



**MARIA CLARA CARLI**

**ANÁLISE DE GENES PGs E PGIPs ASSOCIADOS ÀS  
INTERAÇÕES PLANTA-PATÓGENO**

**LAVRAS – MG  
2025**

**MARIA CLARA CARLI**

**ANÁLISE DE GENES PGs E PGIPs ASSOCIADOS ÀS INTERAÇÕES PLANTA-  
PATÓGENO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2025**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração  
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com  
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Carli, Maria Clara.

Análise de genes PGs e PGIPs associados às interações planta-patógeno : Analysis of PGs and PGIPs genes associated with plant-pathogen interactions / Maria Clara Carli. - 2025.

100 p. : il.

Orientador: Welison Andrade Pereira

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2025.

Bibliografia.

1. Proteína. 2. Phaseolus vulgaris. 3. Bioinformática. 4. Sclerotinia sclerotiorum.  
I. Andrade Pereira, Welison. II. Universidade Federal de Lavras. III. Título.

**MARIA CLARA CARLI**

**ANÁLISE DE GENES PGs E PGIPs ASSOCIADOS ÀS INTERAÇÕES PLANTA-  
PATÓGENO**

**ANALYSIS OF PGs AND PGIPs GENES ASSOCIATED WITH PLANT-PATHOGEN  
INTERACTIONS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas para obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 09/04/2025.  
Dra. Elaine Aparecida Souza, UFLA  
Dr. Luciano Vilela Paiva, UFLA  
Dr. Rafael Oliveira Moreira, Biólogo  
Dr. Renan Terassi Pinto, Agroceres

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2025**

## AGRADEDIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por absolutamente tudo, e ao meu anjo Gabriel.

Agradeço o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos, assim como às demais agências de fomento pelo financiamento concedido, que contribuiu para a realização deste projeto.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e ao Departamento de Biologia, que me proporcionaram um excelente ambiente de pesquisa e formação.

Agradeço ao meu orientador, Welison, pelas ideias, pelo apoio, pela orientação nos projetos da tese e pela boa convivência.

Agradeço a todos os professores com quem tive aula, pela dedicação ao ensino e pelos conhecimentos transmitidos, em especial ao professor Luciano e à professora Elaine, que sempre me receberam muito cordialmente, ajudaram a solucionar minhas dúvidas e abriram as portas de seus laboratórios para minha pesquisa.

Da mesma forma, agradeço aos técnicos dos laboratórios do DBI, Rafael e Miller, pelo auxílio nos experimentos, pela disposição em ajudar e pelos momentos de descontração. E aos queridos Fabrício, Ricardo e Heliete, pelo suporte no laboratório do LCBM, pelos ensinamentos e pela excelente convivência.

Agradeço, mais que tudo, aos meus amados Cacau e Bola, meus bichinhos inseparáveis e indispensáveis em todos os momentos, que sempre me encheram de amor, companheirismo e felicidade. Sem eles, eu não teria tido tantas forças para chegar até aqui.

Meus agradecimentos mais que especiais a Ana Beatriz, Renan, Tallyta e Tácia, pelos valiosos ensinamentos de biologia molecular e pela gentil contribuição nos meus ensaios. Vocês foram responsáveis por muito do que sei hoje sobre um laboratório de biomol.

Sou muito grata à Laís e à Yasmin, pessoas fundamentais nos meus experimentos, pelo carinho e pela amizade, assim como aos colegas Nil e Gabriel! E também a todos colegas e funcionários do DBI que estiveram presentes e contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

Agradeço imensamente ao Leo Oliveira e ao Luis Carlos, por me ajudarem com as análises estatísticas.

Agradeço a Graciela, Macarena, Marlice, Débora, Rodrigo Boldi, Paulinha e Everton por estarem comigo nessa caminhada há décadas, sempre apoiando meus sonhos, me dando forças nos momentos difíceis, quando nem eu mesma acreditava em mim, e me ajudando a

voltar ao foco. Vocês comemoraram comigo cada conquista, grande ou pequena, e torceram por cada passo meu. Sem vocês, eu não teria chegado onde cheguei, e, com certeza, este título também é de vocês.

Agradeço a amizade, companheirismo, risadas, choros, dancinhas, festas, comes e bebes e por todos os momentos inenarráveis vividos com a Ana, a Gi, a Carol, a Táci, a Palominha e a Sammy.

Minha gratidão também às amigas que fiz morando junto, e das quais tenho muita saudade da convivência e levarei essa amizade e carinho para a vida: Juliana, Anna Carolina e Abihail, e ao amigo Luis. Nossos momentos juntos sempre ficarão marcados pelos cafés, risadas, choros, doces, e muita discussão científica!

Meu eterno agradecimento à minha mamãe Maria, ao meu papai Fábio e ao meu irmão Bruno. Obrigada por acreditarem em mim, incentivarem meus sonhos e por estarem sempre comigo, incondicionalmente. Amo muito vocês.

*“Sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só,  
Sonho que se sonha junto é realidade”*

Raul Seixas

## RESUMO GERAL

As poligalacturonases (PGs) são enzimas secretadas por fungos fitopatogênicos que degradam a parede celular vegetal, facilitando a colonização dos tecidos e a progressão da infecção. Como resposta, as plantas produzem proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs), que inibem a ação das PGs, dificultando a invasão e aumentando a resistência contra patógenos. Com o intuito de compreender melhor o complexo de interação entre PGIPs e PGs, assim como os mecanismos de defesa vegetal, o presente trabalho foi realizado em três etapas. Inicialmente, foram caracterizadas 39 PGIPs de 30 espécies vegetais quanto à filogenia, propriedades proteicas, localização subcelular, domínios e motivos conservados, estrutura gênica e cis-elementos. Os resultados evidenciaram a distribuição das PGIPs de acordo com a taxonomia das espécies, sua predominância no ambiente extracelular, a presença de três domínios conservados, a ausência ou presença de poucos íntrons e a abundância dos cis-elementos TATA-box e CAAT-box. Essas informações contribuem para o entendimento do papel das PGIPs na defesa vegetal. A segunda etapa consistiu na avaliação da eficácia dos genes PvuPGIP1 e PvuPGIP2, do feijão, na inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* em tabaco, por meio da transformação genética transiente mediada por *Agrobacterium*. Os resultados demonstraram um efeito de defesa significativo desses genes nos três primeiros dias após a inoculação, reforçando o potencial das PGIPs no controle de fitopatógenos. Por fim, foram caracterizadas 115 PGs fúngicas da família GH28. As proteínas foram classificadas em cinco grupos filogenéticos, e suas propriedades proteicas, localização subcelular e motivos conservados foram analisados. Os resultados evidenciaram a presença de quatro principais motivos conservados e contribuíram para o entendimento da interação entre PGs e PGIPs, fornecendo subsídios para futuras pesquisas relacionadas ao controle de doenças em plantas.

**Palavras-chave:** proteína; *Phaseolus vulgaris*; bioinformática; *Sclerotinia Sclerotiorum*.

## ABSTRACT

Polygalacturonases (PGs) are enzymes secreted by phytopathogenic fungi that degrade the plant cell wall, facilitating tissue colonization and the progression of infection. In response, plants produce polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs), which inhibit PG activity, hindering invasion and increasing resistance against pathogens. In order to gain a deeper understanding of the complex interaction between PGIPs and PGs, as well as plant defense mechanisms, the present study was conducted in three stages. Initially, 39 PGIPs from 30 plant species were characterized with respect to phylogeny, protein properties, subcellular localization, conserved domains and motifs, gene structure, and cis-elements. The results revealed the distribution of PGIPs according to species taxonomy, their predominance in the extracellular environment, the presence of three conserved domains, the absence or presence of few introns, and the abundance of the TATA-box and CAAT-box cis-elements. These findings contribute to understanding the role of PGIPs in plant defense. The second stage involved evaluating the effectiveness of the bean genes PvuPGIP1 and PvuPGIP2 in inhibiting *Sclerotinia sclerotiorum* in tobacco through *Agrobacterium*-mediated transient genetic transformation. The results demonstrated a significant defensive effect of these genes during the first three days after inoculation, reinforcing the potential of PGIPs in controlling phytopathogens. Finally, 115 fungal PGs from the GH28 family were characterized. The proteins were classified into five phylogenetic groups, and their protein properties, subcellular localization, and conserved motifs were analyzed. The results revealed the presence of four main conserved motifs and contributed to understanding the interaction between PGs and PGIPs, providing a foundation for future research related to plant disease control.

**Keywords:** protein; *Phaseolus vulgaris*; bioinformatics; *Sclerotinia sclerotiorum*.

## INDICADORES DE IMPACTO

O presente estudo investigou a caracterização genômica e funcional de 39 inibidores de poligalacturonases (PGIPs) de 30 espécies vegetais, com ênfase na interação com poligalacturonases fúngicas (PGs) de patógenos de importância agrícola. Os resultados obtidos têm impactos potenciais no desenvolvimento de cultivares mais resistentes a doenças, especialmente ao mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, que compromete a produtividade de culturas como feijão e soja. Assim, o estudo contribui para a sustentabilidade da produção agrícola, promovendo estratégias biotecnológicas de controle de fitopatógenos. Os impactos tecnológicos desse estudo incluem a ampliação do conhecimento sobre a interação PGIP-PG, permitindo o desenvolvimento de ferramentas moleculares para seleção e manipulação gênica visando ao melhoramento vegetal. Além disso, os achados têm aplicação na formulação de estratégias inovadoras de resistência a doenças, o que pode reduzir a necessidade do uso de fungicidas, minimizando impactos ambientais e custos de produção para agricultores. Em termos sociais e econômicos, a adoção de cultivares resistentes pode beneficiar agricultores de diversas regiões ao reduzir perdas na produção, aumentando a segurança alimentar e proporcionando maior estabilidade econômica para pequenos e médios produtores. A pesquisa também fortalece a formação acadêmica e científica, envolvendo docentes, estudantes de pós-graduação e técnicos na geração de conhecimento aplicado. No âmbito extensionista, a pesquisa está alinhada à área temática "Tecnologia e Produção" da Política Nacional de Extensão, pois favorece a inovação na proteção de culturas agrícolas e tem potencial de transferência de conhecimento para instituições de pesquisa, cooperativas e empresas do setor agropecuário. Ademais, os impactos ambientais do estudo podem ser vinculados aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, especialmente ao ODS 1 (Erradicação da Pobreza), ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável), ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis) e ODS 13 (Ação contra a Mudança Global do Clima). A redução das perdas agrícolas pode contribuir para a estabilidade econômica dos pequenos produtores, enquanto a diminuição do uso de fungicidas auxilia na mitigação dos impactos ambientais. Dessa forma, este trabalho apresenta impacto científico e tecnológico significativo, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias de controle de patógenos em plantas e fortalecendo a interação entre pesquisa acadêmica e soluções aplicadas ao setor agrícola.

## IMPACT INDICATORS

The present study investigated the genomic and functional characterization of 39 polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) from 30 plant species, with emphasis on the interaction with fungal polygalacturonases (PGs) from pathogens of agricultural importance. The results obtained have potential impacts on the development of cultivars more resistant to diseases, especially white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, which compromises the productivity of crops such as beans and soybeans. Thus, the study contributes to the sustainability of agricultural production, promoting biotechnological strategies for the control of phytopathogens. The technological impacts of this study include the expansion of knowledge on the PGIP–PG interaction, enabling the development of molecular tools for genetic selection and manipulation aimed at plant breeding. In addition, the findings have applications in the formulation of innovative disease resistance strategies, which can reduce the need for fungicide use, minimizing environmental impacts and production costs for farmers. In social and economic terms, the adoption of resistant cultivars can benefit farmers from various regions by reducing production losses, increasing food security, and providing greater economic stability for small and medium-sized producers. The research also strengthens academic and scientific training, involving professors, graduate students, and technicians in the generation of applied knowledge. In the extension scope, the research is aligned with the thematic area “Technology and Production” of the National Extension Policy, as it fosters innovation in the protection of agricultural crops and has potential for knowledge transfer to research institutions, cooperatives, and companies in the agricultural sector. Furthermore, the environmental impacts of the study can be linked to the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs), especially SDG 1 (No Poverty), SDG 2 (Zero Hunger and Sustainable Agriculture), SDG 12 (Responsible Consumption and Production), and SDG 13 (Climate Action). The reduction of agricultural losses can contribute to the economic stability of small producers, while the decrease in fungicide use helps mitigate environmental impacts. Thus, this work presents significant scientific and technological impact, providing support for the development of strategies for pathogen control in plants and strengthening the interaction between academic research and applied solutions in the agricultural sector.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>11</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
	<b>SEGUNDA PARTE .....</b>	<b>13</b>
	<b>ARTIGO 1 - Análise de genes PGIPs associados à resistência das plantas a</b>	
	<b>doenças .....</b>	<b>14</b>
	<b>ARTIGO 2 - Expressão transiente dos genes PvuPGIP1 e PvuPGIP2 em</b>	
	<b><i>Nicotiana benthamiana</i> na resistência ao mofo branco .....</b>	<b>48</b>
	<b>ARTIGO 3 - Análise genômica ampla de poligalacturonases gh28 em fungos</b>	
	<b>fitopatogênicos .....</b>	<b>64</b>
	<b>TERCEIRA PARTE.....</b>	<b>95</b>
<b>2</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>95</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>99</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

As proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs) desempenham um papel crucial na defesa vegetal ao inibir as enzimas poligalacturonases (PGs) produzidas por fitopatógenos e insetos. Essas enzimas degradam a parede celular vegetal durante a infecção, facilitando a colonização do hospedeiro (Murmu *et al.*, 2025). A importância dos PGIPs tem sido demonstrada em diversas culturas, como feijão e *Brassica napus* (Borras-Hidalgo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2021).

Durante a patogênese, as paredes celulares são as primeiras barreiras que os fungos encontram no processo de colonização do tecido vegetal, e na obtenção de nutrientes (Di *et al.*, 2006). Para vencer essa barreira, os fungos secretam um conjunto de enzimas hidrolíticas, como as poligalacturonases, que desestruturam a parede celular e permite o início da infecção (Powell *et al.*, 2000). Desse modo, as poligalacturonases são as primeiras enzimas secretadas pelos fungos e estas facilitam a ação de outras enzimas que também contribuem na degradação celular (Di *et al.*, 2006; Jones; Anderson; Albersheim, 1972).

As poligalacturonases (PGs) hidrolisam as ligações  $\alpha$ -(1→4) entre resíduos de ácido D-galacturônico no homogalacturonano que compõe a parede celular, resultando em sua degradação. Porém, a atuação das PGIPs produzidas pelas plantas, bloqueia as PGs e dificulta o progresso da infecção pelo patógeno, aumentando assim a resistência vegetal (Acharya *et al.*, 2024).

Diante de conhecimentos detalhados do complexo PG-PGIP, conhecer como ocorre sua interação e os mecanismos de reconhecimento entre os patógenos e os hospedeiros, contribuem para o entendimento da resistência de plantas, da sua imunidade contra doenças e enfatizam a importância dos PGIPs na defesa vegetal (Murmu *et al.*, 2025).

A utilização da transgenia, através da superexpressão dos genes PGIPs em diferentes culturas, vem sendo mostrada quanto a diminuição dos danos causadas por patógenos, principalmente os necrotróficos, já que estes frequentemente apresentam múltiplas PGs em seus genomas (Amselem *et al.*, 2011). PGIPs superexpressados em tomate, tabaco (*Nicotiana tabacum*) e *Arabidopsis thaliana* diminuíram as infecções causadas por *Botrytis cinerea* (Powell *et al.*, 2000; Joubert *et al.*, 2007; Manfredini *et al.*, 2005). Em trigo transformado com PvuPGIP2, a resistência média foi aumentada de 46 a 50% aos fungos *Fusarium verticillioides* e *Bipolaris sorokiniana* (Janni *et al.*, 2008).

Frente ao exposto, este trabalho investiga a família gênica PGIP em diferentes espécies vegetais, analisando sua diversidade genética, variações funcionais das proteínas e organização genômica. Utilizando abordagens bioinformáticas e ferramentas de predição online, análise das informações coletadas fornecem uma compreensão mais ampla dos mecanismos que controlam a expressão dos PGIPs e sua relação com a defesa vegetal.

Além disso, a interação entre PGIPs de feijão (*Phaseolus vulgaris*), superexpressos em tabaco (*Nicotiana benthamiana*), e PGs do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* foi avaliada em relação ao nível de resistência conferido pelas PGIPs no desenvolvimento da doença.

Paralelamente, foi realizada uma análise abrangente das poligalacturonases da família GH28 em fungos fitopatogênicos, visando identificar e caracterizar essas enzimas em nível genômico e estrutural. A caracterização de 115 proteínas analisadas *in silico* possibilita compreender os padrões evolutivos dessas enzimas, suas regiões funcionais e as potenciais interações com PGIPs vegetais, contribuindo para o entendimento dos mecanismos envolvidos na degradação da parede celular das plantas e nas estratégias de resistência mediadas pelos PGIPs.

**SEGUNDA PARTE**

<b>Artigo 1 - Elaborado conforme a norma NBR 6022</b>	
Título do artigo:	Análise de genes PGIPs associados à resistência das plantas a doenças
Autores:	Maria Clara Carli Yasmin Maciel Meireles Costa Welison Andrade Pereira



## ARTIGO 1 - Análise de genes PGIPs associados à resistência das plantas a doenças

### ARTICLE 1 - Analysis of PGIPs genes associated with plant disease resistance <sup>1</sup>

**Maria Clara Carli**  
**Yasmin Maciel Meireles Costa**

**Resumo:** As proteínas inibidoras de poligalacturonase (PGIPs) são proteínas vegetais pertencentes à família dos repetições ricas em leucina (LRR), que inibem as poligalacturonases (PGs) secretadas por fitopatógenos durante a infecção dos tecidos vegetais. As PGs degradam a parede celular e liberam fragmentos de oligogalacturonídeos (OGs), que se acumulam no ambiente extracelular e sinalizam à planta a necessidade de produzir PGIPs, prevenindo, assim, a infecção e a colonização. Esse mecanismo de defesa é essencial para o aumento da resistência das plantas a doenças, tornando os PGIPs um tema de interesse no melhoramento vegetal. Neste estudo, foi realizada uma análise genômica abrangente para caracterizar genes e proteínas PGIP em 30 espécies vegetais. As sequências de aminoácidos e nucleotídicas, bem como as regiões de CDS, foram obtidas a partir dos bancos de dados Phytozome e NCBI. As sequências foram alinhadas, e uma árvore filogenética foi construída para avaliar a homologia, utilizando o PGIP de *Ceratodon purpureus* como grupo externo. O estudo identificou três domínios funcionais conservados LRRNT\_2, LRR\_4 e LRR\_8 e revelou que os PGIPs estão predominantemente localizados no espaço extracelular, com exceção de alguns que foram preditos como intracelulares (mitocôndria ou núcleo). Quanto à estrutura gênica, apenas seis PGIPs possuem íntrons. Além disso, foram identificados 90 elementos cis-regulatórios (CREs), sendo os mais frequentes a TATA-box (32,44%), a CAAT-box (24,20%) e a AT~TATA-box (3,71%). Esses achados contribuem para um entendimento mais aprofundado dos PGIPs e de seus papéis nos mecanismos de defesa das plantas.

**Palavras-chave:** proteína inibidora da poligalacturonase; repetições ricas em leucinas; interação planta-patógeno; filogenia.

**Abstract:** Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) are plant proteins belonging to the leucine-rich repeat (LRR) family, which inhibit polygalacturonases (PGs) secreted by phytopathogens during plant tissue infection. PGs degrade the cell wall and release oligogalacturonide (OG) fragments, which accumulate in the extracellular environment and signal the plant to produce PGIPs, thereby preventing infection and colonization. This defense mechanism is essential for enhancing plant disease resistance, making PGIPs a relevant topic in plant breeding. In this study, a comprehensive genomic analysis was conducted to characterize PGIP genes and proteins in 30 plant species. Amino acid and nucleotide sequences, as well as coding sequence (CDS) regions, were retrieved from the Phytozome and NCBI

---

<sup>1</sup> Artigo científico apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

databases. The sequences were aligned, and a phylogenetic tree was constructed to assess homology, using the PGIP from *Ceratodon purpureus* as an outgroup. The study identified three conserved functional domains LRRNT\_2, LRR\_4, and LRR\_8 and revealed that PGIPs are predominantly located in the extracellular space, except for a few predicted to be intracellular (mitochondria or nucleus). Regarding gene structure, only six PGIPs contain introns. Additionally, 90 cis-regulatory elements (CREs) were identified, with the most frequent being the TATA-box (32.44%), the CAAT-box (24.20%), and the AT~TATA-box (3.71%). These findings contribute to a deeper understanding of PGIPs and their roles in plant defense mechanisms.

