

ANÁLISE *IN SILICO* DE GENES DE REPARO DE DNA NO PATÓGENO DE PLANTA: *ACIDOVORAX AVENAE*.

Caique de Medeiros SOUZA (1), Hugo Telles Bessa de FREITAS (2) Adriano Soares de CARVALHO (3), Fábio Teixeira DUARTE (4).

(1) Estudante do curso de Informática, 3º ano, IFRN, Campus Ipanguaçu, Base Física, Ipanguaçu/RN. E-mail: caiqueadrian@hotmail.com

(2) Estudante do curso de Informática, 2º ano, IFRN, Campus Ipanguaçu, Base Física, Ipanguaçu/RN. E-mail: hugo.telles@hotmail.com

(3) Professor de Biologia, IFRN, Campus Ipanguaçu, Base Física, Ipanguaçu/RN. E-mail: adriano.carvalho@ifrn.edu.br

(4) Professor-Orientador, IFRN, Campus Ipanguaçu, Base Física, Ipanguaçu/RN E-mail: fabio.duarte@ifrn.edu.br

RESUMO

A prática da fruticultura no Rio Grande do Norte é algo extremamente valioso, não só para a economia estadual como também em âmbito nacional devido ao fato de grande parte dela ser destinada à exportação. A região do Vale do Açu, rica em solos férteis e água, é o principal pólo de fruticultura do RN com ênfase maior na produção de banana, manga e melão, dentre outros. Destes o mais importantes é o cultivo de melão (*Cucumis melo*), que vem sendo atacado por alguns patógenos. A principal praga que ataca meloeiros é a bactéria *Acidovorax avenae*, uma espécie pertencente ao gênero *Acidovorax*, da família Comamonadaceae. Essa bactéria causa uma patologia em melões chamada mancha-aquosa e, consequentemente, a podridão do fruto, gerando prejuízos aos produtores na ordem de 60%. Buscando entender melhor esse patógeno, estudaremos os mecanismos de reparo de DNA. Esta se expõe a uma série de agentes que provocam lesões na molécula, as quais, não sendo removidas, podem levar a mutações ou à morte celular. Para se proteger dos efeitos das mutações, os organismos desenvolveram mecanismos eficientes de reparação do DNA. Visando a identificar os genes que compõem as vias de reparo de DNA em *A. avenae*, foi utilizado o pacote de programa do BLAST. Após a análise deste, foram identificadas três vias de reparo de DNA presentes em *A. avenae*, também foi possível observar que os genes de reparo de DNA apresentam-se bastante conservados.

Palavras-chave: *Acidovorax avenae*; mancha-aquosa, melão; reparo de DNA.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo do melão é considerado um bom negócio para vários produtores que se situam entre o semi-árido e parte do litoral nordestino, por apresentar bons rendimentos. No estado do Rio Grande do Norte, é amplamente realizado e extremamente importante no contexto desse agronegócio, pois exerce um papel fundamental para o Brasil, respondendo o Vale de Açu por 90% da exportação nacional. Um exemplo disso é que, segundo o MDIC, as exportações desse produto no nosso estado totalizaram, em 2008, cerca de US\$ 65 milhões, provando o quão é importante para o RN a cultura do melão. O cultivo contínuo do meloeiro tem possibilitado a ocorrência, em níveis epidêmicos, de doenças capazes de causar severos danos às plantas, aumentando, consequentemente, os custos econômicos e ecológicos da cultura (REGO, 1995; SANTOS *et al.*, 2000). A expansão da área cultivada no Nordeste brasileiro tem contribuído para o aumento de doenças fúngicas, como o míldio [*Pseudoperonospora cubensis* (BERK. e CURT.) ROSTOWZEW], o cancro-da-haste ou crestamento-gomoso-do-caule [*Didymella bryoniae* (AUERSW.) REHM] e o oídio [*Sphaerotheca fuliginea* (SCHLECHT, *et al.*) POLL.], que vêm afetando a cultura do melão na região (SANTOS *et al.*, 2004). A mancha-aquosa do meloeiro (*Cucumis melo* L.) é a principal doença bacteriana que vem ocorrendo nas lavouras de melão do Nordeste, sendo responsável por grandes perdas na

produção e na depreciação dos frutos no Rio Grande do Norte e do Ceará (SALES JÚNIOR e MENEZES, 2005).

