de CWPv e pectina, respectivamente. *Acp1* e *aspS* expressos durante a pré-cultura no meio de glucose (dado não mostrado) foram também expressos 24-72 h após transferência para o meio CWPv ou pectina (Fig. 5). Os acúmulos de transcritos foram

maiores nos meios de cultura contendo pectina, indicando que, provavelmente, a expressão de *acp1* e *aspS* é controlada por esta fonte de carbono. Presumimos que essas diferenças variáveis entre duas fontes de carbono, CWPv e pectina, foram devidas à degradação dos polímeros de pectina, podendo criar um ambiente, por sua vez liberando produtos de baixo peso molecular (oligo-galacturonídeos) que servem para induzir a expressão de uma segunda onda de enzimas degradativas que coletivamente provocam a maceração total do tecido vegetal (Hegedus e Rimmer, 2005). Desta forma, os resultados mostraram que a quitina pode induzir a expressão de duas proteinases diferentes em *A. fumigatus* durante o processo de colonização de insetos (Pereira et al. 2006).

Durante o decorrer destas culturas em meio não tamponado, o pH diminuiu progressivamente de 3,5 para 2,8 (como indicado na Fig 4) devido à secreção de ácido oxálico, permitindo a forte expressão de *acp1* e *aspS* durante esta diminuição. E, curiosamente, o padrão de acumulação de transcritos *aspS* e *acp1* foram reprimidos em 72 horas pós inoculação em ambos os meios. E foi verificado que o pH do ambiente controla a expressão do gene da protease ácida (*acp1*) e pode afetar a expressão *aspS* (Kim et al., 2007; Poussereau, et al. 2001 a, b; Rollins, 2003; Rollins e Dickman, 2001).



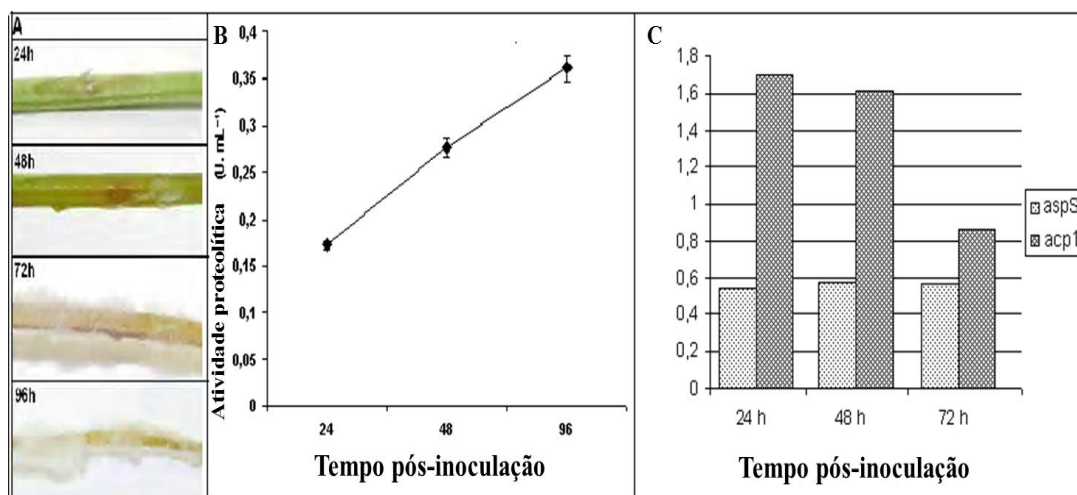
**Fig. 5-** Análise em tempo real dos padrões de transcrição dos genes *aspS* e *acp1* durante a durante o cultivo em meio de cultura contendo pectina e parede celular de *P. vulgaris* (CWPv). Os níveis de transcrição foram estimados usando uma curva padrão para cada gene e estes níveis são normalizados contra a quantidade de transcritos de actina fúngica em cada amostra.

A expressão *in vitro* do *acp1* está sujeita a vários mecanismos regulatórios transcricionais. A expressão induzida pelas proteínas da parede celular das plantas é controlada pela repressão catabólica ao carbono e ao nitrogênio. O pH do ambiente superior a pH 5 anula a indução, resultando na repressão total da *acp1*. Estes mecanismos reguladores transcricionais e a presença de vários motivos no promotor de *acp1* que podem codificar locais de ligação para os reguladores CREA, AREA e PacC sugerem o envolvimento destes reguladores no controle da expressão de *acp1* (Kim et al., 2007; et al., 2001a).