**Keywords:** polygalacturonase-inhibiting protein; leucine-rich repeats; plant-pathogen interaction; phylogeny.

## 1 INTRODUÇÃO

Proteínas inibidoras de poligalacturonase (PGIP - Polygalacturonase-inhibiting proteins) são glicoproteínas extracelulares localizadas nas paredes celulares de diversas plantas (Cervone, 1997). Pertencentes à família de proteínas ricas em repetições de leucina (LRR), as PGIPs são caracterizadas pela presença de 10 repetições em tandem imperfeitas, cada uma composta por 24 resíduos de aminoácidos na sequência LxxLxxLxxLxLSxNxGxIPxx, com variações entre diferentes espécies (Di Matteo, *et al.*, 2006; Rathinam *et al.*, 2020). Embora a quantidade de domínios LRR nas proteínas possa variar, essa quantidade é comparável à encontrada em outras proteínas relacionadas à resistência de plantas (Marone *et al.*, 2013; Di Matteo *et al.*, 2003).

Do ponto de vista estrutural, as PGIPs são constituídas por domínios centrais de LRR, ladeados por uma região N-terminal e uma região C-terminal ricas em cisteínas, formando duas folhas  $\beta$  (Caprari *et al.*, 1996). A folha  $\beta 1$  apresenta uma forma côncava que contém, em sua superfície, os resíduos responsáveis pelo reconhecimento e pela interação proteína-proteína da própria molécula de PGIP com sinais hormonais e substâncias indutoras derivadas de patógenos, como a endopoligalacturonase secretada por fungos (D'Ovidio *et al.*, 2004; Helft *et al.*, 2011; Kalunke *et al.*, 2015; Marone *et al.*, 2013; Di Matteo *et al.*, 2003, 2006). Essa região côncava é altamente conservada em diferentes PGIPs (Matsaunyane; Oelofse; Dubery, 2015) e está associada à integridade estrutural da molécula (Di Matteo *et al.*, 2003). A especificidade dessa região permite que a PGIP diferencie entre a poligalacturonase fúngica (exógena) e a PG própria da planta (endógena) (Federici *et al.*, 2001).

A produção e liberação de PGIP pela planta ocorrem como resposta de defesa ao ataque de fungos fitopatogênicos (De Lorenzo, *et al.*, 2001), bactérias (De Lorenzo e Ferrari, 2002), nematoides (Jaubert *et al.*, 2002) ou alguns insetos (Boyd Jr, 2003; Girard e Jouanin, 1999; Wheeler, 2001). Os fungos utilizam as PGs para degradar a parede celular da planta, que é a principal barreira encontrada em seu processo de infecção (De Lorenzo *et al.*, 2001; De Lorenzo e Cervone, 1997; Vorwerk *et al.*, 2004). Quando a parede celular entra em contato com a PG, formam-se fragmentos de oligogalacturonídeos (OG) que, ao se acumularem no tecido vegetal, desencadeiam processos bioquímicos, como a liberação de PGIPs, que atuam na defesa da planta contra a infecção do patógeno (Cervone, 1997; De Lorenzo *et al.*, 2001; Janni *et al.*, 2006; Pascholati e Dalio, 2018; Ridley *et al.*, 2001).

Estudos *in vitro* indicam que a endopoligalacturonase é uma das primeiras enzimas secretadas por fungos, desenvolvidas próximas à parede celular (Jones e Jones, 1997;

Mankarios e Friend, 1980). Ademais, a endo-PG causa a degradação e morte das células vegetais (De Lorenzo e Cervone, 1997). Diversos tipos de PGIPs podem ocorrer na mesma planta, atuando na inibição de vários tipos de PGs (D'Ovidio *et al.*, 2004). Na diversificação de genes parálogos, associada a diferentes modos de regulação, foram geradas redundância funcional e subfuncionalização, ou seja, funções distintas no reconhecimento das poligalacturonases (PGs) de fungos e das produzidas por insetos fitófagos (D'Ovidio *et al.*, 2004). Em feijões, foi relatado que os genes parálogos PvPGIP1/PvPGIP2 apresentam maior eficiência no controle de doenças quando comparados aos parálogos PvPGIP3/PvPGIP4, que são fracos inibidores das PGs fúngicas, mas mais eficientes no controle de insetos (D'Ovidio *et al.*, 2004).

O nível de expressão da proteína PGIP é proporcional à sua capacidade de prevenir o surgimento de doenças nas plantas (Cheng *et al.*, 2021). Em testes *in vitro*, Liu *et al.* (2017) observaram que a GhPGIP1, purificada do algodoeiro, inibiu a PG1 de *Verticillium dahliae* e a PG1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* com valores de IC50 de 44,37 e 50,13 µg/mL, respectivamente. O IC50 (concentração inibitória média) é um parâmetro quantitativo que representa a concentração de um composto necessária para inibir 50% de uma atividade biológica específica *in vitro*. Observou-se que, em baixas concentrações de GhPGIP1, não houve inibição das PGs fúngicas. À medida que a concentração da proteína aumentou gradativamente, ocorreu uma inibição direta e significativa das PGs. Em plantas transgênicas com superexpressão de GhPGIP1 em *Arabidopsis*, os mesmos autores observaram um aumento significativo na inibição da infecção causada por esses fungos, corroborando os testes *in vitro*.

Em outro estudo, foi observado que a PGIP de pera, quando superexpressa em tomate transgênico, inibe ou, ao menos, retarda o desenvolvimento das lesões causadas por *Botrytis cinerea* tanto em folhas quanto em frutos (Powell *et al.*, 2000). Esse patógeno também apresenta sintomas significativamente reduzidos quando os genes AtPGIP1 e AtPGIP2 são superexpressos em *Arabidopsis* (Ferrari *et al.*, 2003). Corroborando esses estudos, Bashi *et al.* (2013) avaliaram a interação entre BnPGIP (*Brassica napus*) e SsPG (*Sclerotinia sclerotiorum*), tanto *in vitro* quanto em plantas transgênicas de *A. thaliana*. *In vitro*, BnPGIP1 inibiu a atividade enzimática da SsPG6. No experimento com duas linhagens de *A. thaliana*, uma transformada com BnPGIP1 e a outra com BnPGIP2, ambas apresentaram eficiência na redução da necrose causada pela infiltração de SsPG3 e SsPG6. No entanto, a BnPGIP2 não apresentou sinais de necrose ou clorose na área de infiltração, enquanto a BnPGIP1 reduziu os sintomas. Pela superexpressão da PGIP do arroz (OsPGIP2) em *Brassica napus*, houve um aumento nos mecanismos de defesa da planta, elevando sua resistência a *S. sclerotiorum* (Wang *et al.*, 2018).

As PGIPs são reconhecidas como agentes ativos na proteção das plantas contra patógenos. Diversos estudos sobre a ação dessas proteínas na degradação das PGs fúngicas foram descritos (Di Matteo *et al.*, 2006; Morales-Quintana *et al.*, 2023; Vasconcellos, 2017; Wang *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2022). Contudo, os genes que codificam PGIPs com papéis comprovados na inibição das PGs fúngicas em plantas, juntamente com as respectivas proteínas codificadas, ainda não foram plenamente caracterizados ou analisados de forma abrangente.

Considerando a literatura existente e o potencial significativo das PGIPs em restringir a colonização fúngica, os achados deste estudo podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias inovadoras e eficazes de detecção, interceptação e controle de fitopatógenos em diversas culturas.

Neste estudo, foi realizada uma análise genômica de PGIPs de 31 espécies de plantas, adotando como critério o seu papel na defesa das plantas contra patógenos. Um total de 39 proteínas foi analisado quanto às suas características genéticas, proteicas e filogenéticas, fornecendo informações significativas para a compreensão de como essas proteínas atuam no sistema de defesa das plantas contra patógenos.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Identificação das PGIPs e suas sequências

A etapa inicial desta pesquisa das PGIPs baseou-se em uma revisão da literatura, na qual foram analisados os resultados da atuação eficiente das PGs fúngicas em interação com as PGIPs. Foram recuperadas doze sequências do Phytozome v13 (<http://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) (Goodstein *et al.*, 2012) e 27 do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Adicionalmente, foi selecionada a PGIP de *Ceratodon purpureus*, espécie da família Ditrichaceae das Briófitas, como grupo externo para a análise filogenética. Dos bancos de dados, foram recuperadas as sequências de aminoácidos, transcritos, CDS e fragmentos de 2.000 nucleotídeos localizados a montante do sítio de início da transcrição (TSS).

### 2.2 Análise filogenética

Com o auxílio do algoritmo MUSCLE, disponível no software MEGA11 (<http://www.megasoftware.net>), as 39 sequências de aminoácidos foram alinhadas. Em seguida,

uma árvore filogenética foi construída, utilizando o método Neighbor-Joining (NJ), com um bootstrap de 1000 repetições, utilizando o modelo JTT (Jones-Taylor-Thornton).

### 2.3 Propriedades das proteínas

As PGIPs foram analisadas individualmente quanto às suas propriedades bioquímicas. O número de aminoácidos, o peso molecular e o ponto isoelétrico foram calculados utilizando a ferramenta ExPasy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al.*, 2005). A composição centesimal aproximada foi calculada utilizando o Microsoft Excel. Com os valores de frequência percentual de cada aminoácido, foi construído um HeatMap utilizando o software TBtools (Chen *et al.*, 2020) para ilustrar a distribuição e a frequência dos aminoácidos em cada PGIP.

### 2.4 Localização subcelular

Para prever a localização subcelular das PGIPs, foi utilizada a ferramenta CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (Yu *et al.*, 2006) e, para ilustrar as previsões obtidas, o software TBtools (Chen *et al.*, 2020). A previsão da presença de domínios transmembrana nas proteínas foi realizada por meio das ferramentas online PROTTER (<https://wlab.ethz.ch/protter/start/>) (Omasits *et al.*, 2014), TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (Möller; Croning; Apweiler, 2001), CCTOP (<https://cctop.ttk.hu/>), TOPCONS (<https://topcons.cbr.su.se/>) (Tsirigos *et al.*, 2015) e SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) (Almagro Armenteros *et al.*, 2019). Para confirmar a presença de um domínio transmembrana, considerou-se necessária a concordância de, pelo menos, três dessas ferramentas.

### 2.5 Análise de domínios e motivos conservados

A presença de domínios proteicos foi investigada utilizando o software on line CDD-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) (Lu *et al.*, 2020), com um E-value de 0,01. Para a identificação dos motivos conservados, foi utilizada a ferramenta MEME Suite – Multiple Em for Motif Elicitation (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) (Bailey *et al.*, 2015). Para a busca, foi utilizada a configuração padrão do programa, com o número máximo de motivos definido em 15, variando de 6 a 50 resíduos de aminoácidos de

comprimento. Tanto os domínios quanto os motivos proteicos foram ilustrados com a ferramenta BioSequence Structure do TBtools.

## 2.6 Estrutura genética

A organização dos éxons e íntrons na estrutura dos genes PGIP foi visualizada utilizando o software Gene Structure Display Server – GSDS 2.0 (<https://gsds.gao-lab.org/>) (Hu *et al.*, 2015), tendo como base as sequências CDS e dos genes, obtidas a partir dos bancos de dados Phytozome v13 e NCBI.

## 2.7 Elementos cis-regulatórios (CREs)

Para identificação dos elementos cis-regulatórios presentes nas Regiões Promotoras Putativas (PPR), inicialmente foram recuperadas dos bancos de dados Phytozome v13, NCBI e do GRD (Genome Database for Rosaceae) (Jung *et al.*, 2019), as sequências de 2.000 nucleotídeos situadas a montante do sítio de início da transcrição (TSS). Em seguida, utilizou-se a ferramenta PlantCare, disponível em <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/> (Lescot, 2002). A partir da identificação dos CREs, eles foram classificados de acordo com a literatura entre as seguintes categorias: responsivos a estresses abióticos (ASR); responsivos a estresses bióticos (BSR); core; responsivos ao desenvolvimento (DR); responsivos a hormônios (HR); responsivos à luz (LR) e não nomeados (Unnamed). Para a construção das imagens, foram utilizados recursos do software TBtools.

# 3 RESULTADOS

## 3.1 Identificação das PGIPs e suas sequências

Foram identificadas na literatura 39 PGIPs de 30 espécies com atuação predita ou confirmada em resposta a patógenos específicos (Tabela S1.1). A partir dos bancos de dados, foram recuperadas as suas sequências gênicas, codificantes (CDS), de aminoácidos e regiões genômicas a montante do sítio de início da transcrição (2.000 pb) (Tabelas S.1–S1.5). O nome atribuído a cada PGIP resultou da combinação entre a primeira letra do gênero, duas letras do epíteto específico, o termo PGIP e uma numeração sequencial, conforme o modelo: AthPGIP1.

### 3.2 Construção da árvore filogenética

Para compreender a relação evolutiva entre as PGIPs das diferentes espécies, foi construída uma árvore filogenética a partir do alinhamento das sequências completas de aminoácidos. Nesta árvore, foi possível observar a formação de grupos, que foram classificados de acordo com a classificação botânica das espécies, com base no Angiosperm Phylogeny Group IV (APG IV) (Cole; Hilger; Carvalho, 2016) (Figura 1.1).

Considerando o grupo externo, 12 famílias botânicas foram incluídas neste estudo. De modo geral, as proteínas das famílias Myrtaceae, Rosaceae e Moraceae apresentaram alta homologia entre si. De acordo com os resultados, as PGIPs das famílias Fabaceae e Poaceae permaneceram separadas das demais. Nessa mesma escala, PGIPs das famílias Rutaceae, Vitaceae, e Malvaceae se agruparam em clados específicos, seguindo uma divisão consistente com a observada entre os grupos taxonômicos. Por outro lado, as três PGIPs de *Capsicum annuum*, CanPGIP1, CanPGIP2 e CanPGIP3, não se agruparam no mesmo clado.

Entre elas, CanPGIP3 demonstra apresentar homologia maior com SlyPGIP1 e StoPGIP1 do que propriamente com CanPGIP1 e CanPGIP2. É plausível admitir que PGIPs de espécies diferentes, posicionadas num mesmo clado, possam desempenhar funções semelhantes.

### 3.3 Propriedades das proteínas

As análises mostraram que o comprimento das PGIPs em número de aminoácidos variou entre 265 (CanPGIP1) e 346 (CpuPGIP1), com média de 329, enquanto o peso molecular foi de 29,86 (CanPGIP1) a 39,93 kDa (CanPGIP2), com uma média de 36,31 kDa. Já o ponto isoelétrico, característica importante para a identificação das proteínas por técnicas de proteômica, variou entre 5,85 (PcoPGIP1) a 9,32 (CanPGIP1), com valor médio de 7,89 (Tabela S1.6). Quanto à composição percentual aproximada, a leucina foi o aminoácido mais comum, seguida pela serina (Figura 1.2) (Tabela S1.7).

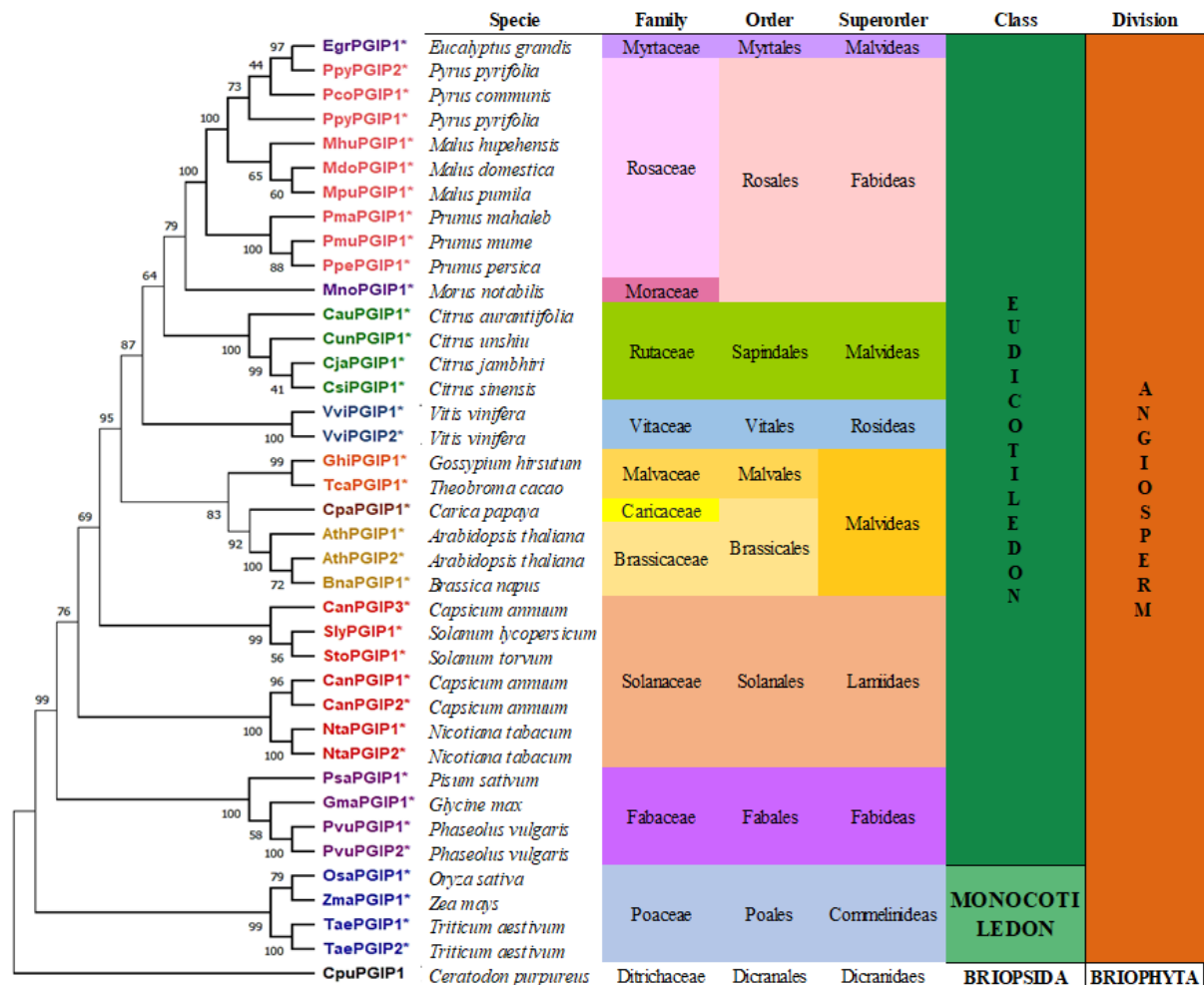
### 3.4 Localização subcelular

A predição da localização subcelular das PGIPs realizada com o suporte da ferramenta CELLO (Yu *et al.*, 2006) indicou que a maioria das PGIPs (92,31%), atua no espaço

extracelular. Curiosamente, NtaPGIP1 e NtaPGIP2 apresentaram sinais de localização nas mitocôndrias, enquanto PpePGIP1 foi prevista para o núcleo (Figura 1.3) (Tabela S1.8).

De acordo com a predição do CELLO, CanPIGP3 e CanPIGP1 estão localizadas no meio extracelular. No entanto, as ferramentas PROTTER, DEEPTMHMM, TOPCONS, CCTOP e SignalP indicam que essas proteínas não possuem peptídeo sinal (Tabela S1.9).