A mancha-aquosa é causada pela bactéria *Acidovorax avenae*, uma β -proteobacteria da ordem Burkholderiales da família Comamonadaceae que habita no solo e pode ocorrer como fitopatógeno de Cucurbitáceas. Esse patógeno foi detectado inicialmente no Brasil, contaminando melancias e melões (OLIVEIRA *et al.*, 2003). A principal hipótese de como essa bactéria se desenvolveu no Brasil é de que houve a introdução de sementes já contaminadas (RANE e LATIN, 1992). Tal patógeno abrange proporções preocupantes em plantios de melão nos estados do Rio Grande do Norte (RN) e do Ceará (CE), maiores produtores do Nordeste e do Brasil, e causa, frequentemente, entre 40% e 50% de perdas. Em alguns frutos, as lesões aprofundavam-se na polpa e estendiam-se até as sementes.

O quadro de sintomas dessa doença nos frutos consiste em minúsculas lesões aquosas na sua epiderme (ou seja, na parte mais externa), provocando, em toda a superfície do fruto pequenas manchas aquosas com a aparência de uma catapora, o que explica o nome popular dado à doença. Essas manchas unem-se e fazem com que fruto apodreça completamente (VIANA, 2001).

Na parte aérea da planta, ocorrem sintomas semelhantes aos constatados nos frutos, cujas folhas ficam cobertas por pontos aquosos, como se tivessem sido marcadas por inúmeras picadas de agulha. Estes crescem tornando-se manchas aquosas, que rapidamente fundem-se e transformam-se em grandes manchas necróticas circulares. A doença tem causado sérios prejuízos aos produtores e comerciantes de melão, principalmente quando associada às condições climáticas favoráveis de alta umidade relativa do ar e temperaturas amenas (TAVARES, 2010).

Existem, ainda, poucos estudos disponíveis com essa bactéria. Porém, algumas medidas preventivas de controle podem ser sugeridas, a saber: evitar o plantio em períodos chuvosos; pulverizar sistematicamente com cúpricos nos períodos mais favoráveis ao desenvolvimento da doença; escolher adequadamente o sistema de irrigação, dando preferência àqueles que não produzem micro-clima favorável ao desenvolvimento e à disseminação da bactéria como a aspersão (é mais recomendável a irrigação por sulcos ou por gotejamento); evitar plantio sucessivo com cucurbitáceas; eliminar plantas invasoras dessa mesma família; utilizar cultivares resistentes como Pele de Sapo e Português (ASSIS *et al.*, 1999); e usar sementes sadias.

Para entendimento melhor do metabolismo desse patógeno, estudaremos os genes de reparo de DNA, uma vez que poucos são os trabalhos realizados sobre esses mecanismos em patógenos de plantas. A elucidação da maquinaria celular de proteção ao DNA desta bactéria deve ser bastante interessante, pois, devido à relação patógeno-hospedeiros, é possível que esse microrganismo tenha desenvolvido mecanismos eficientes para obter sucesso na infestação e no desenvolvimento do parasitismo.

1.1. Reparo de DNA

Embora a mutação seja uma das principais fontes para a evolução, a estabilidade do material genético também é fundamental para a continuação da vida. O DNA está exposto a uma série de agentes físicos, como luz ultravioleta (UV), e químicos, os quais provocam lesões nessa molécula. Caso não sejam removidas, as lesões podem levar a mutações ou à morte celular. Os organismos desenvolveram uma série de mecanismos capazes de remover lesões e, com isso, manter uma maior estabilidade do material genético. Existem mecanismos que fazem a reversão da lesão, como é o caso da enzima fotoliase, que desfaz dímeros de pirimidina na presença de luz. Outros mecanismos removem a lesão, independentemente da luz. O estudo do reparo de DNA no homem sempre esteve muito associado a doenças humanas (FRIEDBERG, 2003).

2. OBJETIVO

Identificar genes de reparo de DNA em *Acidovorax avenae* utilizando ferramentas de bioinformática disponíveis na rede mundial de computadores.