Uma incongruência no padrão esperado de acumulação do transcrito foi observada com o gene expresso *aspS*. Nosso trabalho indica que a expressão *aspS* foi modulada durante o tempo de cultivo em meio CWPv e pectina. Além disso, Poussereau et al. (2001a) para determinar o efeito de fontes de carbono e nitrogênio na expressão de *aspS*, cultivou micélios de *S. sclerotiorum* em meio mínimo de glicose / NH<sub>4</sub> e depois transferidos para meios não tamponados contendo extratos de girassol e glicose, glicerol e / ou NH<sub>4</sub> como fontes de carbono e nitrogênio. Este trabalho mostrou que a expressão *in vitro* de *aspS* é constitutiva e não regulada pelo pH.

#### 4.2.2. Expressão de *aspS* e *acp1* durante a infecção do feijoeiro

A fim de comparar a expressão temporal de *aspS* e *acp1*, experimentos de qRT-PCR foram realizados com RNA total extraído de caules de *P. vulgaris* em diferentes tempo após a inoculação com *S. sclerotiorum*. O gene estrutural da actina de *S. sclerotiorum* (*act*) foi usado como um gene específico para fungos. O transcrito supostamente correspondente à aspartil protease (*aspS*) aumentou desde o início da infecção e permaneceu alto 72 h após a infecção (Fig. 6-C). Os transcritos de *acp1*, supostamente correspondentes a uma protease ácida, foram detectados 24 h após a inoculação permanecendo alta e constante durante as 48 h, e depois foi diminuindo. O aumento dos transcritos coincidiu com a fase de desenvolvimento dos sintomas em que ocorreu a colonização micelial intensiva das hastes. A diminuição foi observada quando o caule foi completamente invadido e degradado (Fig. 6-C). Poussereau et al., (2001 a, b) também mostraram que *acp1* e *aspS* foram expressos em plantas durante a infecção por cotilédones de girassol. A expressão é baixa no início da infecção, mas aumenta subitamente no estágio de disseminação da necrose do tecido.



**Fig. 6-** Proteases ativas de *S. sclerotiorum* durante a infecção em caules de plantas de *P. vulgaris* (A) Processo de formação de infecção do caule (B) As proteínas foram extraídas e foi feita a atividade das proteases. O ensaio enzimático foi realizado em triplicata. Os valores mostrados representam à média e as barras mostram o desvio padrão. (C) Análise em tempo real dos padrões de transcrição dos genes *aspS* e *acp1* durante a infecção. Os níveis de transcrição foram estimados usando uma curva padrão para cada gene e estes níveis são normalizados contra a quantidade de transcritos de actina fúngica em cada amostra.

Uma dinâmica entre a produção de ácido oxálico, a acidificação do pH do meio ambiente, a atividade enzimática, a regulação do gene da enzima e a transdução do sinal de pH ambiente têm sido postuladas, desempenhando um papel significativo no desenvolvimento da doença em Sclerotinia (Hegedus e Rimmer, 2005; Rollins, 2003). Em resumo, esta dissertação fornece novas informações a respeito da produção de proteases na infecção de plantas de feijoeiro por *S. sclerotiorum*. Entretanto, é necessário realizar mais estudos para investigar o possível papel das proteases em *S. sclerotiorum* durante a infecção em diferentes hospedeiros.

## 5. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

O fungo *S. sclerotiorum* secreta proteases durante o crescimento em planta de feijoeiro e em meio de cultura suplementado com diferentes fontes de carbono.

Através de ensaios enzimáticos, proteases extracelulares de *S. sclerotiorum* inoculado em meio contendo pectina e extratos de parede de feijoeiro foram caracterizados como sendo proteases ácidas e proteases neutras.

Os genes *aspS* e *acp1*, durante o processo de interação de *S. sclerotiorum* com plantas de feijoeiro, tiveram níveis significativos de expressão nos tempos avaliados.