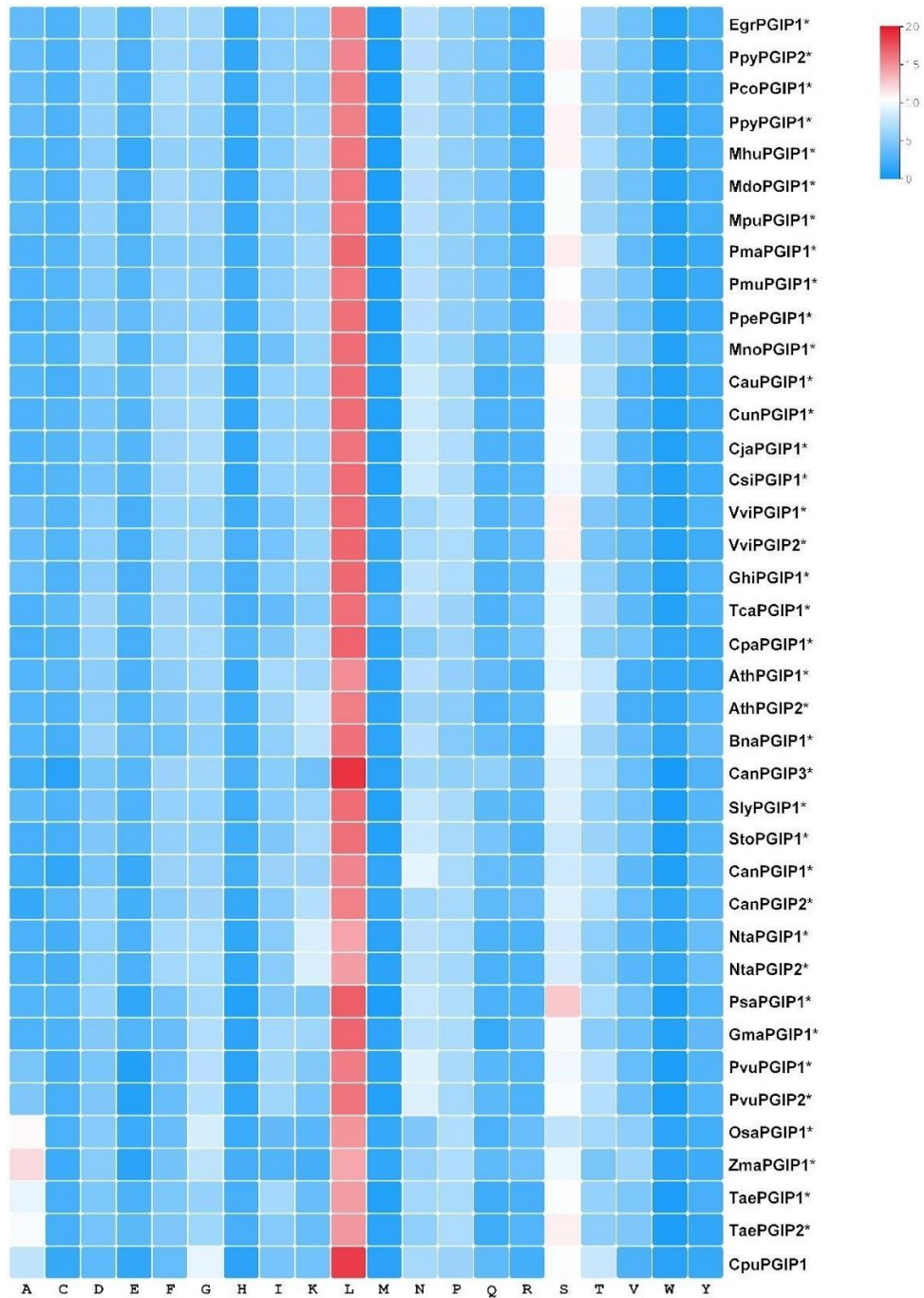
Figura 1.1 —Árvore filogenética e classificação botânica com base no Angiosperm Phylogeny Group IV (APG IV) (Cole *et al.*, 2016)



Legenda: A maioria das plantas avaliadas pertence à classe Eudicotiledoneae. As famílias Rosaceae, Solanaceae, Fabaceae e Poaceae foram bem caracterizadas e distinguidas na árvore.

Fonte: Da autora (2025).

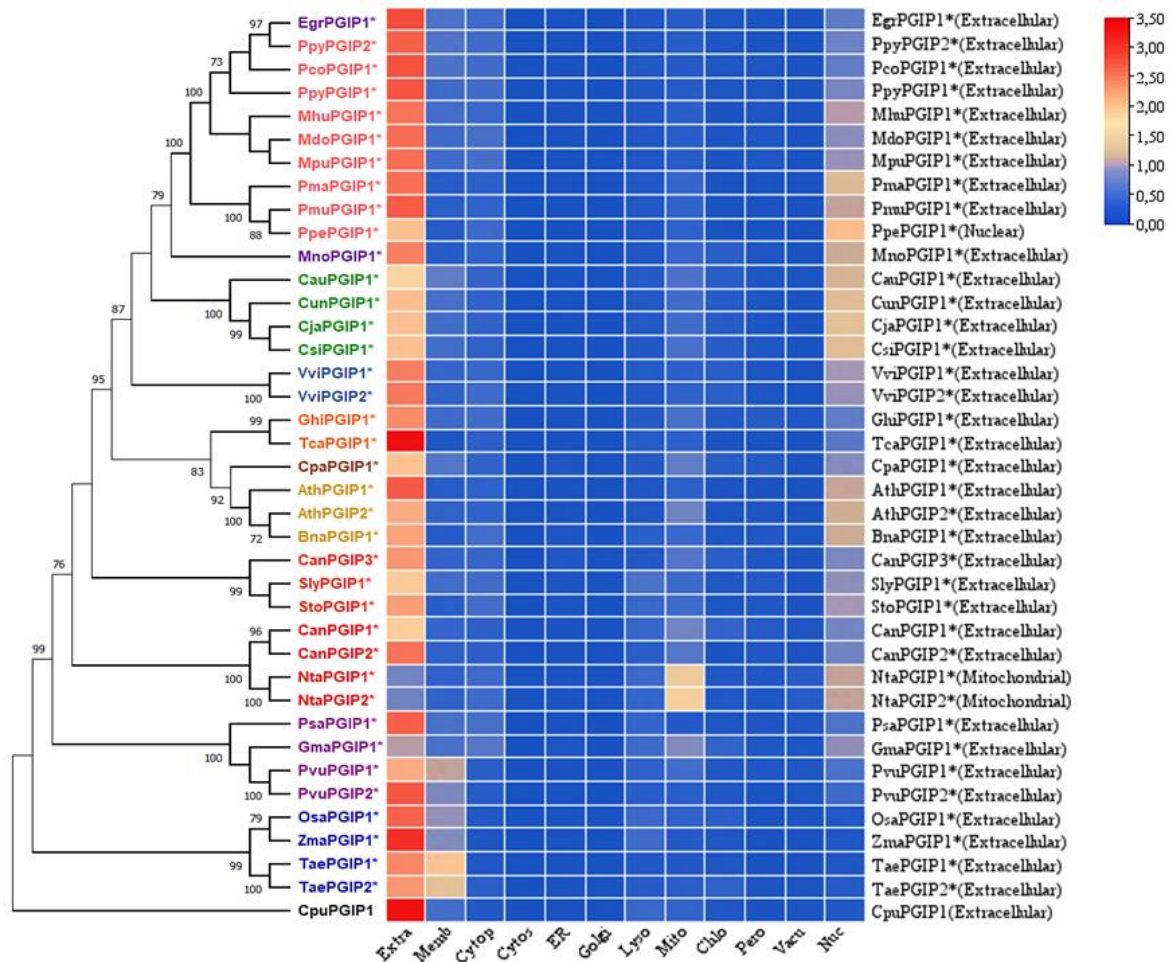
Figura 1.2 — Composição centesimal de aminoácidos das PGIPs



Legenda: A leucina (L) é o principal aminoácido presente nas proteínas, representada pela cor avermelhada.

Fonte: Da autora (2025).

Figura 1.3 — Predição da localização subcelular das proteínas PGIPs



Legenda: As proteínas PGIP ocorreram predominantemente na região extracelular das plantas, indicadas pelas cores vermelhas. Quanto maior o tom de vermelho, maior a probabilidade da localização.

Fonte: Da autora (2025).

### 3.5 Domínios estruturais e motivos conservados

As PGIPs analisadas neste estudo apresentam os domínios funcionais LRRNT\_2, LRR\_4 e LRR\_8, distribuídos em diferentes frequências e combinações. O domínio LRRNT\_2 foi identificado em 87,12% das sequências, enquanto 94,87% delas possuíam o domínio LRR\_8. Em contraste, o domínio LRR\_4 foi detectado em apenas 20,51% dos casos, sempre em conjunto com o LRR\_8. Destaca-se que as proteínas AthPGIP2 e PvuPGIP1 contêm exclusivamente o domínio LRRNT\_2, enquanto as PGIPs da família Solanaceae – CanPGIP1, CanPGIP3, NtaPGIP1 e NtaPGIP2 – apresentam somente o domínio LRR\_8 (Figura 1.4).

Para identificar motivos enriquecidos estruturalmente nas PGIPs, utilizou-se o algoritmo MEME (Bailey *et al.*, 2015), que detectou 15 motivos com comprimentos variando de 6 a 50 resíduos de aminoácidos. Na composição desses motivos, a leucina foi o aminoácido

mais frequente (16,10%), seguida pela serina (10%), asparagina (7,25%) e glicina (6,4%), enquanto o triptofano foi o menos comum (0,97%). O motivo 5 destacou-se por estar presente em todas as proteínas, e os motivos 2 e 4 também foram encontrados em praticamente todas as PGIPs, exceto na proteína do grupo externo. Outros motivos abundantes foram o motivo 6, presente em 94,87% das sequências, e os motivos 1 e 3, encontrados em 92,31% das proteínas. Em contraste, os motivos 13 e 15 foram os menos frequentes, aparecendo em apenas 3 proteínas (7,69%) (Figura 1.5).

Observou-se que o motivo 6, quase universal entre as proteínas, não foi detectado em CpuPGIP1 e OsaPGIP1. Além disso, as proteínas da família Rutaceae compartilham o motivo 12, o qual aparece apenas em uma proteína de outra família, a Malvaceae (GhiPGIP1). O motivo 15, por sua vez, é exclusivo de algumas proteínas de Solanaceae e não ocorre em outras famílias. Com exceção de OsaPGIP1, TaePGIP1 e TaePGIP2 (da família Poaceae), todas as proteínas terminam com o motivo 1; esses três casos específicos encerram com o motivo 13, exclusivo para eles (Figura 1.5).

Outras particularidades incluem a conservação do motivo 9 entre as famílias Myrtaceae, Rosaceae e Moraceae, e a exclusividade do motivo 11 nas PGIPs das famílias Brassicaceae e Fabaceae. No grupo externo, foram identificados três motivos – 1, 5 e 8 – repetidos duas vezes cada.

Em termos de composição, identificaram-se padrões conservados em certos motivos. Por exemplo, o motivo 2 é predominantemente composto por leucinas (L), organizadas em seis resíduos conservados nas posições 5, 8, 11, 30, 33 e 36, além de apresentar duas glicinas altamente conservadas (G) nas posições 21 e 45, uma prolina (P) na posição 48 e uma fenilalanina (F) na posição 50. Já o motivo 4 exibe uma conservação maior em posições específicas, especialmente para os aminoácidos leucina, glicina e asparagina, embora as posições 15, 19 e 44 apresentem baixa conservação, sugerindo variações nos resíduos ali presentes. No motivo 5, constatou-se uma elevada frequência de leucina em diversas posições, acompanhada por duas glicinas conservadas (nas posições 19 e 43), duas prolinas (nas posições 22 e 46) e uma asparagina (na posição 39) (Figura 1.6).

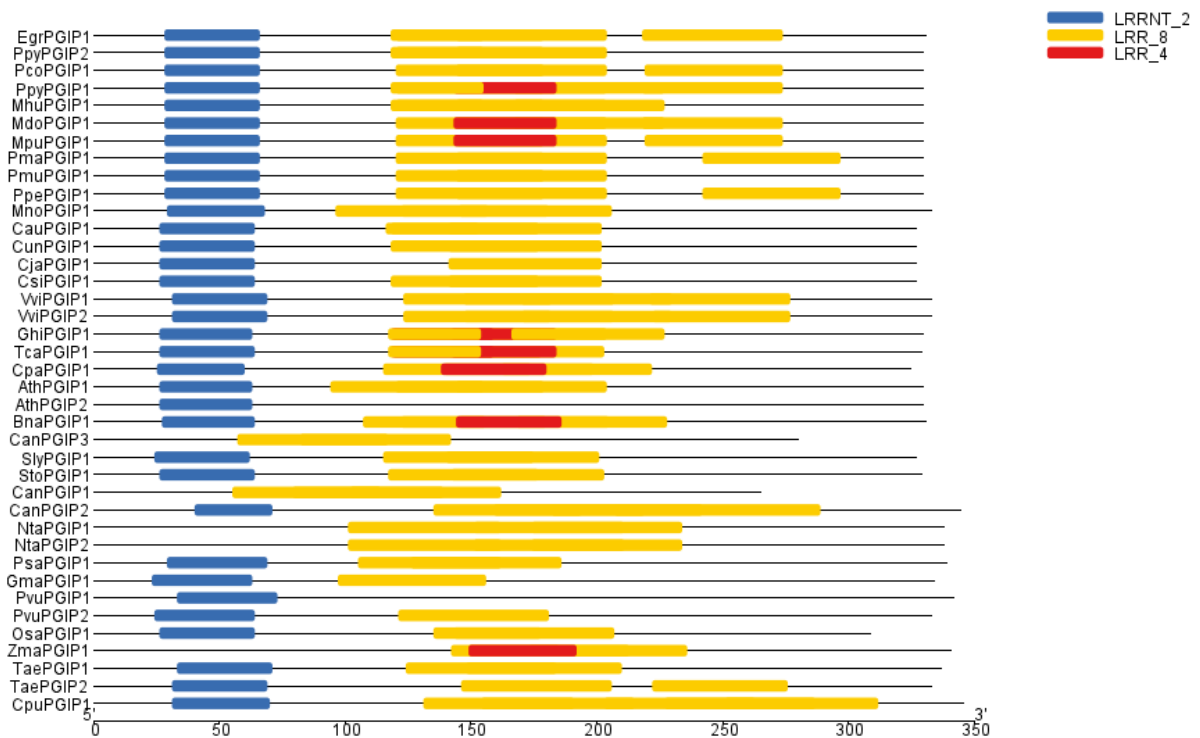
Esses resultados se complementam, evidenciando que a composição dos domínios LRR e a abundância de leucina nos motivos estruturais estão intimamente relacionadas à função das PGIPs. Embora haja considerável similaridade entre as proteínas, também foi observada certa variabilidade. De fato, não se encontrou uma configuração uniforme de domínios ou motivos estruturais, o que pode refletir as histórias evolutivas específicas de cada proteína. Notou-se, inclusive, que proteínas de espécies distintas podem compartilhar alta identidade de sequência,

enquanto PGIPs da mesma espécie podem ocupar clados diferentes, sugerindo possíveis especificidades funcionais em grupos ou até mesmo em proteínas individuais deste estudo.

### 3.6 Estrutura gênica

Para explorar possíveis relações estruturais entre as sequências gênicas, analisamos a composição de éxons e íntrons dos genes que codificam as PGIPs. A partir da imagem gerada com o recurso online GSDS (Figura 1.7), constatou-se que 33 genes não possuem íntrons, cinco genes contêm um único íntron e apenas um gene apresenta dois íntrons, este último, referente à proteína utilizada como grupo externo. De maneira geral, diferentemente das variações observadas na composição dos motivos estruturais e domínios proteicos em diferentes grupos taxonômicos, há evidências de uma conservação mais elevada na estrutura gênica das PGIPs entre as espécies.

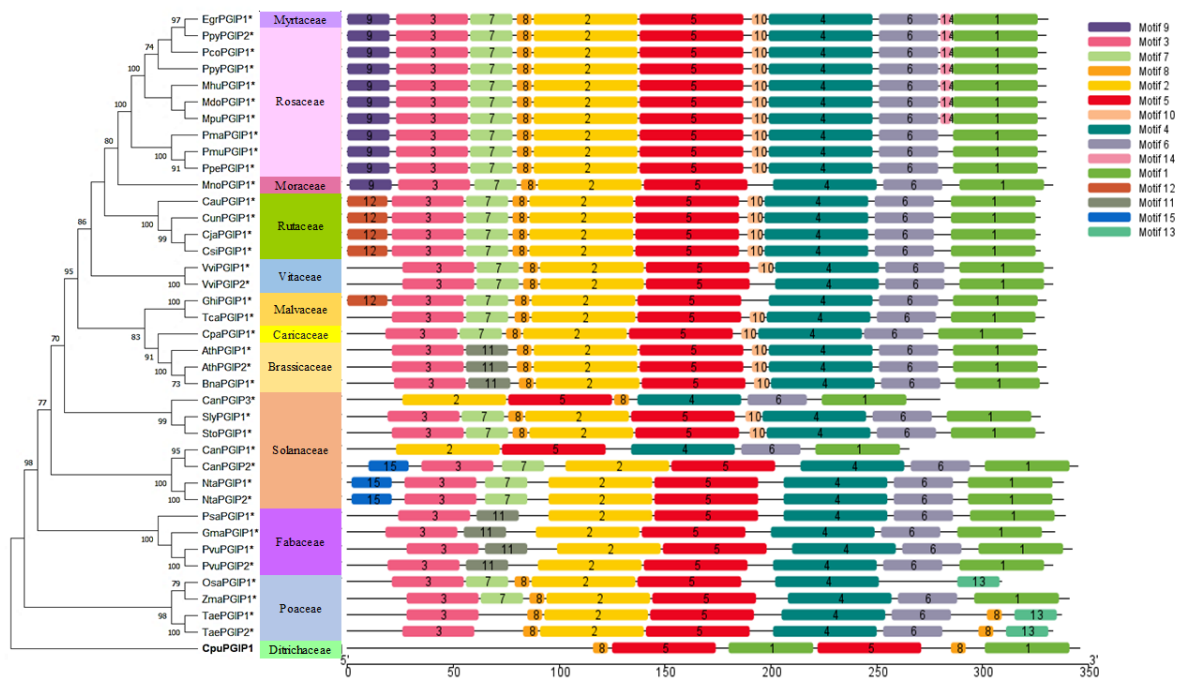
Figura 1.4 — Predição dos domínios conservados das proteínas PGIPs



Legenda: O domínio principal é o LRR\_8, que está representado em 94,87% das proteínas.

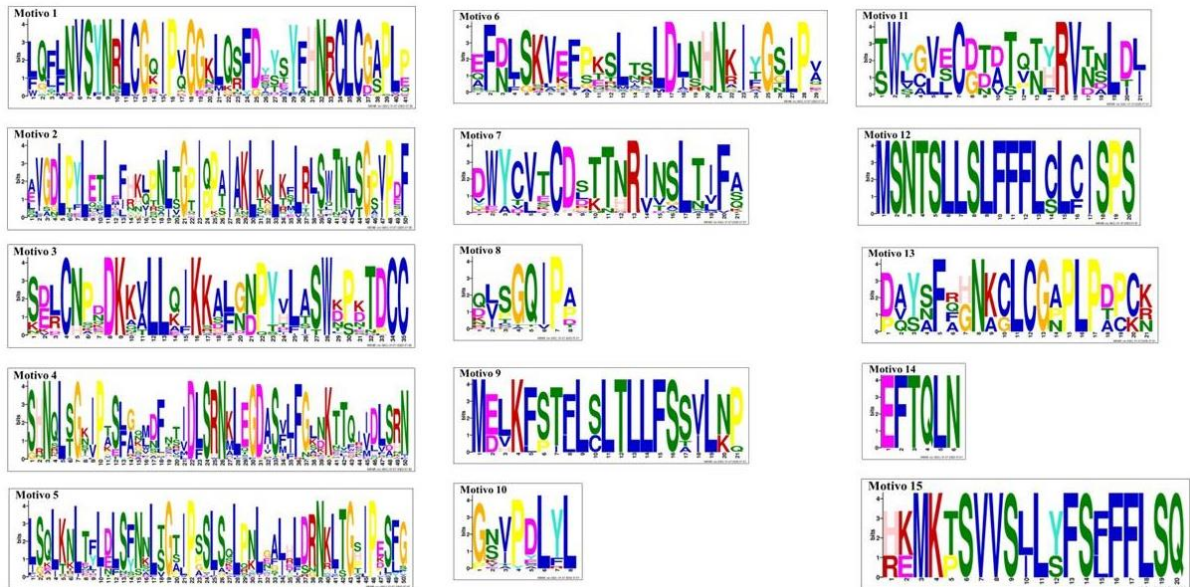
Fonte: Da autora (2025).

Figura 1.5 — Árvore filogenética das proteínas PGIPs e predição de seus respectivos motivos conservados



Legenda: O motivo 5 está presente em todas as proteínas avaliadas, seguido pelos motivos 2 e 4.  
 Fonte: Da autora (2025).