3. METODOLOGIA

Para análise *in silico*, foi utilizado o pacote de ferramenta do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), conjunto de programas desenvolvido para alinhar (hibridização virtual), com rapidez e eficiência, porções de sequências nucleotídicas e/ou peptídicas. O resultado representa somente os domínios funcionais ou mesmo seqüências inteiras a partir das disponíveis nos vários bancos de dados interligados ao BLAST. Esses programas conseguem alinhar regiões desejadas com o mínimo de redundância possível (ALTSCHUL *et al.*, 1997). As sequências submetidas ao BLAST via NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) voltam alinhadas com proteínas que apresentam o maior grau de similaridade com nossa sequência. Esse maior grau de similaridade é dado pelo *e-value*, que representa a probabilidade de o alinhamento ter acontecido ao acaso, cujo valor mínimo (o melhor) é 0,0. Isso significa que quanto menor o valor de *e-value* maior o grau de similaridade entre as duas sequências analisadas. Os parâmetros utilizados para calcular o valor de *e-value* encontram-se no manual do BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), disponível no site do NCBI. Para este trabalho, de busca dentro de todos os bancos interligados ao NCBI, consideramos a similaridade entre duas sequências como significativa aquela cujo valor de *e-value* é de, no mínimo, 1×10^{-10} e cuja identidade supera 60%. Dessa forma, as sequências que apresentavam tais feições foram caracterizadas como genes envolvidos em reparo de DNA. Às vezes, a similaridade pode indicar proximidade maior entre os genes, contribuindo para uma suposição de mesma função e direcionando outras investigações. Esta similaridade pode também inferir grau de parentesco.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE *IN SILICO*

O alinhamento do BLAST, além de conferir porcentagem de similaridade, permite obter informações quanto ao comportamento do alinhamento das proteínas identificadas em *A. avenae* com aquelas presentes nos bancos de dados, isto é, se o alinhamento era total ou apenas parcial e em que região ocorre. A figura 1 mostra um exemplo de alinhamento obtido pelo BLASTp para a sequência peptídica da Ada (metiltransferase e ativador transcricional). Na figura, a sequência da Ada de *A. avenae* é representada pela reta vermelha superior e os diferentes alinhamentos com sequência peptídica de outros organismos são apresentados abaixo. A cor vermelha indica alinhamento superior a 200 unidades de aminoácidos, o qual representa o melhor resultado possível.