## 6. PERSPECTIVAS

O prosseguimento do trabalho pode objetivar as seguintes tarefas:

- ✓ A fim de identificar as proteases envolvidas no processo de patogênese do fungo *S. sclerotiorum*. Preparar Géis de Atividade em eletroforese bi-dimensional de isoeletrofocalização, das amostras do sobrenadante da cultura de *S. sclerotiorum*.
- ✓ Analisar a expressão gênica, por meio da técnica de PCR em tempo real, de plantas de feijoeiro infectadas por *S. sclerotiorum*, testado diferentes genes de proteases.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**ALGHISI, P. AND FAVARON, F.** Pectin-degrading enzymes and Plant parasite interactions. **Eur. J. Plant Pathol**: 1995, 101, 365–375

**BARETT, A. J.** Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**. 1994, 244: 1-15,

**BARETT, A. J.** Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. **Methods in Enzymology**. 1995, 244: 1-15,

**BARDIN, S.D. AND HUANG, H.C.** Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Can. J. Plant Pathol**. 2001, **23**, 88–98.

**BEERS, E. P.; JONES, A. M.; DICHERMAN, A. W.** The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartyl protease families in Arabidoses. **Phytochemistry**, 2004, 65: 43- 58.

**BRENNER, S.** The molecular evolution of genes and proteins: a tale of tho serines. **Nature**, 1988, 334: 528-530.

**BERTENSHAW, G. P. & BOND J. S.** Proteases; from fertilization to cell death. **TIPS**., 2000, 21, 319 – 320,.

**BIDOCHKA, M. J., BURKE, S. & NG, L.** Extracellular hydrolytic enzymes in the fungal genus *Verticillium* : adaptations for pathogenesis. **Can J Microbiol**, 1999, **45**, p.856±864.

**BILLON-GRAND, G., POUSSEREAU, N. and FÈVRE, M.** The extracellular proteases secreted *in vitro* in planta by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **J. Phytopathol**, 2002, 150 507-511,.

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

**BOLTON, M. D, THOMMA BPHJ & NELSON B. D.** *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Mol Plant Pathol**: 2006, 7. p. 1–16.

**BRADFORD, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 1976, 72, 248-254.

**BUENO, C. J.; AMBROSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L.** Ocorrência de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em *Aster ericoides* L. (White Show) no estado de São Paulo, Brasil. **Summa phytopathol.** 2006, Vol. 32 no. 3 Botucatu July/Sept.

**CADDICK, M., BROWNLEE, A. & ARST, H.** Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. **Mol Gen Genet** 203: 1986, 346-353.

**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, 2000, 2191–2199.

**CARPITA, N. C. & GIBEAUT, D. M.** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant J** 3, 1993, 1-30.

**CLARK, S. J., TEMPLETON, M. D. & SULLIVAN, P. A.** A secreted aspartic proteinase from *Glomerella cingulata*: purification of the enzyme and molecular cloning of the cDNA. **Microbiology** 143, 1997, 1395–1403.

**COTTON, P., RASCLE, C., FÈVRE, M.** Characterization of PG2, an early endoPG produced by *Sclerotinia sclerotiorum*, expressed in yeast. **FEMS Microbiol Lett**, 213, 2002, 239–244.

**DICKMAN, M.B. AND MITRA, A.** Arabidopsis thaliana as a model for studying *Sclerotinia sclerotiorum* pathogenesis. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 41, 1992, 255–263.

**DI PIETRO, A., HUERTAS-GONZALEZ, M. D., GUTIERREZ-CORONA, J. F. G. MARTINEZ-CADENA, E. MÉGLECZ, M. I. G. R.** Molecular characterization of a subtilase from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. **Mol. Plant Microbe Interactions** 5, 2001, p.653-662.

**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**, 21, 2002, 1350–1359.

**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**, 37, 2005, 2180–2184.

**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**, 20, 2000, 4635–4647.

**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, 2004, n. 12, p. 1402–1409,.

**FRAISSINET-TACHET, L., REYMOND-COTTON, P. & FEVRE, M.** Characterization of a multigene family encoding an endopolygalaturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Curr Genet** 29, 1995, p.96-99.