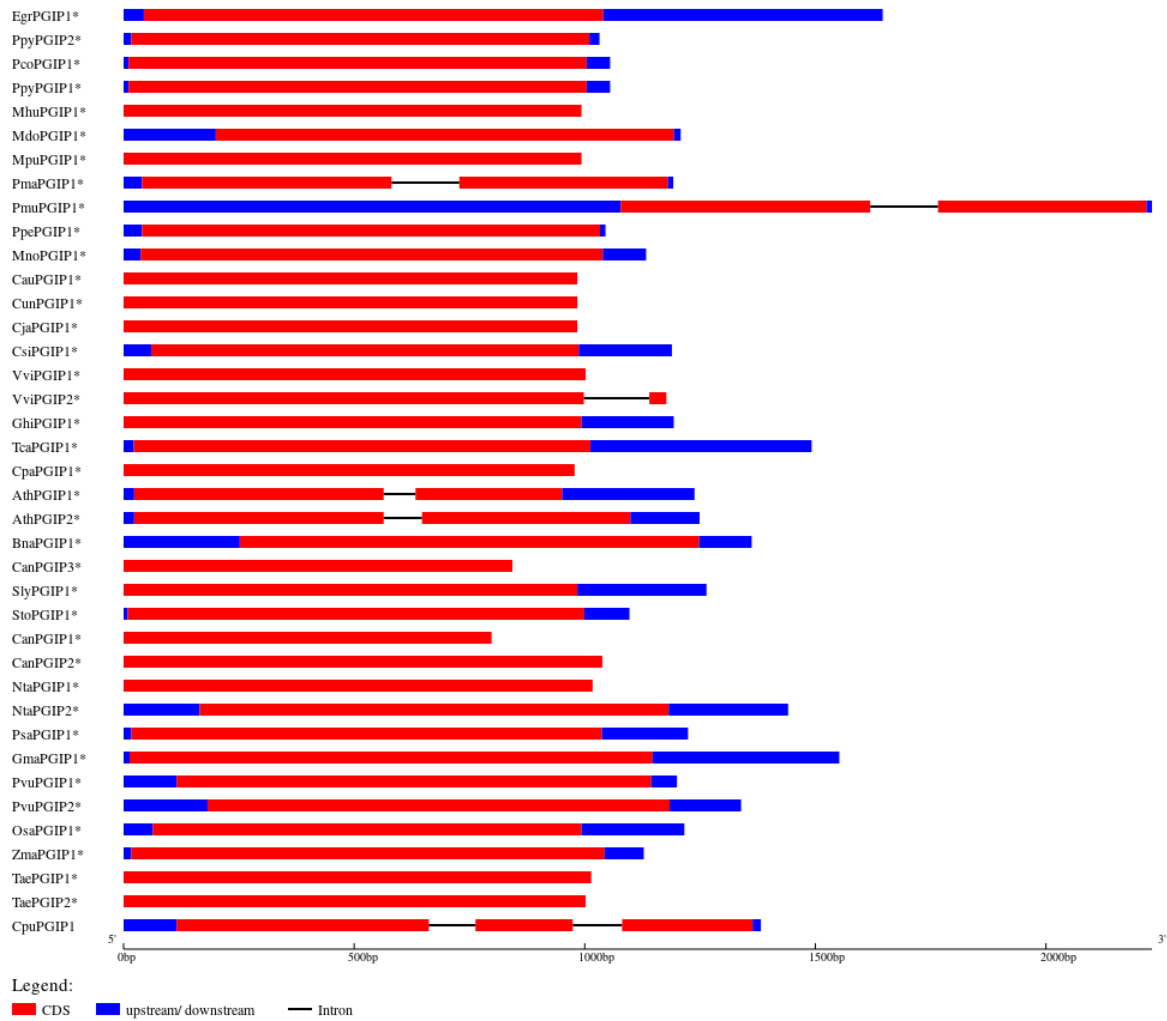
Figura 1.6 — Logotipos dos motivos conservados de PGIPs



Legenda: Cada gráfico representa um motivo conservado relacionado à proteína PGIP, gerado pelo software MEME Suite. Os gráficos ilustram a conservação de aminoácidos em diferentes posições do motivo correspondente; quanto maior a letra, mais conservado é o aminoácido na referida posição. O eixo X indica as posições dos aminoácidos dentro do motivo, enquanto o eixo Y mostra a quantidade de informação conservada em cada posição, medida em bits.

Fonte: Da autora (2025).

Figura 1.7 — Estrutura dos genes PGIPs



Legenda: Análise da estrutura gênica representando íntrons (—), sequência codificadora (vermelho) e regiões não traduzidas 5' e 3' UTR (azuis). As estruturas gênicas foram analisadas pelo GSDS.

Fonte: Da autora (2025).

### 3.7 Análise de cis-elementos (CREs)

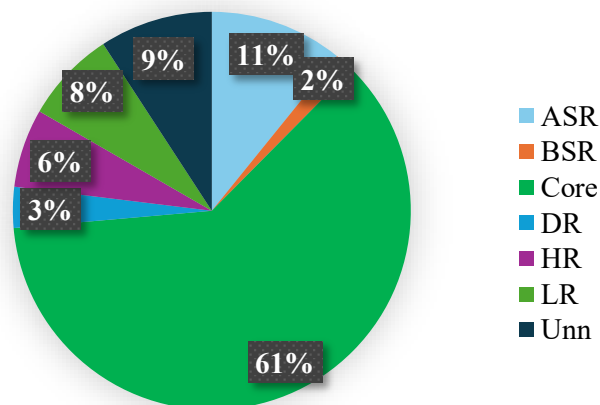
Foram analisadas as regiões promotoras putativas (PPRs) de 29 dos 39 genes selecionados quanto à composição de elementos cis-regulatórios (CREs) (Figura 1.8). Para isso, extraiu-se 2 kb a montante do sítio de início da transcrição (TSS) dos genes (Tabela S1.5). Segundo o PlantCARE, foram identificados 4.396 CREs, distribuídos em 90 tipos diferentes e organizados em 7 categorias: i) ASR (Resposta a Estresse Abiótico); ii) BSR (Resposta a Estresse Biótico); iii) Core (Elementos do Promotor Central); iv) DR (Relacionado ao Desenvolvimento); v) HR (Responsivo a Hormônios); vi) LR (Responsivo à Luz) e vii) Unn (Sem Nome) (Tabela S1.10).

Dentre essas categorias, o grupo Core apresentou o maior número de CREs (2.690), enquanto a categoria BSR foi a menos representada, com apenas 70 elementos (Gráfico 1.1).

Destacam-se, portanto, a forte presença dos elementos do grupo Core, que evidencia o favorecimento da formação da maquinaria de transcrição em todas as PPRs, bem como as categorias ASR, DR e LR, que também se mostram quantitativamente relevantes. É importante notar, contudo, que o número de CREs varia consideravelmente entre as categorias, desde 5 elementos para BSR até 22 para LR, sugerindo a necessidade de ajustes para uma análise mais equilibrada (Tabela S10).

Entre os elementos individuais, o TATA-box foi o CRE mais abundante (32,44%), seguido pelo CAAT-box (24,2%), Unnamed\_\_4 (7,67%) e AT~TATA-box (3,71%). Estes CREs são, em sua maioria, classificados como elementos centrais de transcrição (Core) (Srivastava *et al.*, 2023), com exceção do Unnamed\_\_4. Além disso, os cis-elementos MYC (2,98%), MYB (2,39%) e ARE (0,82%) também se destacaram, todos pertencentes à categoria ASR. Em particular, os elementos MYC e MYB respondem a estímulos como seca, salinidade e baixas temperaturas (Abe *et al.*, 1997; He *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2023; Su *et al.*, 2017), enquanto o ARE desempenha um papel crucial na indução anaeróbica (Lescot, 2002). Por sua vez, os elementos Box 4 (1,98%) e G-box (1,52%) estão associados à resposta à luz (LR), e os elementos ABRE (1,32%) e ERE (1%) são classificados como responsivos a hormônios (HR), sendo ativados pelo ácido abscísico, etileno e outros estresses abióticos (He *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2017). Em conjunto, esses elementos correspondem a 80,03% de todos os CREs detectados (Tabela S1.10).

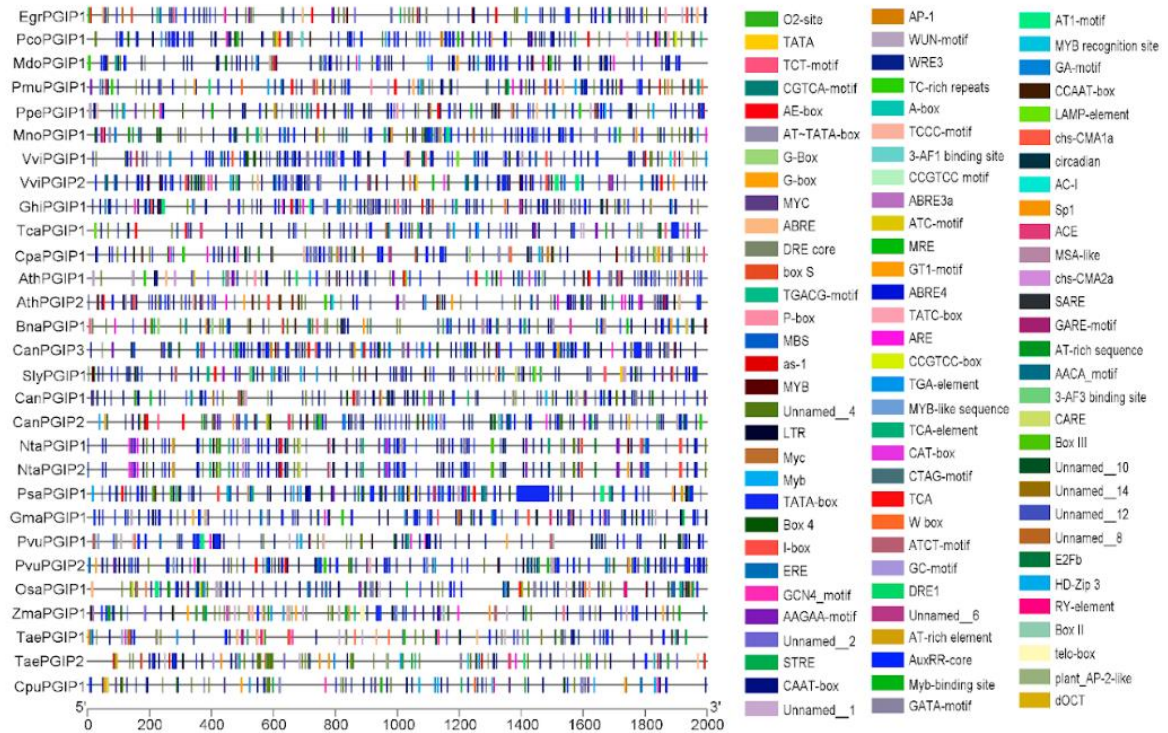
Gráfico 1.1 — Frequência dos CREs de acordo com suas categorias



Legenda: Elementos cis regulatórios distribuídos conforme suas frequências. Elementos da categoria Core são os mais frequentes (61%) e os elementos da categoria BSR os menos frequentes (2%).

Fonte: Da autora (2025).

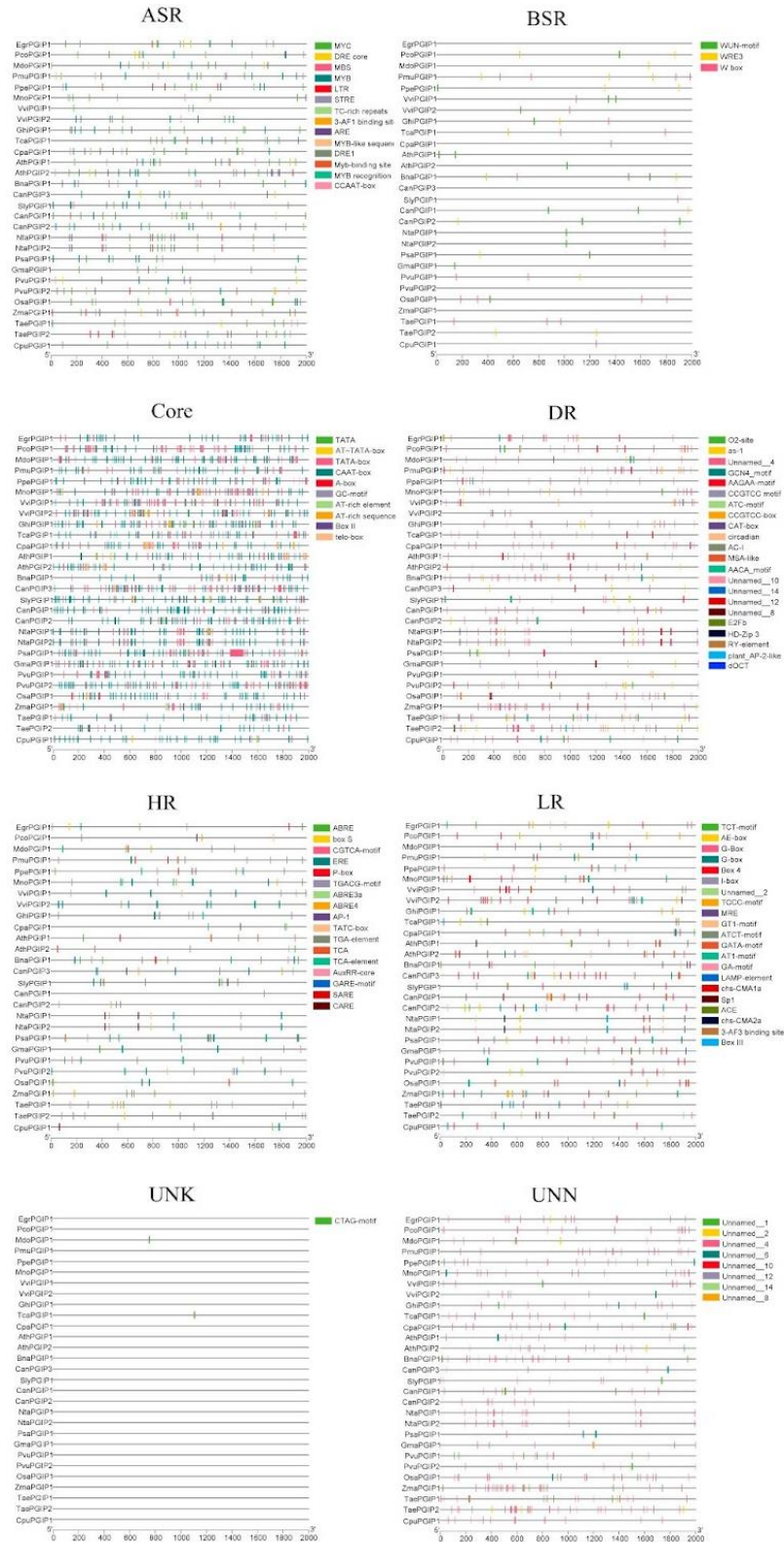
Figura 1.8 — Elementos cis regulatórios totais (CREs)



Legenda: Elementos cis regulatórios de 29 genes analisados com 2000 pares de bases a montante do início do gene.

Fonte: Da autora (2025)

Figura 1.9 — Elementos cis regulatórios separados por suas respectivas categorias



Legenda: Elementos cis de 29 genes analisados com 2000 pares de bases a montante do início do gene, agrupados de acordo com suas categorias. ASR = Responsivos ao Estresse Abiótico; BSR = Responsivos ao Estresse Biótico; Core = Elementos do Promotor Central; DR = Relacionados ao Desenvolvimento; HR = Responsivos a Hormônios; LR = Responsivos à Luz.

Fonte: Da autora (2025).

## 4 DISCUSSÃO

A proteína inibidora de poligalacturonase desempenha um papel crucial nas plantas, atuando como um elemento-chave nos mecanismos de defesa contra patógenos. As PGIPs estão presentes na maioria das espécies vegetais e têm sido associadas ao controle de diversos fungos fitopatogênicos em várias culturas agrônômicas (Liu *et al.*, 2017). Inicialmente, essas proteínas foram identificadas por Albersheim e Anderson (1971), devido à sua capacidade de inibir as poligalacturonases secretadas por *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii*. Vinte anos depois, ocorreu o primeiro isolamento do gene PGIP em feijões (Toubart *et al.*, 1992).

O número de PGIPs identificadas em mono e dicotiledôneas já ultrapassou 170 há mais de uma década (Kalunke *et al.*, 2015), e tem sido observado que muitas espécies apresentam mais de uma PGIP em seu genoma (Cheng *et al.*, 2021). A identificação desses genes baseou-se principalmente em suas sequências, embora apenas uma fração tenha demonstrado codificar proteínas com atividade inibitória contra as poligalacturonases. Além de sua função no sistema imune, as PGIPs também estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento das plantas (Kalunke *et al.*, 2015), e sua expressão pode ser induzida tanto por estresses bióticos quanto por fatores abióticos, como o ácido salicílico e baixas temperaturas (Di *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2003).

### 4.1 Filogenia das PGIPs

Com base nos alinhamentos múltiplos das PGIPs selecionadas e na reconstrução filogenética, as proteínas puderam ser categorizadas de acordo com suas famílias botânicas, o que facilitou a interpretação dos resultados e as análises subsequentes. Os resultados revelaram uma relação próxima entre essas proteínas, mesmo quando classificadas em clados distintos, indicando alto nível de conservação de suas estruturas e sugerindo que as funções essenciais dessas proteínas foram preservadas ao longo da evolução (Heckmeier *et al.*, 2023; Jensen; Ussery; Brunak, 2003).

Em um estudo realizado por Kalunke *et al.* (2014), os pesquisadores caracterizaram de forma abrangente a região genômica da família PGIP em soja, bem como a região circundante em quatro espécies de leguminosas (*Phaseolus vulgaris* L., *Medicago truncatula* Gaertn. e *Cicer arietinum* L.). Como resultado, constatou-se que a soja contém dois loci de PGIP, cada um composto por três genes agrupados que são ativados após a infecção pelo fungo *S.*

*sclerotiorum*. Árvores filogenéticas, construídas segundo o modelo da máxima verossimilhança, sugerem que os genes dentro dos agrupamentos passaram por duplicações em tandem de forma independente em cada espécie, embora as regiões homólogas da soja e das demais leguminosas analisadas se mostrem fortemente conservadas.

De maneira similar, diversos estudos (Ellur *et al.*, 2023; Farina *et al.*, 2009; Kalunke *et al.*, 2014; Di Matteo *et al.*, 2003; Maulik *et al.*, 2012) relatam alta conservação das estruturas das proteínas PGIP ao longo do processo evolutivo, mantendo suas funções essenciais.

## 4.2 Propriedades das proteínas

De forma geral, as PGIPs apresentam um tamanho médio próximo de 300 aminoácidos, com variação no conjunto total do estudo entre 265 e 346 resíduos. Essa constatação reflete a conservação dessas proteínas, que tendem a convergir para desempenhar funções similares na defesa das plantas. No entanto, quando se observa esta característica em famílias específicas, nota-se que alguns grupos apresentam valores um pouco mais elevados. Por exemplo, na família Fabaceae, os comprimentos das PGIPs variaram de 333 a 349 aminoácidos. Em *Medicago truncatula*, por exemplo, MtPGIP1 e MtPGIP2 apresentaram 321 e 342 aminoácidos, respectivamente (Ellur *et al.*, 2023). A relação entre o tamanho das PGIPs e sua função tem sido evidenciada. Wang *et al.* (2021) demonstraram que BnPGIP2 e BnPGIP5 e *Brassica napus*, ambas com 331 aminoácidos e 96,4% de similaridade, estão envolvidas na regulação da resistência da canola ao fungo *S. sclerotiorum*, atuando na inibição da infecção.

## 4.3 Localização subcelular

A função de uma proteína está intimamente ligada à sua localização subcelular, motivo pelo qual a predição dessa localização a partir da sequência é fundamental para reforçar o entendimento sobre o seu papel funcional. Nossos resultados indicaram que 92% das PGIPs foram previstas como localizadas no ambiente extracelular, corroborando a descrição clássica dessas proteínas, que exercem suas funções nesse contexto. Contudo, algumas PGIPs apresentaram predições alternativas, como NtaPGIP1 e NtaPGIP2, potencialmente localizadas nas mitocôndrias, e PpePGIP1 no núcleo. As predições ainda mostraram que, embora a maioria das proteínas fosse predominantemente classificada como extracelular, há indícios de uma possível presença na membrana plasmática, mitocôndria e, de forma notável, na região nuclear.

Para contextualizar nossos achados, é importante notar que estudos anteriores também relataram localizações subcelulares diversas para as PGIPs em diferentes espécies vegetais. Em grão-de-bico (*Cicer arietinum*), por exemplo, CaPGIP1, CaPGIP3 e CaPGIP4 foram classificadas como proteínas secretoras, com predições de localização na membrana plasmática ou parede celular. Em contraste, CaPGIP2 foi prevista atuar nas mitocôndrias ou citoplasma (Ellur *et al.*, 2023). Esses resultados estão parcialmente alinhados com os nossos dados para NtaPGIP1 e NtaPGIP2, sugerindo uma possível diversificação funcional das PGIPs entre as espécies.

Xu *et al.* (2024) demonstraram que ZmPGIP1 pode estar localizada tanto na membrana plasmática quanto na parede celular, sítios estratégicos para a interação com patógenos e regulação das respostas de defesa. Esses achados reforçam o papel crucial dos domínios LRR na mediação das interações proteína-proteína, essenciais para o sinal de defesa. Embora as PGIPs sejam tradicionalmente associadas ao ambiente extracelular, proteínas relacionadas à patogênese (PR) podem apresentar localizações subcelulares diversificadas, possivelmente refletindo funções adicionais ou mecanismos regulatórios complexos (Bertoldo e Mazaro, 2018). A identificação de PGIPs nas mitocôndrias e regiões nucleares em nossa análise sugere que essas proteínas podem participar de processos celulares ainda não reconhecidos, ampliando seu potencial funcional para além do ambiente extracelular.

#### **4.4 Domínios estruturais e motivos conservados**

As proteínas que contêm domínios LRR foram inicialmente descobertas no soro humano e representam um grupo diversificado de moléculas com distintas localizações e funções celulares, sendo encontradas em diversos organismos, incluindo humanos, animais, leveduras e bactérias (Kobe e Deisenhofer, 1994). Encontrados predominantemente em eucariotos, este domínio desempenha um papel crítico em interações proteína-proteína específicas (Jones e Jones, 1997). No caso das PGIPs, o domínio LRR forma a superfície de reconhecimento na região côncava, sendo responsável pelas interações específicas entre as PGIPs e as poligalacturonases fúngicas (Di Matteo *et al.*, 2003; D'Ovidio *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2021).