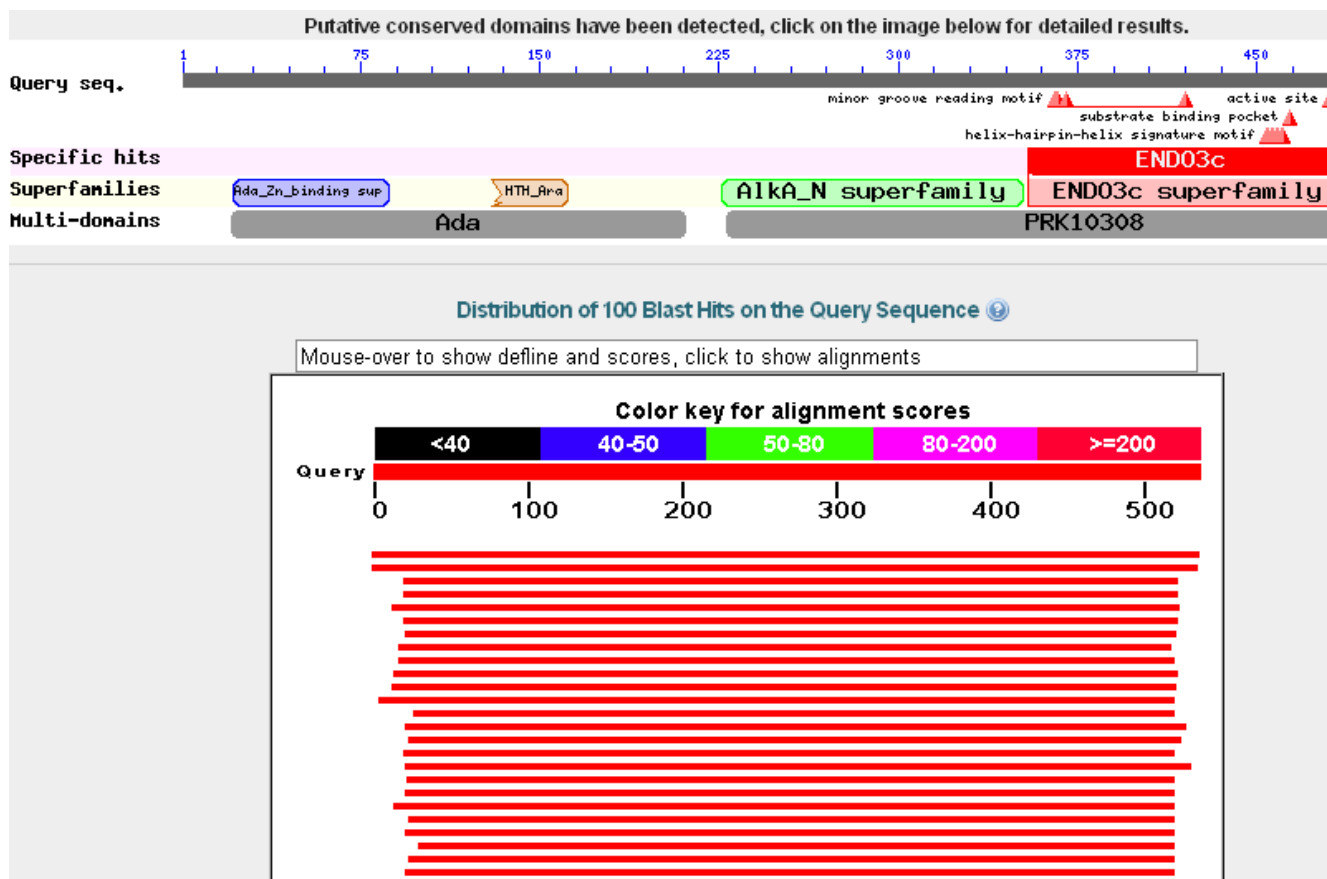


Figura 1 – Resultado BLASTp para proteína Ada.

A comparação de proteínas metiltransferases é complicada devido ao fato de existirem diferentes arranjos de domínios. Em *A. avenae*, a proteína Ada possui o domínio regulador Ada fusionado ao AlkA (Figura 1). Essa feição é semelhante à encontrada em bactérias Gram positivas (EISEN e HANAWALT, 1999).

As tabelas de identificação dos genes de reparo de DNA foram separadas por vias de reparo e mostram as similaridades e identidades obtidas entre as proteínas de reparo da *A. avenae* com as proteínas de outros organismos presentes nos bancos de dados. Por se tratar de genes bastante conservados, a maioria dos resultados do BLAST está relacionada com organismos muito próximos a *A. avenae*, dos quais quase todos pertencem ao mesmo gênero *Acidovorax*, como mostra a tabela 3. Todos os resultados desta apontam para o mesmo gênero e com resultado 0,0.

4.2. Reparo por reversão direta do dano

A tabela 1 apresenta as enzimas de *A. avenae* relacionadas com o mecanismo de reversão direta do dano. Essas enzimas são agrupadas em uma mesma via por apresentarem a capacidade de reparar lesões de DNA através de uma única reação. Diferentemente dos outros mecanismos de reparo de DNA, elas não compartilham a mesma cascata metabólica. Assim, cada enzima dessa via reage com substratos diferentes, bem como apresenta diferentes origens evolutivas (EISEN e HANAWALT, 1999). Nesta tabela, é possível observar a presença dos genes *ada*, *phr*, *ogt* e *alkB*; os valores para identidade superiores a 61; e de *e-value* de 8e-69.