**GIRARD, V. FÉVRE, M. BRUEL, C.** Involvement of cyclic AMP in the production of the acid protease Acp1 by *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiology Letters** 237, 2004, p.227-233.

**GODFREY, T.; WEST, S.** Industrial enzymology. **Macmillan Publisheis Inc.**, 1996, New York 2a ed., p.3,

**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.** 37, 1990. 179-191.

**GUIMARÃES. L.R. AND STOTZ, U. H.** Oxalate Production by *Sclerotinia sclerotiorum* Deregulates Guard Cells during Infection. **Plant Physiology** 136: 2004, p.3703-3711.

**HALL, R.; NASSER, L.C.B.** Practice and precept in cultural management of bean diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 18: 1996 176-185.

**HAMBLETON, S., WALKER, C. AND KONH, L.M.** Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999 - 2000 samples from Ontario and Quebec soybean. **Can. J. Plant Pathol.** 24: 2002, 309–315.

**HARTLEY, B. S.** Proteolytic enzymes. **Annual Review of Biochemistry.** 1960, 29: 45-72,

**HAVE A. T., DEKKERS E., KAY J., PHYLIP L. A., AND KAN J.A.L.V.** An aspartic proteinase gene family in the filamentous fungus *Botrytis cinerea* contains members with novel features. **Microbiology**, 150, 2004, 2475–2489

**HEGEDUS, DD, RIMMER SR.** *Sclerotinia sclerotiorum*: when “to be or not to be” a pathogen? **FEMS Microbiol Lett**, 251, 2005, 177–184.

**HUBE, B.** Possible role of secreted proteinases in *Candida albicans* infections. **Rev Iberoam Micol** 15: 1998, p.65–68.

**HUANG, H.C. AND DUECK, J.** Wilt of sunflower from mycelia germinating sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Can. J. Plant Pathol.** 2, 1980, 47–52.

**HUANG, H.C., CHANG, C. AND KOZUB, G.C.** Effect of temperature during sclerotial formation, sclerotial dryness, and relative humidity on myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Can J. Bot.** **76**, 1998, 494–499.

**LAMBERT, M., BLANCHIN-ROLAND, S., LE LOUEDEC, F., LEPINGLE, A., AND GAILLARDIN, C.** 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: 1997 p. 3966–3976.

**LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.** Princípios da bioquímica. Ed.Sarvier, 1995.

**LERMANN, U., & MORSCHHAUSER, J.** Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. **Microbiology** 154: 2008, 3281-3295.

**LE TOURNEAU, D.** Morphology, cytology and physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, **69**, 1979, 887–890.

**LOBO JUNIOR, M.; DE ABREU, M.S.** Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciênc. Agrotec.**, 2000. Lavras, v. 24, n.2, p.521-526,

**LUMSDEN, R.D.** Pectolytic enzymes of *Sclerotinia sclerotiorum* and their localization on infected bean. **Can. J. Bot.** 54, 1976, p. 2630–2641.

**LUGTENBERG, B.J.J., CHIN-A-WOENG, T.F.C., BLOEMBERG, G.V.** Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie Leeuwenhoek**, 81, 2002, 373-383.

**KEON, J.P.R., BYRDE, R.J.W. AND COOPER, R.M.** Some aspects of fungal enzymes that degrade plant cell walls. In *Fungal Infection of Plants* (Pegg, G.F. and Ayres, P.G., eds). **Cambridge: Cambridge University Press**, 1987, 133–157.

**KIM, Y. T., PRUSKY, D., and ROLLINS J. A.** An activating mutation of the *Sclerotinia sclerotiorum* *pac1* gene increases oxalic acid production at low pH but decreases virulence. **MOLECULAR PLANT PATHOLOGY**, 2007, **8**, 5, 611–622

**MARTEL, M., LETOUBON, R. & FEVRE, M.** Purification of endopoly galacturonase from *Sclerotinia sclerotiorum*: multiplicity of the complex enzyme system. **Curr Genet** **33**: 1996, p.243-248.

**MOHAVEDI, S; HEALE, J.B.** Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers in culture and in infected carrots. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** **36**: 1990, 289 -302.