Alterações de um único aminoácido dentro deste domínio podem afetar significativamente a atividade, especificidade e capacidade inibitória da proteína (Leckie *et al.*, 1999), o que destaca a importância do número de motivos LRR em tandem para a especificidade de reconhecimento entre PG e PGIP (Janni *et al.*, 2006; Kaewwongwal *et al.*, 2017).

Um exemplo elucidativo é o estudo que avaliou a interação entre PGIPs de *Gossypium barbadense* e PGs de *Alternaria macrospora* e *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*. Por meio de análises computacionais e mutações duplas dirigidas (E169G e F242K), demonstrou-se que tais alterações induziram mudanças conformacionais na PGIP, impedindo sua ligação com o PG de *A. macrospora* e, conseqüentemente, comprometendo a defesa da planta. Curiosamente, essa mutação não afetou a interação com o PG de *X. citri* pv. *malvacearum*, preservando a resposta defensiva contra este patógeno. Essas simulações de dinâmica molecular contribuíram para a compreensão do comportamento e da estabilidade dos complexos PGIP-PG, elucidando o mecanismo inibitório e o papel protetor em *G. barbadense* (Murmu *et al.*, 2025).

Em outro estudo, Chiu e Li (2024) demonstraram, por meio de ensaios de inibição de *Botrytis cinerea*, que as regiões LRR5-LRR8 de PvPGIP2, proteína purificada, interagem com as PGs fúngicas presentes em tomates, resultando na redução da incidência e na área afetada pelo patógeno.

Nossas análises bioinformáticas revelaram particularidades interessantes: enquanto o domínio LRRNT\_2 foi identificado em ambas as proteínas PvuPGIP1 e PvuPGIP2, o domínio LRR\_5 não foi detectado, e o LRR\_8 foi relatado apenas em PvuPGIP2. Esse padrão ressalta a importância dos domínios LRR na determinação da atividade funcional das PGIPs. De fato, Xu *et al.* (2024) destacaram o papel indireto do domínio LRRNT\_2, em conjunto com outros domínios LRR, na sinalização da defesa da planta contra patógenos. Por meio de ensaios *in vitro*, demonstraram que a expressão heteróloga de ZmPGIP1 em *Arabidopsis thaliana* induziu mudanças significativas na arquitetura da parede celular – com aumento na acumulação de lignina e celulose – além da upregulação de genes envolvidos em suas vias biossintéticas, contribuindo para maior estabilidade mecânica e resistência ampliada frente a estresses bióticos e abióticos.

Em síntese, os estudos discutidos evidenciam a relevância dos domínios LRR em mecanismos de defesa vegetal, especialmente na interação entre PGIPs e PGs. As variações nos motivos LRR influenciam significativamente o reconhecimento e a inibição de patógenos, afetando a capacidade defensiva da planta. As análises computacionais, combinadas com evidências experimentais, aprofundaram nossa compreensão de como mutações nesses domínios podem modular a atividade das PGIPs e a imunidade vegetal. Esses achados reforçam a importância das proteínas contendo LRR na preservação da sanidade vegetal e na resistência a patógenos, oferecendo valiosos insights para futuras estratégias de proteção de culturas e aprimoramento da resistência a doenças.

#### 4.5 Estrutura gênica

Os genes que codificam PGIPs são geralmente caracterizados pela ausência de íntrons ou pela presença de poucos e curtos íntrons (Ferrari *et al.*, 2003; Kalunke *et al.*, 2015). Em nosso estudo, conforme ilustrado na Figura 7, apenas seis genes (15,38%) continham íntrons, sendo que o gene da PGIP do grupo externo, proveniente de briófitas, foi o único com dois íntrons. Em *Arabidopsis*, por exemplo, a posição dos íntrons é conservada em ambos os genes PGIP1 e PGIP2 (Ramanathan *et al.*, 1997).

Segundo Zou *et al.* (2011), a ausência de íntrons pode ser resultado de seleção que favorece o aumento da eficiência transcricional em genes conservados e com alto nível de expressão. Genes sem íntrons, como é o caso da maioria das PGIPs, não só desempenham papéis fundamentais na resposta a estresses bióticos e abióticos, mas também podem estar envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetal.

Estudos comparativos realizados em famílias gênicas de *Arabidopsis* e arroz sugerem que genes sem íntrons ou com poucos íntrons tendem a participar mais ativamente da resposta a estresses hídricos e salinos. Além disso, alguns genes sem íntrons, pertencentes a famílias como B\_lectin e S\_locus\_glycop, estão associados a processos epigenéticos e contribuem para o desenvolvimento das plantas (Liu *et al.*, 2021).

#### 4.6 Elementos cis-regulatórios (CREs)

Os elementos cis-regulatórios (CREs) são sequências de DNA não codificantes responsáveis por regular a transcrição gênica em eucariotos, incluindo promotores, enhancers, insuladores e silenciadores, sendo que muitos desses elementos são universais (Biłas *et al.*, 2016; Svensson *et al.*, 2006). Embora a posição e orientação dos cis-elementos em relação aos genes possam variar (Venter e Botha, 2010), eles estão incorporados diretamente na fita de DNA a ser transcrita, onde fatores de transcrição se ligam para modular a expressão gênica (Vaughn *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2023). A maioria dos sítios de ligação é pequena, geralmente com 6 a 12 pb de comprimento, e representados até centenas de vezes em qualquer genoma eucariótico (Lambert *et al.*, 2018; Wunderlich e Mirny, 2009).

Entre os CREs, os elementos centrais do promotor são os módulos cis-regulatórios mais bem caracterizados, devido à sua localização previsível em torno dos sítios de início da transcrição (TSS) (Marand *et al.*, 2023). Esses elementos são essenciais para a montagem do complexo de pré-iniciação da transcrição, que inclui a RNA polimerase II e fatores de

transcrição gerais (Haberle e Stark, 2018; Marand *et al.*, 2023). Dentre os elementos mais abundantes, destacam-se o TATA-box, a região iniciadora (Inr) e o CAAT-box.

Em nosso estudo, dos 4.396 CREs identificados, TATA-box (32,44%) e CAAT-box (24,20%) foram os mais prevalentes. TATA-box, predominantemente composto por pares de bases AT, costuma estar localizado de 25 a 30 pb a montante do TSS, geralmente ladeado por regiões ricas em GC (Twyman, 2003). Em nossas análises, seu comprimento variou de 4 a 13 pb, com uma média de 6 pb.

Em síntese, o TATA-box desempenha um papel fundamental na iniciação da transcrição, servindo de sítio de ligação para fatores de transcrição, especialmente o TFIID (Biças *et al.*, 2016; Schmitz; Grotewold; Stam, 2022). O segundo elemento mais predominante, CAAT-box, é normalmente encontrado cerca de 80 pb a montante do TSS e influencia significativamente a eficiência da expressão gênica por sua funcionalidade bidirecional. Sua alta suscetibilidade a mutações ressalta sua importância regulatória, uma vez que alterações nessa sequência podem comprometer a transcrição (Biças *et al.*, 2016; Porto *et al.*, 2014).

Esses elementos centrais são comuns nos promotores de diversos genes, inclusive daqueles que codificam proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs). Em estudos realizados com PGIPs do grão-de-bico (CaPGIPs), Ellur *et al.* (2023) observaram uma abundância dos elementos TATA-box e CAAT-box. Nossos resultados corroboram com essas observações, com frequências de 15,5% para cis-elementos associados à resposta a estresses abióticos e 3,33% para aqueles ligados à resposta a estresses bióticos, reforçando a importância desses elementos na adaptação das plantas a condições ambientais variáveis.

Além dos elementos centrais (Core), outros CREs relacionados à estímulos de luz, estresses biótico e abióticos, responsivos a hormônios, e ligados ao desenvolvimento vegetal são relatados. Em condições adversas, como estresses bióticos ou abióticos, a expressão de genes específicos das plantas é ajustada, sob caráter de adaptação. A ativação transcricional de genes específicos em eucariotos é regulada por elementos cis-atuantes a montante, que desempenham um papel significativo nas respostas ambientais (Li; Zhu; Duan, 2020). Os cis-elementos regulatórios TCA, ABRE, MYC e 3-AF1 foram identificados na região promotora pVqMYB15\_SY, do fator de transcrição MYB15, em *Vitis quinquangularis*. Acredita-se que sua presença é fundamental para a regulação da resistência da planta a estresses bióticos e abióticos (Li; Zhu; Duan, 2020). Dessa forma, regiões promotoras dos genes contêm diversos elementos cis-atuantes, que regulam o seu nível transcricional, contribuindo para a resposta das plantas a estresses ambientais (Kong *et al.*, 2018).

Entre os 4.396 cis-elementos analisados nos promotores de PGIPs, as frequências desses CREs foram: TCA (0,25%), ABRE (1,32%), MYC (2,98%) e 3-AF1 (0,05%), os quais podem desempenhar um papel fundamental na regulação de sua transcrição.

Como elemento responsivo a hormônios (HR), o TCA-element está envolvido nas respostas ao ácido salicílico e na defesa contra patógenos, pois a indução da resistência e a produção de proteínas relacionadas à patogênese (PR) podem ser promovidas pelo ácido salicílico ou ácido acetilsalicílico, mesmo na ausência de organismos patogênicos (Raskin, 1992).

Alguns CREs estão envolvidos na resposta à luz, incluindo o sítio de ligação 3-AF1, a G-box e a BOX4, amplamente distribuídos, potencialmente influentes sobre a expressão gênica.

O G-box, encontrado em 23 das 29 PGIPs analisadas (79,31%), é um dos cis-elementos mais estudados em resposta à luz, sendo responsável por ativar ou aumentar a expressão gênica nas plantas em resposta à luz (Priest; Filichkin; Mockler, 2009). Sua importância foi evidenciada desde os primeiros estudos realizados em *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Arabidopsis thaliana*, sendo caracterizado por uma sequência altamente conservada ao longo da evolução dos genes RBCS (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase) em plantas eudicotiledôneas (Giuliano *et al.*, 1988). Em um estudo com *Arabidopsis* focado na regulação circadiana e diurna da expressão gênica (Mockler *et al.*, 2007), foi observada uma alta frequência do G-box nos promotores de diversos genes, apresentando picos significativos de expressão algumas horas após o amanhecer (Priest; Filichkin; Mockler, 2009).

A identificação sistemática dos módulos regulatórios cis (CRMs) e dos elementos regulatórios cis (CREs) que os constituem é um passo inicial na modificação e reestruturação das redes regulatórias das plantas, com o objetivo de otimizar seu crescimento e desenvolvimento, fortalecer a resistência a estresses ou impulsionar a produção de compostos vegetais (Schmitz; Grotewold; Stam, 2022).

Em resumo, uma vez que os elementos cis-regulatórios, especialmente TATA-box e CAAT-box, são fundamentais na orquestração da transcrição gênica em eucariotos, a sua identificação contribui para o entendimento sobre a regulação fina da expressão gênica. Sua posição conservada e o seu papel crucial na montagem do complexo de pré-iniciação, bem como sua alta prevalência nos promotores das PGIPs, destacam sua importância na regulação das respostas a estresses bióticos e abióticos, especialmente quando observada a presença de cis-elementos de outras categorias de respostas, tais como resposta a hormônios, luz e o desenvolvimento.

## 5 CONCLUSÕES

Este estudo integrativo caracterizou 39 genes e proteínas PGIPs relacionadas com sua interação às poligalacturonases fúngicas ou que foram candidatas a esta função segundo levantamento na literatura. Dessa forma, foram reunidas informações e esclarecimentos significativos sobre sua diversidade, conservação e potencial funcional em diferentes espécies vegetais. Foi observado que as famílias gênicas estão sujeitas a dinâmicas evolutivas, em que a aquisição ou perda de material genético, mesmo que decorrente de alterações mínimas em nucleotídeos, pode induzir modificações significativas nas propriedades estruturais e funcionais das proteínas. Tais mudanças permitem que os genes sigam trajetórias evolutivas próprias, possibilitando a adaptação a nichos específicos e, potencialmente, a diversificação funcional.

Apesar da vasta diversidade biológica, os resultados deste trabalho demonstram que as PGIPs são altamente conservadas, o que ficou evidenciado pela variação moderada no tamanho das proteínas e pela arquitetura preservada dos domínios LRR (LRRNT\_2, LRR\_4 e LRR\_8), fundamentais para o reconhecimento e inibição específicos das poligalacturonases fúngicas.

Os achados também indicam que, embora a maioria das PGIPs seja predominantemente localizada no ambiente extracelular, conforme a descrição clássica, algumas predições apontam para localizações alternativas, como mitocôndrias e núcleo. Esse resultado, aliado à diversidade de elementos cis-regulatórios presentes em suas regiões promotoras, sugere que as PGIPs podem exercer funções adicionais, ampliando seu papel na defesa e no desenvolvimento das plantas.

De maneira complementar, a análise da estrutura gênica revelou uma predominância de genes sem íntrons, ou então, com poucos íntrons, característica que pode estar relacionada à necessidade de eficiência transcricional em genes conservados e altamente expressos.

Em síntese, a alta conservação funcional e estrutural das PGIPs, juntamente com as sutis diferenças observadas na arquitetura gênica, na composição dos elementos regulatórios e na localização subcelular, reforça seu papel central na imunidade vegetal. Sugere-se que outras PGIPs possam ser consideradas em novas pesquisas, como PvuPGIP3/PvuPGIP4; outras PGIPs de *Glycine max*, principalmente a GmPGIP3 e também outras importantes PGIPs de *Brassica napus*, uma vez que não foram incluídas nestes estudo.

Estes resultados aprofundam a compreensão dos mecanismos de defesa das plantas e fornecem uma base para futuras pesquisas e para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de melhoramento genético, visando o aumento da resistência a patógenos em diversas culturas.

## REFERÊNCIAS

- ABE, H. *et al.* **Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression.** *The Plant Cell*, [s.l.], v. 9, n. 10, p. 1859–1868, 1997. DOI: 10.1105/tpc.9.10.1859.
- ALBERSHEIM, P.; ANDERSON, A. J. **Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 68, n. 8, p. 1815–1819, 1971. DOI: 10.1073/pnas.68.8.1815
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. *et al.* **Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning.** *Life Science Alliance*, [s.l.], v. 2, n. 5, 2019. DOI: 10.26508/lsa.201900429.
- BAILEY, T. L. *et al.* **The MEME Suite.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 43, n. W1, p. W39–W49, 2015. DOI: 10.1093/nar/gkv416.
- BASHI, Z. D. *et al.* **Brassica napus polygalacturonase inhibitor proteins inhibit Sclerotinia sclerotiorum polygalacturonase enzymatic and necrotizing activities and delay symptoms in transgenic plants.** *Canadian Journal of Microbiology*, [s.l.], v. 59, n. 2, p. 79–86, 2013. DOI: 10.1139/cjm-2012-0352.
- BIŁAS, R. *et al.* **Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, [s.l.], v. 127, n. 2, p. 269–287, 2016. DOI: 10.1007/s11240-016-1057-7.
- BOYD JR, D. W. **Digestive enzymes and stylet morphology of Deraeocoris nigrifulus (Uhler) (Hemiptera: Miridae) reflect adaptations for predatory habits.** *Annals of the Entomological Society of America*, [s.l.], v. 96, n. 5, p. 667–671, 2003.
- CAPRARI, C. *et al.* **Mutagenesis of endopolygalacturonase from Fusarium moniliforme: histidine residue 234 is critical for enzymatic and macerating activities and not for binding to polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP).** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 617, 1996. DOI: 10.1094/MPMI-9-0617.
- CERVONE, F. **Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in Phaseolus vulgaris.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, [s.l.], v. 10, n. 7, p. 852–860, 1997. DOI: 10.1094/MPMI.1997.10.7.852.
- CHEN, C. *et al.* **TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data.** *Molecular Plant*, [s.l.], v. 13, n. 8, p. 1194–1202, 2020. DOI: 10.1016/j.molp.2020.06.009.
- CHIU, T.; LI, Y. **Polygalacturonase-inhibiting proteins as an exogenously applied natural solution for prevention of postharvest fungal infections.** *Synthetic and Systems Biotechnology*, [s.l.], v. 9, n. 3, p. 481–493, 2024. DOI: 10.1016/j.synbio.2024.04.002.
- COLE, T. C.; HILGER, H.; CARVALHO, F. **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV.** *Botanical Journal of the Linnean Society*, [s.l.], v. 181, p. 1–20, 2016.

DI, C. *et al.* **Role of polygalacturonase inhibiting protein in plant defense.** *Critical Reviews in Microbiology*, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 91–100, 2006. DOI: 10.1080/10408410600709834.

D’OVIDIO, R. *et al.* **Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects.** *Plant Physiology*, [s.l.], v. 135, n. 4, p. 2424–2435, 2004. DOI: 10.1104/pp.104.044644.

D’OVIDIO, R. *et al.* **Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant–pathogen interactions.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, [s.l.], v. 1696, n. 2, p. 237–244, 2004. DOI: 10.1016/j.bbapap.2003.08.012.

FARINA, A. *et al.* **The bean polygalacturonase-inhibiting protein 2 (PvPGIP2) is highly conserved in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm and related species.** *Theoretical and Applied Genetics*, [s.l.], v. 118, n. 7, p. 1371–1379, 2009. DOI: 10.1007/s00122-009-0987-4.

FEDERICI, L. *et al.* **Structural requirements of endo polygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein).** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 98, n. 23, p. 13425–13430, 2001. DOI: 10.1073/pnas.231473698.

FERRARI, S. *et al.* **Tandemly duplicated arabidopsis genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection.** *The Plant Cell*, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 93–106, 2003. DOI: 10.1105/tpc.005165.

GASTEIGER, E. *et al.* **Protein identification and analysis tools on the ExPASy server.** *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607. DOI: 10.1385/1-59259-890-0:571.

GIRARD, C.; JOUANIN, L. **Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, [s.l.], v. 29, n. 12, p. 1129–1142, 1999. DOI: 10.1016/S0965-1748(99)00104-6.

GIULIANO, G. *et al.* **An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 85, n. 19, p. 7089–7093, 1988. DOI: 10.1073/pnas.85.19.7089.

GOODSTEIN, D. M. *et al.* **Phytozome: a comparative platform for green plant genomics.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 40, n. D1, p. D1178–D1186, 2012. DOI: 10.1093/nar/gkr944.

HABERLE, V.; STARK, A. **Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [s.l.], v. 19, n. 10, p. 621–637, 2018. DOI: 10.1038/s41580-018-0028-8.

HE, Y. *et al.* **Ectopic expression of a wheat MYB transcription factor gene, TaMYB73, improves salinity stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*.** *Journal of Experimental Botany*, [s.l.], v. 63, n. 3, p. 1511–1522, 2012. DOI: 10.1093/jxb/err389.

HECKMEIER, P. J. *et al.* **A billion years of evolution manifest in nanosecond protein dynamics.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 121, n. 10, p. e2318743121, 2024.

HELFT, L. *et al.* **LRR conservation mapping to predict functional sites within protein leucine-rich repeat domains.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 6, n. 7, p. e21614, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0021614.

HU, B. *et al.* **GSDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server.** *Bioinformatics*, [s.l.], v. 31, n. 8, p. 1296–1297, 2015. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu817.

JANNI, M. *et al.* **Characterization of expressed PGIP genes in rice and wheat reveals similar extent of sequence variation to dicot PGIPs and identifies an active PGIP lacking an entire LRR repeat.** *Theoretical and Applied Genetics*, [s.l.], v. 113, n. 7, p. 1233–1245, 2006. DOI: 10.1007/s00122-006-0378-z.

JAUBERT, S. *et al.* **A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*.** *FEBS Letters*, [s.l.], v. 522, n. 1–3, p. 109–112, 2002. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)02906-X.

JENSEN, L. J.; USSERY, D. W.; BRUNAK, S. **Functionality of system components: conservation of protein function in protein feature space.** *Genome research*, [s.l.], v. 13, n. 11, p. 2444–9, 2003. DOI: 10.1101/gr.1190803.

JONES, D. A.; JONES, J. D. G. **The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences.** *Advances in Botanical Research Advances in botanical research*. Academic Press, 1997. p. 89-167. DOI: 10.1016/S0065-2296(08)60072-5.

JUNG, S. *et al.* **15 years of GDR: New data and functionality in the Genome Database for Rosaceae.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 47, n. D1, p. D1137–D1145, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky1000.

KAEEWONGWAL, A. *et al.* **Novel alleles of two tightly linked genes encoding polygalacturonase-inhibiting proteins (VrPGIP1 and VrPGIP2) associated with the br locus that confer bruchid (*Callosobruchus* spp.) resistance to mungbean (*Vigna radiata*) accession V2709.** *Frontiers in Plant Science*, [s.l.], v. 8, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.01692.

KALUNKE, R. M. *et al.* **The PGIP family in soybean and three other legume species: evidence for a birth-and-death model of evolution.** *BMC Plant Biology*, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 189, 2014. DOI: 10.1186/s12870-014-0189-3.