Tabela 1 – Reparo por reversão direta do dano

Gene	Descrição da proteína	Melhor alvo	Similaridade <i>e-value</i>	Identidade
<i>Ada</i>	Ativador transcricional	<i>Acidovorax ebreus</i>	0	73,0%
<i>Phr</i>	Fotoliase	<i>Acidovorax delafieldii</i>	0	70,0%
<i>Ogt</i>	Metiltransferase de 6-O-metilguanina no DNA	<i>Acidovorax ebreus</i>	$3e^{-55}$	65,0%
<i>alkB</i>	2OG-Fe(II) oxigenase	<i>Variovorax paradoxus</i>	$8e^{-69}$	61,0%

Fotoliase é o nome dado para duas classes de proteínas: PhrI, encontrado em procarioto, e PhrII, em eucariotos. Essas enzimas atuam na fotorreativação, processo que utiliza luz visível para remoção de lesões no DNA do tipo dímeros de pirimidina, que são provocados pela radiação U.V. A presença de um gene que codifica a fotoliase no genoma de *A. avenae* sugere que essa bactéria apresenta uma atividade de fotorreativação, cuja ocorrência nesse microrganismo parece ser de relevante importância, pois, para sua adaptação e seu sucesso na infestação de outras plantas, ele deve passar pelos efeitos da radiação solar, diferentemente de outro patógeno de planta, como a *Xylella fastidiosa*, que perdeu esse gene recentemente. Segundo Simpson *et al* (2000), a *X. fastidiosa* sofre pouca exposição ao sol ou depende totalmente do reparo por excisão de nucleotídeos para reparação de lesões causadas por luz U.V.

Uma forma comum de dano ao DNA ocorre quando grupos alquil, metil e etil ligam-se covalentemente a ele. O reparo dessas lesões ocorre através da ação de enzimas metiltransferase (Ribeiro *et al*, 2003). Os genes que codificam essas enzimas são *ogt* e *ada*, os quais estão presentes em *A.avenae*, mostrando que possivelmente esse microrganismo possui atividade metiltransferase.

4.2. Reparo por excisão de bases

O reparo de DNA por excisão de bases envolve basicamente a ação de duas famílias de enzimas, as glicosilases e AP-endonuclease. As primeiras clivam a ligação glicosídica (entre a base específica danificada e a desoxirribose). As demais fazem subsequentemente uma excisão lateral ao sítio abásico. Em seguida, um único ou poucos nucleotídeos são adicionados pela DNA-polimerase usando uma fita não danificada como molde. Em *A. avenae*, enzimas pertencentes a essa via são apresentadas na tabela 2. É possível observar a existência de diferentes glicosilases e duas endonucleases. Um organismo que apresenta grande número de glicosilase, como é visto nesse patógeno, reflete a diversidade de lesões de bases capazes de serem reconhecidas e reparadas (EISEN e HANAWALT, 1999).

Tabela 2 – Reparo por excisão de bases

Gene	Descrição da proteína	Melhor alvo	<i>e-value</i>	Identidade
<i>ung</i> ou <i>udg</i>	Uracil-DNA glicosilase	<i>Acidovorax delafieldii</i>	$2e^{-104}$	82,0%
<i>fpg(mutM)</i>	Glicosilase de formamidopirimidini do DNA	<i>Acidovorax delafieldii</i> 2AN	$1e^{-90}$	67,0%
<i>Nei</i>	DNA glicosilase	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	$8e^{-74}$	60,0%
<i>mutY</i>	Glicosilase de adenina A/G-específica	<i>Delftia acidovorans</i>	$1e^{-133}$	70,0%
<i>Nth</i>	Endonuclease III	<i>Acidovorax delafieldii</i>	$4e^{-113}$	92,0%
<i>Tag</i>	DNA-3-metiladenine glicosilase I	<i>Acidovorax sp. JS42</i>	$3e^{-77}$	78,0%
<i>alkA</i>	3-metil-adenina DNA glicosilase II, enzima induzível.	<i>Acidovorax ebreus</i>	Gene fusionado a gene <i>ada</i> .	