**NAPOLEÃO R.; CAFÉ FILHO A. C.; NASSER, L. C. B.; LOPES, C. A. SILVA, H. R.** Intensidade do Mofo-Branco do Feijoeiro em Plantio Convencional e Direto sob Diferentes Lâminas d'Água. **Fitopatol. bras.** 2005, 30(4), jul – ago,

**NEURATH H., BEYNON, R. J., BOND, J. S.** The diversity of proteolytic enzymes. **Proteolytic Enzymes a Practical Approach**, 1989, Oxford, UK; IRL Prees, 1-13,

**OLIVEIRA, S. H. F.** Manejo do mofo branco. **Revista DBO Agrotecnologia**, 2005, ano 2.

**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**, 2002, 426–446.

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

**POUSSEREAU, N., CRETON, S., BILLON-GRAND, G., RASCLE, C. & FEVRE, M.** Regulation of *acp1*, encoding a non-aspartyl acid expressed during

pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiol. Lett.** 147, 2001b, p.717-726.

**RAUCHER, M., MENDGEN, K. AND DEISING, H.** Extracellular proteases from the rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. **Exp. Mycol.** 19, 1995, 26-34.

**RAWLING, N. D.; BARRETT, A. J.** Evolutionary families of peptidases . The *Biochemical Journal* 290: 1993, 205-218,.

**RIOU, C., FREYSSINET, G. AND FEVRE, M.** Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum* *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1992, 578–583.

**ROLLINS, J.A.** The *Sclerotinia sclerotiorum pac1* Gene Is Required for Sclerotial Development and Virulence. **MPMI**, 16, 2003, 785–795.

**ROLLINS, J.A.; DICKMAN, M.B.,** Increase in Endogenous and Exogenous Cyclic AMP Levels Inhibits Sclerotial Development in *Sclerotinia sclerotiorum*, **Applied and Environmental Microbiology**, 1998, 2539–2544.

**ROLLINS, J.A. and DICKMAN, M.B.** pH Signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a *pacC/RIM1* Homolog. **Applied and Environmental Microbiology**, 67, 2001, 75-81,

**SIELECKI A. R.; FUJINAGA, M.; READ, R. J.; JAMES, M. N. G.** Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8 Å resolution. **Journal of molecular biology.** 1991, 219: 671,

**SREEDHAR, L, D. Y. KOBAYASHI, T.E. BUNTING, B.I. HILLMAN, F.C. AND BELANGER.** Fungal protease expression in the interaction of the plant pathogen *Magnaporthe poae* with its host. **Gene** **235**: 1999, 121-129.

**STAPLES, R.C. AND MAYER, A.M.** Putative virulence factors of *Botrytis cinerera* acting as a wound pathogen. **FEMS Microbiol. Lett** 134: 1995, 1-7.

**THOMMA, B.P.H.J.** *Alternaria* spp. from general saprophyte to specific parasite. **Mol. Plant Pathol.** **4**, 2003, 225–236.

**TILBURN, J., SARKAR, S., WIDDICK, D. A., OREJAS, M., MUNGROO, J., PENALVA, M. A. & ARST, H. N., Jr.** The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid and alkaline expressed genes by ambient pH. **EMBO J** **14**, 1995, 779-790.

**TORNERO, P.; MAYDA, E.; GOMES, M. D.; CONAS, L.; CONEJERO, V.; VERA, P.** Characterisation of LRP, a leucine-rich repeat (LRR) protein from tomato plants that is processed during pathogenesis. **The plant journal**, 1996,10: 315-330,

**URBANEK, H. AND KACZMAREK, A.** Extracellular proteinases of the isolate *Botrytis cinerea* virulent to apple tissues. **Acta Biochim. Pol.** **32**, 1985, 101–109.

**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.

**WATSON, R. R.** Substrate specificities of aminopeptidases: a specific method for microbial differentiation. **Methods in Microbiology**, **9**, 1976. 1-14,

**WHITAKER, J. R.** Principles of enzymology for the food sciences; 2<sup>o</sup> ed, New York: **Marcel Dekker, Inc.**, 1994. 625p. Cap. Introduction to hydrolases, p. 387-389.

**WILLETS, H. J., J. A. L. WONG.** The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **Bot. Rev.** **46**, 1980, 101–165.