KOBE, B.; DEISENHOFER, J. **The leucine-rich repeat: a versatile binding motif.** *Trends in biochemical sciences*, [s.l.], v. 19, n. 10, p. 415–421, 1994.

- KONG, W. *et al.* **Identification and expression analysis of genes with pathogen-inducible cis-regulatory elements in the promoter regions in *Oryza sativa*.** *Rice*, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 52, 2018. DOI: 10.1186/s12284-018-0243-0.
- LAMBERT, S. A. *et al.* **The human transcription factors.** *Cell*, [s.l.], v. 172, n. 4, p. 650–665, 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.01.029.
- LECKIE, F. *et al.* **The specificity of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP): a single amino acid substitution in the solvent-exposed  $\beta$ -strand/ $\beta$ -turn region of the leucine-rich repeats (LRRs) confers a new recognition capability.** *The EMBO Journal*. [s.l.]: [s.n.], 1999.
- LESCOT, M. **PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 325–327, 2002. DOI: 10.1093/nar/30.1.325.
- LI, R. *et al.* **Two *Brassica napus* polygalacturonase inhibitory protein genes are expressed at different levels in response to biotic and abiotic stresses.** *Planta*, [s.l.], v. 217, n. 2, p. 299–308, 2003. DOI: 10.1007/s00425-003-0988-5.
- LI, R.; ZHU, F.; DUAN, D. **Function analysis and stress-mediated cis-element identification in the promoter region of VqMYB15.** *Plant Signaling & Behavior*, [s.l.], v. 15, n. 7, p. 1773664, 2020. DOI: 10.1080/15592324.2020.1773664.
- LIU, H. *et al.* **The emergence and evolution of intron-poor and intronless genes in intron-rich plant gene families.** *The Plant Journal*, [s.l.], v. 105, n. 4, p. 1072–1082, 2021. DOI: 10.1111/tpj.15088.
- LIU, P. L. *et al.* **Origin and diversification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in plants.** *BMC Evolutionary Biology*, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 47, 2017. DOI: 10.1186/s12862-017-0891-5.
- DE LORENZO, G.; CERVONE, F. **Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs): their role in specificity and defense against pathogenic fungi.** *Plant-Microbe Interactions*. Boston, MA: Springer US, 1997. p. 76-93.
- DE LORENZO, G.; D'OVIDIO, R.; CERVONE, F. **The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi.** *Annual review of phytopathology*, v. 39, n. 1, p. 313-335, 2001. DOI: org/10.1146/annurev.phyto.39.1.313
- LU, S. *et al.* **CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 48, n. D1, p. D265–D268, 2020. DOI: 10.1093/nar/gkz991.
- MANKARIOS, A. T.; FRIEND, J. **Polysaccharide-degrading enzymes of *Botrytis allii* and *Sclerotium cepivorum*. Enzyme production in culture and the effect of the enzyme on isolated onion cell walls.** *Physiological Plant Pathology*, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 93–104, 1980. DOI: 10.1016/0048-4059(80)90010-7.
- MARAND, A. P. *et al.* **Cis-regulatory elements in plant development, adaptation, and evolution.** *Annual Review of Plant Biology*, [s.l.], v. 74, n. 1, p. 111–137, 2023. DOI: 10.1146/annurev-arplant-070122-030236.

MARONE, D. *et al.* **Plant nucleotide binding site–leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: active guardians in host defense responses.** *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 7302–7326, 2013. DOI: 10.3390/ijms14047302.

MATSAUNYANE, L.; OELOFSE, D.; DUBERY, I. A. **In silico analysis of the polygalacturonase inhibiting protein 1 from apple, *Malus domestica*.** *BMC Research Notes*, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 76, 2015. DOI: 10.1186/s13104-015-1025-z.

MATTEO, A. DI *et al.* **The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 100, n. 17, p. 10124–10128, 2003. DOI: 10.1073/pnas.1733690100.

MAULIK, A. *et al.* **Polygalacturonase-inhibiting proteins - leucine-rich repeat proteins in plant defence.** *Plant Biology*, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 22–30, 2012. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2011.00501.x.

MOCKLER, T. C. *et al.* **The diurnal project: diurnal and circadian expression profiling, model-based pattern matching, and promoter analysis.** *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, [s.l.], v. 72, n. 1, p. 353–363, 2007. DOI: 10.1101/sqb.2007.72.006.

MÖLLER, S.; CRONING, M. D. R.; APWEILER, R. **Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions.** *Bioinformatics*, [s.l.], v. 17, n. 7, p. 646–653, 2001. DOI: 10.1093/bioinformatics/17.7.646.

MORALES-QUINTANA, L. *et al.* **Molecular dynamics simulation of the interaction of a raspberry polygalacturonase (RiPG) with a PG inhibiting protein (RiPGIP) isolated from ripening raspberry (*Rubus idaeus* cv. Heritage) fruit as a model to understand proteins interaction during fruit softening.** *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, [s.l.], v. 122, p. 108502, 2023. DOI: 10.1016/j.jmgm.2023.108502.

MURMU, S. *et al.* **In silico study of E169G and F242K double mutations in leucine-rich repeats (LRR) polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) of *Gossypium barbadense* and associated defense mechanism against plant pathogens.** *Journal of Cotton Research*, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 3, 2025. DOI: 10.1186/s42397-024-00203-z.

OMASITS, U. *et al.* **Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data.** *Bioinformatics*, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 884–886, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt607.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. **Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos.** *Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos*. v. 1. 5 ed. Ouro Fino, MG: Agronômica Ceres Ltda, 2018. 2018.

PORTO, M. S. *et al.* **Plant Promoters: an approach of structure and function.** *Molecular Biotechnology*, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 38–49, 2014. DOI: 10.1007/s12033-013-9713-1.

POWELL, A. L. T. *et al.* **Transgenic expression of pear pgip in tomato limits fungal colonization.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, [s.l.], v. 13, n. 9, p. 942–950, 2000. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.9.942.

PRIEST, H. D.; FILICHKIN, S. A.; MOCKLER, T. C. **Cis-regulatory elements in plant cell signaling.** *Current Opinion in Plant Biology*, [s.l.], v. 12, n. 5, p. 643–649, 2009 DOI: 10.1016/j.pbi.2009.07.016.

RAMANATHAN, V. *et al.* **cDNA cloning and expression of polygalacturonaseinhibiting proteins (PGIPs) from red raspberry (*Rubus idaeus*).** *Journal of Experimental Botany*, [s.l.], v. 48, n. 6, p. 1185–1193, 1997. DOI: 10.1093/jxb/48.6.1185.

RASKIN, I. **Role of salicylic acid in plants.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, [s.l.], v. 43, n. 1, p. 439–463, 1992. DOI: 10.1146/annurev.pp.43.060192.002255.

RATHINAM, M.; RAO, U.; SREEVATHSA, R. **Novel biotechnological strategies to combat biotic stress: polygalacturonase inhibitor (PGIP) proteins as a promising comprehensive option.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v. 104, n. 6, p. 2333–2342, 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10396-3.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. **Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling.** *Phytochemistry*, [s.l.], v. 57, n. 6, p. 929–967, 2001. DOI: 10.1016/S0031-9422(01)00113-3.

SCHMITZ, R. J.; GROTEWOLD, E.; STAM, M. **Cis-regulatory sequences in plants: Their importance, discovery, and future challenges.** *The Plant Cell*, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 718–741, 2022. DOI: 10.1093/plcell/koab281.

SRIVASTAVA, V. *et al.* **Plant transcription factors: contribution in development, metabolism and environmental stress.** Chennai: Elsevier, 2023. 450 p.

SU, Z. *et al.* **Genome-wide identification of auxin response factor (ARF) genes family and its tissue-specific prominent expression in pineapple (*Ananas comosus*).** *Tropical Plant Biology*, [s.l.], v. 10, n. 2–3, p. 86–96, 2017. DOI: 10.1007/s12042-017-9187-6.

SVENSSON, J. T. *et al.* **Transcriptome analysis of cold acclimation in barley albina and xantha mutants.** *Plant Physiology*, [s.l.], v. 141, n. 1, p. 257–270, 2006. DOI: 10.1104/pp.105.072645.

TOUBART, P. *et al.* **Cloning and characterization of the gene encoding the endo polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L.** *The Plant Journal*, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 367–373, 1992. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1992.t01-35-00999.x.

TSIRIGOS, K. D. *et al.* **The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 43, n. W1, p. W401–W407, 2015. DOI: 10.1093/nar/gkv485.

TWYMAN, R. **Growth and development: control of gene expression, regulation of transcription.** Encyclopedia of applied plant sciences. London: Elsevier Science, 2003. p. 558–567.

VASCONCELLOS, R. C. C. **Seleção recorrente e expressão da família gênica PvPGIP visando resistência ao mofo branco em feijoeiro.** 2017. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

VAUGHN, J. N. *et al.* **Known and novel post-transcriptional regulatory sequences are conserved across plant families.** RNA, [s.l.], v. 18, n. 3, p. 368–384, 2012. DOI: 10.1261/rna.031179.111.

VENTER, M.; BOTHA, F. C. **Synthetic promoter engineering.** Plant developmental biology - biotechnological perspectives. v. 2, 1 ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 393–414. DOI: 10.1007/978-3-642-04670-4\_20.

VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. **The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance.** Trends in Plant Science, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 203–209, 2004. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.02.005.

WANG, Z. *et al.* **Overexpression of OsPGIP2 confers *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in *Brassica napus* through increased activation of defense mechanisms.** Journal of Experimental Botany, [s.l.], v. 69, n. 12, p. 3141–3155, 2018. DOI: 10.1093/jxb/ery138.

WANG, Z. *et al.* **Interaction between *Brassica napus* polygalacturonase inhibition proteins and *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase: implications for rapeseed resistance to fungal infection.** Planta, [s.l.], v. 253, n. 2, 2021. DOI: 10.1007/s00425-020-03556-2.

WEI, W. *et al.* **A fungal extracellular effector inactivates plant polygalacturonase-inhibiting protein.** Nature Communications, [s.l.], v. 13, n. 1, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-29788-2.

WHEELER, A. G. **Biology of the plant bugs (Hemiptera: Miridae): pests, predators, opportunists.** Ithaca, New York: Cornell University Press, 2001. 507 p.

WUNDERLICH, Z.; MIRNY, L. A. **Different gene regulation strategies revealed by analysis of binding motifs.** Trends in Genetics, [s.l.], v. 25, n. 10, p. 434–440, 2009. DOI: 10.1016/j.tig.2009.08.003.

XU, J. J. *et al.* **ZmPGIP1 regulates stem strength by enhancing lignin and cellulose biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*.** Biotechnology & Biotechnological Equipment, [s.l.], v. 38, n. 1, 2024. DOI: 10.1080/13102818.2024.2356867.

YU, C. *et al.* **Prediction of protein subcellular localization.** Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, [s.l.], v. 64, n. 3, p. 643–651, 2006. DOI: 10.1002/prot.21018.

ZOU, M.; GUO, B.; HE, S. **The roles and evolutionary patterns of intronless genes in deuterostomes.** International Journal of Genomics, [s.l.], v. 2011, n. 1, p. 680673, 2011. DOI: 10.1155/2011/680673.

<b>Artigo 2 - Elaborado conforme a norma NBR 6022</b>	
Título do artigo:	Expressão transiente dos genes PvuPGIP1 e PvuPGIP2 em <i>Nicotiana benthamiana</i> na resistência ao mofo branco
Autores:	Maria Clara Carli Lais Nóbrega Rodrigues Tácila Rayene Marinho Dutra Yasmin Maciel Meireles Costa Welison Andrade Pereira



**ARTIGO 2 - Expressão transiente dos genes PvuPGIP1 e PvuPGIP2 em *Nicotiana benthamiana* na resistência ao mofo branco**

**ARTICLE 2 - Transient expression of PvuPGIP1 and PvuPGIP2 genes in *Nicotiana benthamiana* in resistance to white mold<sup>2</sup>**

**Maria Clara Carli  
Lais Nóbrega Rodrigues**

**Resumo:** O fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco, afeta mais de 400 espécies vegetais, como feijão e soja, podendo provocar perdas de até 100% na produção. A obtenção de cultivares resistentes é dificultada pela resistência quantitativa característica desse patossistema, tornando estratégica a busca por genes com potencial para o melhoramento genético. Este estudo avaliou os genes do feijão (*Phaseolus vulgaris*) PvuPGIP1 e PvuPGIP2 quanto à participação na resistência ao mofo branco, por meio de ensaios de transformação transiente via agroinfiltração de *Agrobacterium tumefaciens* em plantas de *Nicotiana benthamiana*, seguidos de inoculação de *S. sclerotiorum*. O experimento, em delineamento inteiramente casualizado, contou com quatro tratamentos e quatro repetições: folhas agroinfiltradas com PvuPGIP1; folhas agroinfiltradas com PvuPGIP2; controle com meio de infiltração; e controle sem infiltração. Todos os tratamentos foram inoculados com discos de micélio, e as lesões foram medidas diariamente nos sentidos horizontal e vertical. A análise estatística foi realizada pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os resultados indicaram que, nos três primeiros dias, ambos os genes podem ter restringido o desenvolvimento do fungo e, conseqüentemente, os sintomas, apresentando diferenças significativas em relação às testemunhas. A partir do quarto dia, não houve diferenças estatísticas entre tratamentos, possivelmente devido à redução da expressão gênica. Estes achados reforçam que PvuPGIP1 e PvuPGIP2 podem desempenhar papel na inibição do crescimento do fungo, fornecendo subsídios para pesquisas futuras e para o desenvolvimento de cultivares mais resistentes. Considerando a complexidade da resistência do feijoeiro ao mofo branco, compreender as bases moleculares deste patossistema é fundamental ao melhoramento genético.

**Palavras-chave:** agroinfiltração; expressão transiente; *Sclerotinia sclerotiorum*; controle de doenças

**Abstract:** The necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of white mold, affects more than 400 plant species, including common bean and soybean, and can cause yield losses of up to 100%. The development of resistant cultivars is hindered by the quantitative nature of resistance in this pathosystem, making the search for genes with potential for breeding

<sup>2</sup> Artigo científico apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

a strategic approach. This study evaluated the common bean (*Phaseolus vulgaris*) genes PvuPGIP1 and PvuPGIP2 for their potential role in resistance to white mold, through transient expression assays via *Agrobacterium tumefaciens* agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana* plants, followed by inoculation with *S. sclerotiorum*. The experiment, arranged in a completely randomized design, included four treatments and four replicates: leaves agroinfiltrated with PvuPGIP1; leaves agroinfiltrated with PvuPGIP2; control leaves infiltrated with infiltration medium; and control leaves without infiltration. All treatments were inoculated with mycelial plugs, and lesions were measured daily in both horizontal and vertical directions. Statistical analysis was performed using the Scott–Knott means clustering test at a 5% probability level. Results indicated that, during the first three days, both genes may have restricted fungal development and, consequently, disease symptoms, showing significant differences compared to the controls. From the fourth day onward, no statistical differences among treatments were observed, possibly due to reduced gene expression. These findings support that PvuPGIP1 and PvuPGIP2 may play a role in inhibiting fungal growth, providing a basis for further research and the development of more resistant cultivars. Given the complexity of white mold resistance in common bean, understanding the molecular basis of this pathosystem is essential for breeding.

**Keywords:** agroinfiltration; transient expression; *Sclerotinia sclerotiorum*; disease control

## 1 INTRODUÇÃO

O mofo branco, causado pelo fungo necrotrófico *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma doença de grande impacto que compromete mais de 500 espécies de plantas, como alfafa, canola, alface, batata e girassol (Boland; Hall, 1994; Miklas *et al.*, 2013; Purdy, 1979) com maior incidência em culturas das famílias Brassicaceae, como brócolis, repolho e couve-flor, e Fabaceae, incluindo soja, ervilha e feijão (Rana *et al.*, 2021).

Segundo a FAO, em 2023 a produção mundial de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) atingiu aproximadamente 28,5 milhões de toneladas, com uma área cultivada de 37,7 milhões de hectares. No período de 1994 a 2023, os maiores produtores dessa leguminosa foram Índia, Brasil, Myanmar, China e Estados Unidos.

Essa doença representa uma grave ameaça à agricultura global, podendo reduzir a produtividade de 50 a 100% (Bolton; Thomma; Nelson, 2006; Kumar *et al.*, 2024). As perdas são mais severas quando há alta densidade de cultivo e elevada umidade no solo e nas folhas, fatores que favorecem a formação de escleródios, a germinação carpopêgica e a produção de ascósporos (Mila e Yang, 2008). As epidemias ocorrem com maior frequência em zonas temperadas e em regiões subtropicais úmidas de maior altitude, onde a umidade elevada e as temperaturas moderadas, entre 11 e 23°C, criam condições ideais para a propagação do patógeno (Steadman, 1983).

Com a dificuldade na obtenção de cultivares resistentes ao mofo branco devido à sua resistência parcial (Miklas *et al.*, 2013), o controle da doença vem sendo realizado por meio de manejo cultural (aração profunda, rotação de culturas, ajuste de espaçamento e irrigação), uso de métodos biológicos e químicos (Kumar *et al.*, 2024; Lima *et al.*, 2020; Reich *et al.*, 2023).

No entanto, os altos custos dos fungicidas e seus impactos ao ambiente e à saúde humana têm impulsionado a busca por alternativas de manejo (Miklas *et al.*, 2013; Schwartz e Singh, 2013). O desenvolvimento de cultivares resistentes é o principal objetivo de muitos programas de melhoramento e a identificação de materiais com resistência no Brasil é uma tarefa desafiadora, pois as principais fontes de resistência são de origem andina e pouco adaptadas ao país (Lehner *et al.*, 2015).

Em um experimento conduzido em casa de vegetação, foram avaliados 516 acessos de germoplasma de feijão-comum provenientes de 22 países. Os resultados mostraram que apenas 12 acessos (2,33%) apresentaram resistência ao mofo branco. Desses, oito eram originários da Colômbia e quatro da Índia. Entre os acessos analisados, EC271475 e EC530916, ambos da Colômbia, destacaram-se como os mais resistentes, tornando-se candidatos promissores para o

desenvolvimento de variedades resistentes à doença em programas de melhoramento genético (Chauhan *et al.*, 2020).

A transferência de genes associados à resistência a doenças por meio de técnicas biotecnológicas tem sido utilizada para o desenvolvimento de variedades vegetais mais resistentes, contribuindo para a otimização dos recursos genéticos (Li *et al.*, 2024). Avanços em biotecnologia, como o silenciamento por RNA e a edição gênica via CRISPR-Cas9 têm tornado esse aprimoramento mais acessível e eficiente (Andrade; Sartoretto; Brasileiro, 2003; Li *et al.*, 2024; Majumdar, 2023).

Especificamente, a transformação genética mediada por *Agrobacterium* spp. tem sido aplicada para introduzir características de interesse socioeconômico em diversas culturas, ampliando a resistência a estresses bióticos e abióticos e melhorando seu desempenho em campo (Andrade; Sartoretto; Brasileiro, 2003). Além disso, pesquisas sobre a imunidade vegetal seguem revelando novas estratégias para a obtenção de resistência a doenças, enquanto a biotecnologia possibilita a modulação precisa da expressão de genes essenciais para a defesa do hospedeiro (Li *et al.*, 2024; Majumdar, 2023).

A parede celular das plantas contém, entre seus componentes, as PGIPs (Proteínas Inibidoras da Poligalacturonase), proteínas com a função de inibir enzimas poligalacturonases secretadas por patógenos e insetos durante a infecção (Kalunke *et al.*, 2015). A interação entre essas duas proteínas aciona o mecanismo de defesa das plantas, por meio do acúmulo de oligogalacturonídeos (OGs), os quais induzem a expressão de genes para a síntese de proteínas relacionadas à defesa, como a própria PGIP (Murmu *et al.*, 2025).

A superexpressão de genes PGIP em plantas cultivadas tem demonstrado potencial na proteção contra pragas de insetos e patógenos vegetais (Murmu *et al.*, 2025).

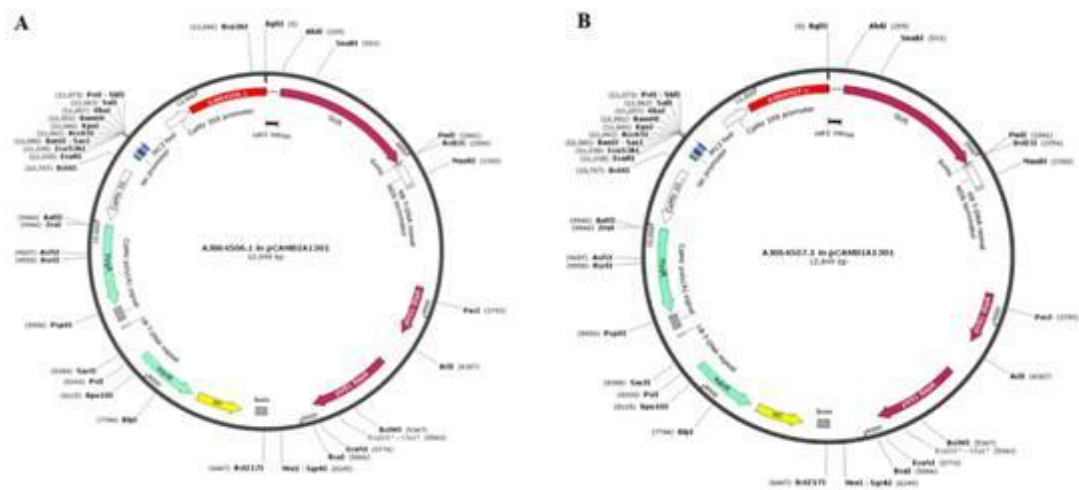
Neste cenário, a integração contínua de conhecimentos sobre a resposta imune das plantas e o aprimoramento das ferramentas biotecnológicas são fundamentais para o desenvolvimento de culturas mais resistentes ao mofo branco, reduzindo as perdas de produtividade no campo e a sustentabilidade agrícola.