4.3. Reparo por excisão de nucleotídeos

Os mecanismos bioquímicos para o sistema de reparo por excisão de nucleotídeos de procariotos e eucariotos são bastante similares, apresentando as mesmas reações em cascata, entretanto suas origens evolutivas são distintas, de acordo com Hanawalt (2001). As enzimas que participam desse processo em *A. avenae* estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 – Reparo por excisão de nucleotídeos

Gene	Descrição da proteína	Melhor alvo	<i>e-value</i>	Identidade
<i>Mdf</i>	Fator de acoplamento do reparo à transcrição	<i>Acidovorax delafieldii</i> 2AN	0.0	92%
<i>uvrA</i>	Subunidade A da enzima nuclease de excisão	<i>Acidovorax ebreus</i> TPSY	0.0	86,0%
<i>uvrB</i>	Subunidade B da enzima nuclease de excisão	<i>Acidovorax delafieldii</i> 2AN	0.0	87,0%
<i>uvrC</i>	Excinuclease, subunidade C	<i>Acidovorax delafieldii</i> 2AN	0.0	81,0%
<i>uvrD</i>	Helicase II e ATPase DNA dependente	<i>Acidovorax ebreus</i> TPSY	0.0	85,0%

Essa via de reparo em *E. coli* é formada por excinucleases UvrABC e helicases UvrD e Mfd. Em *A. avenae*, foi observada a presença de sequências homólogas para todas essas enzimas (tabela 3), com alto grau de conservação (*e-value* igual a zero e identidade superior a 81%), entre os procariotos analisados. A alta conservação destes genes também é relatada por Eisen e Hanawalt (1999).

CONCLUSÃO

Com relação aos genes de reparo de DNA até agora identificados no genoma de *A. avenae*, pode-se dizer que não há grandes diferenças daqueles presentes em *E.coli* (organismo procarioto modelo). Os resultados sugerem que tais mecanismos de reparo de DNA estão presentes e possivelmente ativos em *A. avenae* e que deve ser bastante importante para sua infestação e sobrevivência em seu ambiente, uma vez que se mostrou muito conservado.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, 1997.

ASSIS, S.M.P., MARIANO, R.L.R., SILVA-HANLIN, D.M.W. & DUARTE, V. Mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, no Estado do Rio Grande do Norte. **Fitopatologia Brasileira** 24:191. 1999.

EISEN, J.A e HANAWALT, P.C., A phylogenomic study of DNA repair genes, protein and processes. **Mutat Res**, 1999.

FRIEDBERG, E.C. DNA damage and repair. **Nature**, 2003.

HANAWALT P.C, Controlling the efficiency of excision repair. **Mutat Res**, 2001

OLIVEIRA, I.S. de; SALES JUNIOR, R. e MARIANO, R.L.R. Ocorrência da mancha-aquosa causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, em melão-pepino no Brasil. **Fitopatol. bras.** [online], 2003.

RANE, K.K. e LATIN, R.X. Bacterial fruit blotch of watermelon: Association of the pathogen with seed. **Plant Disease**. 1992.

REGO, A.M. Doenças causadas por fungos em cucurbitáceas. **Informe Agropecuário**, 1995.

RIBEIRO, LR, *et al.* **Mutagenese ambiental**. 1 ed. Canoá: Editora Ulbra, 2003.

SALES JÚNIOR, R., OLIVEIRA, I.S., MARIANO, R.L.R., SILVA, G.F. e NUNES, G.H.S. Efeito de kasugamicina e oxicloreto de cobre no controle da mancha-aquosa do meloeiro. **Fitopatologia Brasileira** 30:295-298. 2005.

SANTOS, A.A., FREIRE, F.C.O., LIMA, J.A.A. e CARDOSO, J.E. Doenças do meloeiro em áreas irrigadas no Estado do Ceará. Fortaleza. **Embrapa Agroindústria Tropical. Boletim de Pesquisa**, 35. 2000.

SANTOS, A.A, CRISÓSTOMO, J.R, e CARDOSO J.W, Avaliação de híbridos de melão quanto às principais doenças nos Estados do Ceará e Rio Grande do Norte, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** n. 16, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004.

SIMPSON AJ, *et al*, The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. **Nature**. 2000.

VIANA, F.M.P *et al*, Recomendações para o Controle das Principais Doenças que Afetam a Cultura do Melão na Região Nordeste Fortaleza, CE. **Circular técnica 12**. Fortaleza: Editora EMBRPA, 2001.

TAVARES, S.H. **Melão direto pra o lixo**, Disponível em: <<http://www.grupocultivar.com.br/artigos/artigo.asp?id=456>> acesso em: 20 mar. 2010.