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho clonar os genes de feijão PvPGIP1 e PvPGIP2 em vetores de superexpressão, utilizando-os para transformação genética transiente de planta modelo tabaco (*Nicotiana benthamiana*) e avaliar o grau de resistência das plantas transformadas à infecção de *Sclerotinia sclerotiorum*.

## 2 METODOLOGIA

Vetores comerciais pCambia1301 contendo um gene repórter GUS, um promotor CaMV35S, gene de seleção para canamicina (NPTII), e os genes de interesse PvuPGIP1 (AJ864506.1) e PvuPGIP2 (AJ864507.1) de *Phaseolus vulgaris*, ambos com 999pb, foram previamente sintetizados pela empresa Gene Universal, em Delaware, EUA e utilizados em ensaios de transformação estável (Figura 2.1).

Figura 2.1 — Vetores comerciais pCambia1301



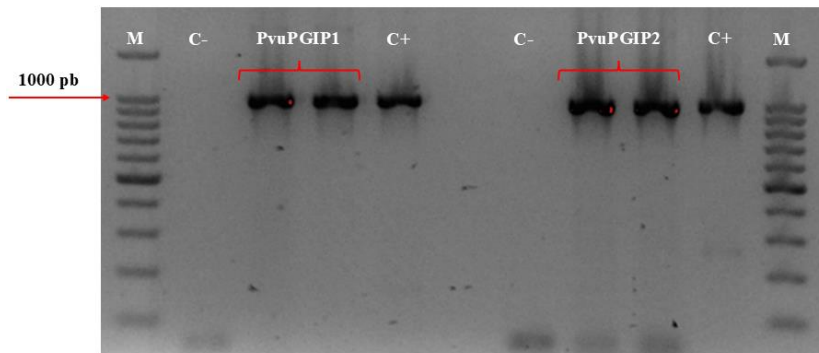
Legenda: A) Vetor com o gene PvuPGIP1 (AJ864506.1). B) Vetor com o gene PvuPGIP2 (AJ864507.1).  
Fonte: Gene Universal (2020)

Com a finalidade de clonar os genes para armazenamento, os plasmídeos contendo PvuPGIP1 e PvuPGIP2 foram inseridos em células competentes de *Escherichia coli* por meio de choque térmico, seguindo o protocolo One Shot TOP 10 (Thermo Fisher Scientific). O antibiótico canamicina, na concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , foi utilizado para a seleção das bactérias transformadas, que foram plaqueadas em meio LB (Luria-Bertani) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por três dias. A inserção dos genes e a clonagem dos plasmídeos foram confirmadas por PCR convencional de colônias. Para a PCR, foram utilizados os primers específicos: GGATCCATGTCTTCAAGCTTAAGCATAATTTTG (Forward – PvuPGIP1), GGATCCTTAAGTGCAGGAAGGAAGAG (Reverse – PvuPGIP1), GGATCCATGTCCTCAAGCCTAAGCAT (Forward – PvuPGIP2) e GGATCCTTAAGTGCAGGCAGGAAGAG (Reverse – PvuPGIP2), na concentração de  $10 \mu\text{M}$ . A reação foi preparada com FIREPol Master Mix  $5\times$  (Solis Biodyne) e um  $1 \mu\text{L}$  da

suspensão da colônia bacteriana. O protocolo de amplificação seguiu as seguintes condições no termociclador: desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com extensão final a 72°C por 7 minutos. Ao término da amplificação, as amostras foram mantidas a 4°C até sua aplicação em gel de agarose (Figura 2.2).

Após essa etapa, parte das colônias transformadas foi utilizada para transformar células competentes de *A. tumefaciens*, enquanto a outra parte foi armazenada em glicerol a -80°C no LCBM.

Figura 2.2 – Confirmação das inserções dos genes em *E. coli*



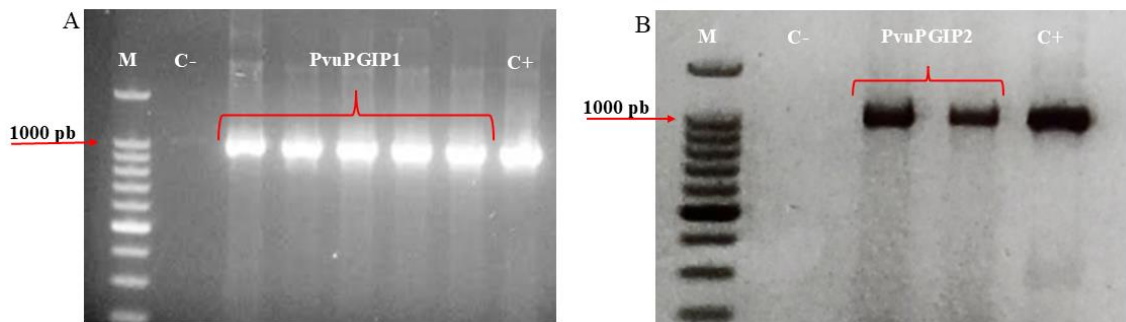
Legenda: Perfil eletroforético dos produtos da PCR em gel de agarose a 1,5%. Confirmação da transformação de *E. coli* competente com os genes PvuPGIP 1 e PvuPGIP2. M: marcador de peso molecular. C-: controle negativo (água). PvuPGIP1: colônias de *E. coli* contendo o gene PvuPGIP1. C+: controle positivo (vetor purificado contendo o gene PvuPGIP1). PvuPGIP2: colônias de *E. coli* contendo o gene PvuPGIP2.

Fonte: Da autora (2025).

A partir dos clones armazenados, o DNA plasmidial da *E. coli* contendo PvuPGIP1 foi extraído por miniprep, utilizando o Kit da Mebep Bioscience (Ludwig Biotec). O DNA extraído foi quantificado e utilizado na transformação de *A. tumefaciens*, repetindo-se o procedimento para PvuPGIP2. O plasmídeo contendo PvuPGIP1 foi introduzido na cepa LBA4404, enquanto PvuPGIP2 foi inserido na cepa AGL1, ambos por meio de eletroporação (2,5 kV, capacitor de 25  $\mu$ F e resistência de 400  $\Omega$ ). Após essa etapa, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo canamicina (50 mg L<sup>-1</sup>), rifampicina (20 mg L<sup>-1</sup>) e estreptomicina (100 mg L<sup>-1</sup>), sendo incubadas no escuro a 28°C por três dias. A transformação foi confirmada por PCR de colônias, conforme reação previamente mencionada, e, após verificação (Figura 2.3), as cepas foram multiplicadas. Parte das culturas foi armazenada a -80°C no LCBM, enquanto o restante foi utilizado nos experimentos subsequentes.

Com o objetivo de avaliar a resposta de PvuPGIP1 e PvuPGIP2 ao mofo branco em tabaco (*Nicotiana benthamiana*), foi realizada a transformação genética transiente por agroinfiltração, segundo metodologia descrita por Lee e Yang (2006). Para isso, sementes de tabaco foram semeadas em substrato “Carolina Soil®” (N = 10; P = 20; K = 24; Cu = 0,05; Fe = 0,25; Mn = 0,08; B = 0,02; Mo = 0,01; Zn = 0,05) e, aos nove dias após a semeadura, as plântulas foram transplantadas para vasos de 300 mL (9 cm × 5 cm) contendo substrato comercial misturado com substrato “Carolina Soil®” na proporção de 1:4. Os vasos foram mantidos a 26°C ± 3°C por quatro semanas, sendo irrigados manualmente até o momento da montagem do ensaio.

Figura 2.3 – Confirmação dos genes em cepas de *Agrobacterium tumefaciens*



Legenda: Visualização em gel de agarose a 1,5%. A) Confirmação da inserção do gene PvuPGIP1 em cinco colônias de LBA4404. B) Confirmação da inserção do gene PvuPGIP2 em duas colônias de AGL01. M: marcador de peso molecular. C-: controle negativo (água). C+: controle positivo (vetor contendo o gene PvuPGIP1 em A e PvuPGIP2 em B).

Fonte: Da autora (2025).

O inóculo fúngico foi preparado a partir de escleródios do isolado UFLA 27 de *S. sclerotiorum*, proveniente da coleção micológica do Laboratório de Resistência a Doenças de Plantas da UFLA. Estes foram repicados para meio BDA contendo o antibiótico cefotaxina (1,2 mL L<sup>-1</sup>) e incubados em B.O.D. a 21°C por cinco dias. Após este período, foram repicadas novas placas de Petri a partir do crescimento deste isolado e incubadas por três a quatro dias antes da inoculação nas plantas.

Nas 24 horas que antecederam a agroinfiltração, colônias bacterianas transformadas com PvuPGIP1 e PvuPGIP2 foram cultivadas em meio líquido LB com seus respectivos antibióticos e incubadas a 28°C e 120 rpm por 24 horas. No dia seguinte, o crescimento bacteriano foi monitorado em espectrofotômetro até atingir OD<sub>600nm</sub> próximo a 0,8. As suspensões foram centrifugadas a 5.000 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano foi ressuspensão em meio de infiltração MI (contendo tampão MES,

MgSO<sub>4</sub>, sacarose e acetoseringona – ANEXO A), calibrado para OD600nm entre 0,7 e 0,8, sendo utilizado na agroinfiltração após 30 minutos.

No dia da agroinfiltração, as plantas foram transferidas para uma sala climatizada a 23°C ± 2°C e submetidas à infiltração com PvuPGIP1 e PvuPGIP2 em solução de meio de infiltração MI. O procedimento foi realizado nas 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> folhas de cada planta, onde foi feita uma leve injúria na face abaxial. Utilizando-se uma seringa de 1 mL sem agulha, a suspensão bacteriana foi injetada gentilmente até saturar o tecido foliar, buscando-se causar o mínimo de injúria mecânica na folha. As plantas foram mantidas no escuro por 24 horas e, após esse período, a 3<sup>a</sup> folha de cada planta foi destacada, disposta em espuma fenólica umedecida com solução Hoagland 45% e acondicionada em gerbox. As folhas foram então inoculadas com discos de 5 mm de diâmetro contendo micélio de *S. sclerotiorum*, sendo cada tratamento devidamente identificado, fechado e mantido em uma sala climatizada a 23°C ± 2°C, com fotoperíodo de 12 horas.

Os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com quatro tratamentos e quatro repetições, sendo: T1) Ø+SS (controle – folhas sem agroinfiltração e sem inoculação); T2) MI+SS (controle – agroinfiltração com meio MI e inoculação de *S. sclerotiorum*); T3) PGIP1+SS (agroinfiltração com PvuPGIP1 e inoculação de *S. sclerotiorum*); e T4) PGIP2+SS (agroinfiltração com PvuPGIP2 e inoculação de *S. sclerotiorum*). As avaliações foram realizadas diariamente por cinco dias após a inoculação (dai), mensurando-se as lesões horizontal e verticalmente. As médias foram submetidas à análise de variância, avaliadas pelo método de agrupamento de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software RStudio. Os ensaios foram repetidos duas vezes.

Após a finalização dos experimentos, os materiais vegetais foram descartados em locais próprios para incineração, e as suspensões bacterianas, assim como os materiais utilizados, foram autoclavados a 121°C e 1 atm por 30 minutos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das agroinfiltrações, analisados por meio do teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, mostraram que os tratamentos com agroinfiltração de PvuPGIP1 e PvuPGIP2 (PGIP1+SS e PGIP2+SS) apresentaram diferença estatística em relação às testemunhas (Ø+SS e MI+SS) nos primeiros três dias de avaliação. Durante esse período, as lesões nas folhas dos tratamentos com os genes foram menores, indicando inibição do crescimento fúngico. Já no

quarto e quinto dia de avaliação, os tamanhos das lesões foram estatisticamente iguais às testemunhas. Contudo, no quarto dia, mesmo não havendo diferença estatística entre os tratamentos, é possível notar no gráfico que as lesões dos tratamentos com os genes ainda seguem com lesões menores que a dos controles, sugerindo que os genes tenham um resquício de expressão contra o fungo. No quinto e último dia de avaliação, os tamanhos das lesões foram semelhantes (Gráfico 2.1).

Além dos dados estatísticos, foi verificado que os sintomas da doença e os sinais do patógeno nas folhas das plantas, independentemente dos tratamentos, manifestaram-se já nas primeiras 24 horas após a inoculação. As lesões iniciaram-se com o apodrecimento do tecido vegetal, seguido pelo aparecimento de micélio e, em alguns casos, pela formação de escleródios, resultando na completa degradação do tecido (Figura 2.4).

A análise dos dados indicou uma redução na expressão dos genes a partir do quarto dia de avaliação, o que está de acordo com a literatura sobre a transformação transiente por agroinfiltração. Estudos anteriores demonstraram que a expressão gênica transiente em células vegetais geralmente atinge seu pico entre o segundo e o quarto dia após a infecção, com subsequente redução tanto na quantidade de células expressando o gene quanto na intensidade dessa expressão (Krenek *et al.*, 2015; Lacroix e Citovsky, 2013; Ma *et al.*, 2012). Este padrão foi observado nos resultados, onde, após o quinto dia, os sintomas da doença tornaram-se igualmente severos nos diferentes tratamentos, abrangendo toda a área foliar em todas as repetições. Em nossas avaliações realizadas em diferentes dias, foi verificado que dentro de cada tratamento ocorreu rápida progressão da doença nas folhas, com um aumento significativo no tamanho das lesões a cada dia, indicando severidade do isolado selecionado.

A expressão dos genes de PvPGIPs e das PGs de *Sclerotinia sclerotiorum* em caules de feijão (*Phaseolus vulgaris*) foi analisada por Oliveira *et al.* (2010) por meio de PCR de transcrição reversa semiquantitativo e PCR em tempo real. Os resultados mostraram que os transcritos de PvuPGIP1 não foram detectados nos estágios iniciais da infecção, surgindo apenas 72 horas após a inoculação. Em contrapartida, PvuPGIP2 foi expresso desde o início da infecção, atingindo seu pico em 48 horas e reduzindo em 72 horas após a inoculação. Esses achados sugerem que, durante a infecção, as endopoligalacturonases fúngicas promovem a liberação de oligogalacturonídeos, que atuam como sinalizadores na ativação das PGIPs.

A diminuição do efeito de inibição a partir do quarto dia pode ser explicada por alguns fatores. No que se refere à transformação transiente, essa redução pode ser atribuída à instabilidade inerente das cópias de T-DNA que não foram integradas nas células vegetais (Krenek *et al.*, 2015; Lacroix e Citovsky, 2013). Um segundo fator é o patossistema do mofo

branco, em feijão, apresentar resistência poligênica ou quantitativa de baixa a moderada herdabilidade com interação entre múltiplos genes e diferentes níveis de influência, que, com efeito do ambiente, resulta em respostas fenotípicas variadas e contínuas no hospedeiro (Alzate-Marin *et al.*, 2005; Kull *et al.*, 2003; Miklas *et al.*, 2001).

Em outros estudos, como o de Joubert *et al.* (2007), foi verificado que a interação do gene VviPGIP1 com a poligalacturonase do fungo *Botrytis cinerea* (BcPG2) resultou na diminuição dos sintomas da doença, corroborando os resultados obtidos neste trabalho, em que mostra a ação das PGIPs na defesa contra patógenos.

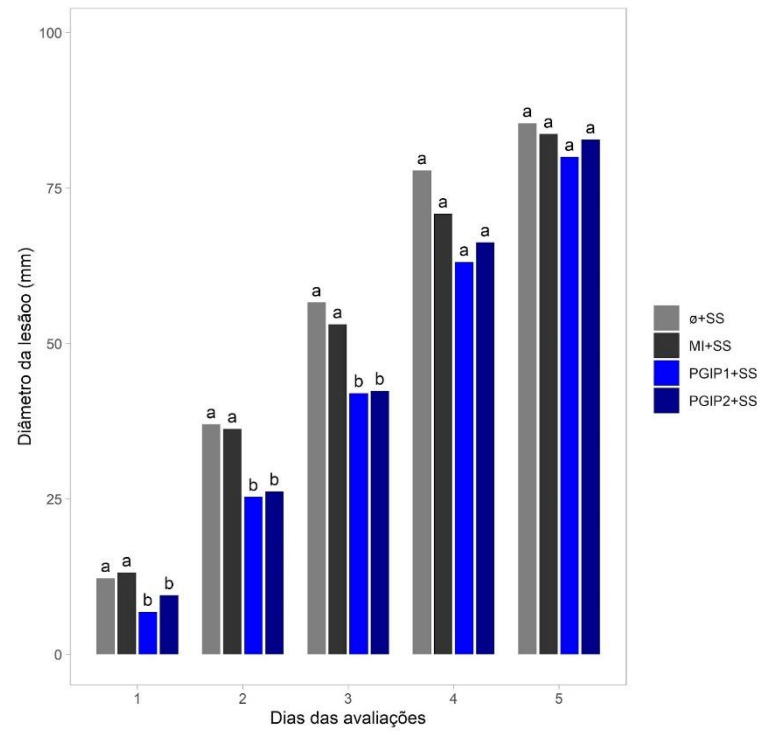
A agroinfiltração por meio de seringa, quando aplicada em outras espécies vegetais, como as folhas de videira, pode apresentar baixa eficiência, resultando na infiltração restrita à área da folha em contato direto com a seringa. Esse comportamento foi observado em experimentos realizados com folhas de videira, onde as técnicas de infiltração por seringa e por vácuo foram utilizadas para avaliar a função dos estilbenos no controle do míldio da videira, causado por *Plasmopara viticola*, além de comparar os resultados entre plantas cultivadas *in vivo* e os ensaios realizados *in vitro*. Nos ensaios, os melhores resultados foram obtidos com a infiltração a vácuo, que permitiu que toda a folha fosse infiltrada, e com as plantas cultivadas *in vitro* (Santos-Rosa *et al.*, 2008).

Os resultados deste estudo demonstram que a agroinfiltração dos genes PvuPGIP1 e PvuPGIP2 em *Nicotiana benthamiana* conferiu inibição do desenvolvimento da doença nos três primeiros dias de infecção do patógeno, com retardo no crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum*, mostrando a expressão transiente dos genes. Essa inibição foi estatisticamente significativa em comparação aos controles, sugerindo a ação de resistência do gene. Com base nessas observações, são necessários estudos complementares que contribuam para o conhecimento acerca da expressão transiente e estável dos genes PvuPGIPs na interação com o patossistema *S. sclerotiorum* em diferentes culturas.

Novos testes na planta *in vivo* podem contribuir para a busca de resultados que corroborem com os obtidos *in vitro* e aumentem os conhecimentos sobre a patogenicidade do fungo em PGIP superexpressada. Além desses, a agroinfiltração em folhas de feijão e a análise de expressão gênica das folhas agroinfiltradas, configuram passos a serem dados no entendimento da interação entre a planta e o patógeno.

A aplicação integrada de ferramentas genômicas e moleculares, aliada ao avanço das pesquisas, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético mais eficazes, visando à resistência duradoura ao mofo branco em diferentes culturas agrícolas.

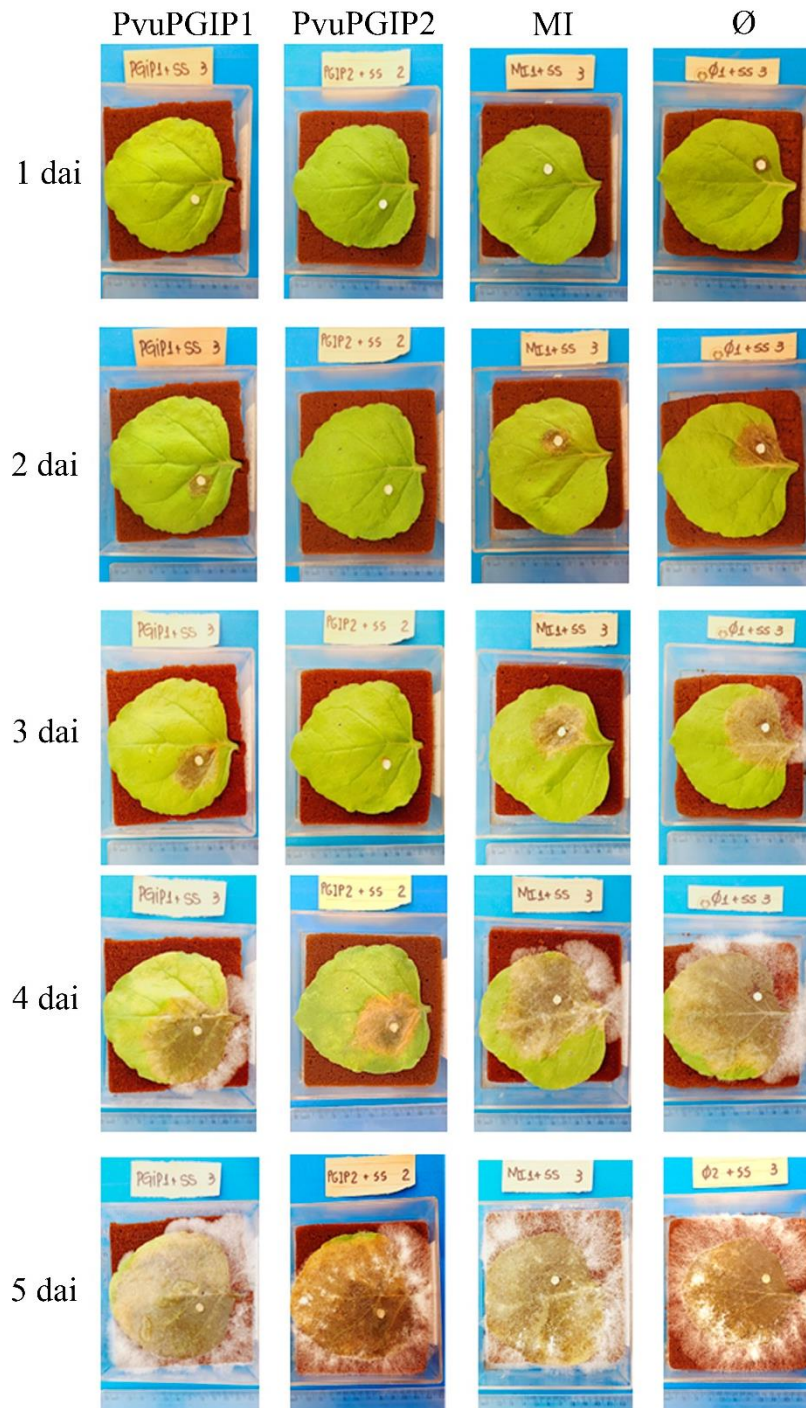
Gráfico 2.1 — Progresso do mofo branco no tempo.



Legenda: Avaliação diária do crescimento das lesões de mofo branco em folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com os genes PvuPGIP1 e PvuPGIP2 ao longo de cinco dias. A análise de variância das médias dos dois ensaios foi realizada pelo teste de agrupamento de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade. Ø+SS e MI+SS representam os controles; PGIP1+SS e PGIP2+SS representam os tratamentos agroinfiltrados com os genes.

Fonte: Da autora (2025).

Figura 2.4 – Desenvolvimento do mofo branco no tabaco agroinfiltrado



Legenda: Amostras das repetições de cada tratamento durante os cinco dias de avaliações após a inoculação (dai). PvuPGIP1: folha de tabaco agroinfiltrada com o gene PvuPGIP1. PvuPGIP2: folha de tabaco agroinfiltrada com o gene PvuPGIP2. MI: folha de tabaco infiltrada apenas com o meio de infiltração. Ø: controle sem infiltração.

Fonte: Da autora (2025).

## REFERÊNCIAS

- ALZATE-MARIN, A. L. *et al.* **Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja.** Fitopatologia Brasileira, [s.l.], v. 30, n. 4, p. 333–342, 2005. DOI: 10.1590/S0100-41582005000400001.
- ANDRADE, G. M.; SARTORETTO, L. M.; BRASILEIRO, A. C. M. **Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp.** Fitopatologia Brasileira, [s.l.], v. 28, n. 5, p. 465–476, 2003. DOI: 10.1590/s0100-41582003000500001.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. **Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*.** Canadian Journal of Plant Pathology, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 93–108, 1994. DOI: 10.1080/07060669409500766.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. ***Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen.** Molecular Plant Pathology, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x.
- CHAUHAN, S. *et al.* **Screening and identification of resistant sources against *Sclerotinia sclerotiorum* causing white mold disease in common bean.** Crop Science, [s.l.], v. 60, n. 4, p. 1986–1996, 2020. DOI: 10.1002/csc2.20160.
- JOUBERT, D. A. *et al.* **A polygalacturonase-inhibiting protein from grapevine reduces the symptoms of the endopolygalacturonase BcPG2 from *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana* leaves without any evidence for *in vitro* interaction.** Molecular Plant-Microbe Interactions, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 392–402, 2007. DOI: 10.1094/MPMI-20-4-0392.
- KRENEK, P. *et al.* **Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications.** Biotechnology Advances, [s.l.], v. 33, n. 6, p. 1024–1042, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.012.
- KULL, L. S. *et al.* **Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean.** Plant Disease, [s.l.], v. 87, n. 12, p. 1471–1476, 2003. DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.12.1471.
- KUMAR, S. *et al.* **Biochemical changes, antioxidative profile, and efficacy of the bio-stimulant in plant defense response against *Sclerotinia sclerotiorum* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.).** Heliyon, [s.l.], v. 10, n. 1, p. e23030, 2024. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e23030.
- LACROIX, B.; CITOVSKEY, V. **The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation.** The International Journal of Developmental Biology, [s.l.], v. 57, n. 6-7-8, p. 467–481, 2013. DOI: 10.1387/ijdb.130199bl.
- LEE, M. W.; YANG, Y. **Transient expression assay by agroinfiltration of leaves.** Arabidopsis protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 225-229. DOI:10.1385/1-59745-003-0:225

- LEHNER, M. S. *et al.* **Adaptation and resistance to diseases in Brazil of putative sources of common bean resistance to white mold.** *Plant Disease*, [s.l.], v. 99, n. 8, p. 1098–1103, 2015. DOI: 10.1094/PDIS-09-14-0939-RE.
- LI, H. *et al.* **Knockout of the virus replication-related genes UBEF1B and CCR4/NOT3 by CRISPR/Cas9 confers high-efficiency and broad-spectrum resistance to geminiviruses in *Nicotiana benthamiana*.** *Plant Biotechnology Journal*, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 793–795, 2024. DOI: 10.1111/pbi.14265.
- LIMA, R. C. *et al.* **Strategy to identify resistance to white mould associated with high yield for irrigated common bean in Brazil.** *Plant Pathology*, [s.l.], v. 69, n. 6, p. 1172–1184, 2020. DOI: 10.1111/ppa.13181.
- MA, L. *et al.* **The use of agroinfiltration for transient expression of plant resistance and fungal effector proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves.** *Plant fungal pathogens: methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. p. 61-74. DOI: 10.1007/978-1-61779-501-5\_4.
- MAJUMDAR, A. **Molecular techniques for the improvement of microbial biocontrol agents against plant pathogens.** *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 103, 2023. DOI: 10.1186/s41938-023-00746-4.
- MIKLAS, P. N. *et al.* **QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean.** *Crop Science*, [s.l.], v. 41, n. 2, p. 309–315, 2001. DOI: 10.2135/cropsci2001.412309x.
- MIKLAS, P. N. *et al.* **Characterization of white mold disease avoidance in common bean.** *European Journal of Plant Pathology*, [s.l.], v. 135, n. 3, p. 525–543, 2013. DOI: 10.1007/s10658-012-0153-8.
- MILA, A. L.; YANG, X. B. **Effects of fluctuating soil temperature and water potential on *Sclerotia* germination and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum*.** *Plant Disease*, [s.l.], v. 92, n. 1, p. 78–82, 2008. DOI: 10.1094/PDIS-92-1-0078.
- MURMU, S. *et al.* **In silico study of E169G and F242K double mutations in leucine-rich repeats (LRR) polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) of *Gossypium barbadense* and associated defense mechanism against plant pathogens.** *Journal of Cotton Research*, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 3, 2025. DOI: 10.1186/s42397-024-00203-z.
- OLIVEIRA, M. B. *et al.* **Characterization of the dry bean polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) gene family during *Sclerotinia sclerotiorum* (Sclerotiniaceae) infection.** *Genetics and Molecular Research*, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 994–1004, 2010. DOI: 10.4238/vol9-2gmr776.
- PURDY, L. H. ***Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution and impact.** *Phytopathology*, [s.l.], v. 69, n. 8, p. 875–880, 1979.
- RANA, K. *et al.* ***Sclerotinia sclerotiorum* Thioredoxin1 (SsTrx1) is required for pathogenicity and oxidative stress tolerance.** *Molecular Plant Pathology*, [s.l.], v. 22, n. 11, p. 1413–1426, 2021. DOI: 10.1111/mpp.13127.

REICH, J. *et al.* **Occurrence of ascospores and white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in dry bean fields in Alberta, Canada.** *Plant Disease*, [s.l.], v. 107, n. 12, p. 3754–3762, 2023. DOI: 10.1094/PDIS-11-22-2529-RE.

SANTOS-ROSA, M. *et al.* **Development of a transient expression system in grapevine via agroinfiltration.** *Plant Cell Reports*, [s.l.], v. 27, n. 6, p. 1053–1063, 2008. DOI: 10.1007/s00299-008-0531-z.

SCHWARTZ, H. F.; SINGH, S. P. **Breeding common bean for resistance to white mold: A review.** *Crop Science*, [s.l.], v. 53, n. 5, p. 1832–1844, 2013. DOI: 10.2135/cropsci2013.02.0081.

STEADMAN, J.R. **White mold - A serious yield-limiting disease of bean.** *Plant Disease*, [s.l.], v. 67, n. 4, p. 346–350, 1983. DOI: 10.1094/PD-67-346.

<b>Artigo 3 - Elaborado conforme a norma NBR 6022</b>	
Título do artigo:	Análise genômica ampla de poligalacturonases GH28 em fungos fitopatogênicos
Autores:	Maria Clara Carli Yasmin Maciel Meireles Costa Welison Andrade Pereira



### ARTIGO 3 - Análise genômica ampla de poligalacturonases GH28 em fungos fitopatogênicos

### ARTICLE 3 - Genome-wide analysis of GH28 polygalacturonases in phytopathogenic fungi<sup>3</sup>

Maria Clara Carli  
Yasmin Maciel Meireles Costa

**Resumo:** As poligalacturonases (PGs) são enzimas da família GH28 secretadas por fungos fitopatogênicos com a função de degradação da parede celular do hospedeiro durante a infecção no tecido vegetal. Neste estudo, foram analisadas 115 proteínas da família GH28 provenientes de dez espécies de fungos fitopatogênicos, caracterizando-as quanto às suas propriedades, localização subcelular, filogenia, estrutura tridimensional, motivos e domínios conservados. As proteínas foram classificadas em cinco tipos distintos—endopoligalacturonases (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonases (EC 3.2.1.67), exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidases (EC 3.2.1.82), ramnogalacturonases (EC 3.2.1.171) e endo-xilogalacturonase hidrolases (EC não especificado)—e organizadas em sete clados filogenéticos. O domínio Glicosil-Hidrolase foi altamente conservado em todas as proteínas analisadas. Além disso, os motivos conservados NTD, DD, GHG e RIK foram identificados em todas as endopoligalacturonases e em algumas exoPGs, sendo estes responsáveis pela interação entre as PGs e PGIPs. A localização subcelular das proteínas foi predominantemente extracelular, e suas estruturas tridimensionais apresentaram a arquitetura típica das proteínas GH28, caracterizada por dez voltas completas formadas por folhas- $\beta$  paralelas e a presença de  $\alpha$ -hélices. Os resultados deste estudo fornecem evidências sobre as adaptações dos fungos na interação planta-patógeno e podem contribuir para pesquisas futuras voltadas ao desenvolvimento de cultivares com maior resistência a doenças.

**Palavras-chave:** filogenia; estrutura tridimensional, interação PG-PGIP; motivos conservados; pectina

**Abstract:** Polygalacturonases (PGs) are GH28 family enzymes secreted by phytopathogenic fungi, playing a key role in degrading the host cell wall during infection in plant tissues. In this study, 115 GH28 proteins from ten species of phytopathogenic fungi were analyzed and characterized based on their properties, subcellular localization, phylogeny, three-dimensional structure, conserved motifs, and domains. The proteins were classified into five distinct types—endopolygalacturonases (EC 3.2.1.15), exopolygalacturonases (EC 3.2.1.67), exo-poly- $\alpha$ -galacturonosidases (EC 3.2.1.82), rhamnogalacturonases (EC 3.2.1.171), and endoxylogalacturonase hydrolases (EC unspecified)—and grouped into seven phylogenetic clades.

<sup>3</sup> Artigo científico apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

The Glycosyl Hydrolase domain was highly conserved among all analyzed proteins. Additionally, the conserved motifs NTD, DD, GHG, and RIK, which are involved in PG-PGIP interactions, were identified in all endopolygalacturonases and some exoPGs. The subcellular localization of these proteins was predominantly extracellular, and their three-dimensional structures exhibited the typical GH28 protein architecture, characterized by ten complete turns formed by parallel  $\beta$ -sheets and the presence of  $\alpha$ -helices. The findings of this study provide insights into fungal adaptations in plant-pathogen interactions and may contribute to future research aimed at developing disease-resistant crop cultivars.

**Keywords:** phylogeny; tridimensional structure, PG-PGIP interaction, conserved motifs pectin.

## 1 INTRODUÇÃO

A pectina é um dos constituintes mais importantes da lamela média e da parede celular dos tecidos vegetais, desempenhando funções essenciais relacionadas à estrutura, ao crescimento e à defesa das plantas, atuando como uma barreira física. Quimicamente, a pectina é composta por um polímero de ácido D-galacturônico, ligado em  $\alpha$ -1,4 (conhecido como homogalacturona), que se alterna com cadeias laterais de ramnose e xilose (Mohnen, 2008; Willats; Knox; Mikkelsen, 2006).

Durante o processo de infecção, os patógenos secretam um complexo de enzimas com o potencial de degradar a parede celular (CWDEs, do inglês cell wall-degrading enzymes), despolimerizando a pectina, permitindo assim a liberação de nutrientes para o patógeno (Klößner *et al.*, 2018; Villarreal *et al.*, 2022). Em síntese, essas enzimas CWDEs são uma combinação de esterases, liases e hidrolases (Van Den Brink e De Vries, 2011). A poligalacturonase (PG) destaca-se por sua ação hidrolítica, catalisando a quebra do polímero de ácido  $\alpha$ -1,4-poligalacturônico (Van Den Brink e De Vries, 2011; Carpita e Gibeaut, 1993).

As PGs pertencem à família das glicosídeo-hidrolases 28 (GH28), uma das maiores famílias de hidrolases envolvidas na despolimerização da pectina (Kim *et al.*, 2006). Essa família pode ser subdividida em diferentes classes com base na especificidade catalítica.

Segundo Markovič e Janeček (2001), as poligalacturonases (PGs) se subdividem em várias classes com base na especificidade de suas ações catalíticas. As endo-poligalacturonases (endo-PGs, EC 3.2.1.15) catalisam a clivagem hidrolítica aleatória das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 do ácido D-galacturônico, gerando pectatos e outras galacturonas ao longo da cadeia. As exo-poligalacturonases (exo-PGs, EC 3.2.1.67) realizam a clivagem hidrolítica das ligações terminais  $\alpha$ -1,4, removendo um único resíduo de ácido poligalacturônico da extremidade não redutora, ou seja, a ponta da cadeia onde o carbono anomérico da unidade terminal está ligado a outro monômero e não está livre para atuar como redutor. Já as exo-poli-poligalacturonases (exo-poli-PGs, EC 3.2.1.82) catalisam a remoção hidrolítica de dois resíduos de ácido galacturônico também a partir da extremidade não redutora do galacturonato. As ramno-poligalacturonases (ramno-PGs, EC 3.2.1.171) atuam na clivagem das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,2 entre o ácido D-galacturônico e a L-ramnose, enquanto as endo-xilogalacturonano hidrolases (EC 3.2.1.-) catalisam a clivagem hidrolítica aleatória das ligações entre o ácido D-galacturônico e a L-xilose.

Essas classificações refletem a diversidade funcional das PGs na degradação de diferentes componentes da parede celular vegetal.

Embora sejam produzidas por plantas, bactérias e fungos (Sprockett; Piontkivska; Blackwood, 2011), as PGs destes últimos, desempenham papel crucial na patogenicidade e virulência, em grande parte devido à abundância e diversidade de genes da família GH28 (Haeger *et al.*, 2020; Reignault; Valette-Collet; Boccara, 2007; Zhao *et al.*, 2013). Diversos estudos têm investigado a produção de PGs por fungos como *Aspergillus niger*, *Ustilago maydis*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Verticillium dahliae*, destacando a relevância das endo-PGs da família GH28 (Castruita-Domínguez *et al.*, 2014; Dong e Wang, 2015; Gacura *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2023; Niture, 2008; Park *et al.*, 2008; Sprockett; Piontkivska; Blackwood, 2011). Em várias dessas espécies, endo-PGs da família GH28 já foram identificadas e caracterizadas (Liu *et al.*, 2023).

Do ponto de vista estrutural, as PGs de microrganismos apresentam uma conformação típica em hélice beta paralela destrógira e contêm quatro regiões conservadas no sítio ativo, denominadas motivos I, II, III e IV, dispostas sequencialmente a partir da região N-terminal: NTD, DD, GHG e RIK (Markovič e Janeček, 2001). Esses resíduos são altamente conservados na família GH28 (Markovič e Janeček, 2001; Mertens; Burdick; Rooney, 2008; Niture, 2008) e estão intimamente ligados à afinidade da enzima pelo ácido galacturônico da pectina (André-Leroux; Tessier; Bonnin, 2009). Especificamente, a interação entre a proteína e seu substrato ocorre por meio dos aminoácidos His188 (do motivo GHG), Arg267 e Lys269 (do motivo RIK), situados na fenda do sítio ativo (Federici *et al.*, 2001; Niture, 2008).

Dentro do contexto deste estudo, há duas possibilidades interessantes de interação envolvendo o sítio ativo da PG. Em uma, o sítio atua na interação com a pectina da parede celular, permitindo sua hidrólise pelo fungo; na outra, ocorre a interação entre a PG e a PGIP, mecanismo de defesa da planta que compete com a pectina pelo mesmo sítio ativo, inibindo a ação hidrolíticas (Federici *et al.*, 2001). Em endoPGs típicas, esse sítio ativo está localizado em uma fenda em forma de túnel, que possibilita a ligação ao polissacarídeo e a geração dos fragmentos pécticos denominados oligogalacturonídeos (OGs) (Safran *et al.*, 2023).

Apesar do avanço nas pesquisas sobre os mecanismos de interação planta-patógeno envolvendo as PGs e na caracterização da degradação da pectina por fungos (Federici *et al.*, 2001; Gacura *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2024; Xu *et al.*, 2020), ainda há lacunas no entendimento de interações específicas, sobretudo no contexto dos mecanismos moleculares de defesa da planta. Assim, é fundamental aprofundar o conhecimento sobre esses mecanismos para aplicá-lo como ferramenta no controle efetivo de doenças em plantas.

Neste trabalho, realizou-se uma análise genômica abrangente de 115 genes e proteínas da família GH28, provenientes de fungos fitopatogênicos, cujas poligalacturonases têm sua ação reduzida por inibidores de poligalacturonase (PGIPs) de plantas.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Identificação das PGs e obtenção das sequências

Para a identificação e seleção das poligalacturonases (PGs) deste estudo, realizou-se uma revisão da literatura para listar fungos fitopatogênicos relevantes que afetam espécies de plantas de importância agrônômica. Esses fungos foram classificados taxonomicamente em reino, filo, classe, ordem e família, utilizando o GBIF para consulta - Global Biodiversity Information Facility (<https://www.gbif.org>) (Tabela S3.1). Paralelamente, as plantas foram avaliadas quanto à síntese de proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs).

Uma vez delimitado o conjunto de patossistemas em que se constatou a presença de PGs produzidas pelos fungos e de PGIPs sintetizadas pelas plantas, iniciou-se a busca pelas poligalacturonases desses fitopatógenos. Para a determinação do conjunto de proteínas da família GH28 neste estudo, primeiramente foram baixados arquivos em formato “.fasta” contendo todas as proteínas das espécies de fungos selecionadas, a partir do MycoCosm (<https://mycoCosm.jgi.doe.gov/mycoCosm/home>) (Grigoriev *et al.*, 2011). Simultaneamente, recuperaram-se sequências anotadas de proteínas GH28 a partir do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para as seguintes categorias: endopoligalacturonase (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonase (EC 3.2.1.67), exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidase (EC 3.2.1.82), ramnogalacturonase (EC 3.2.1.171) e endo-xilogalacturonase hidrolase (EC não especificado).

A partir dos conjuntos de proteínas baixados para cada categoria GH28, foram construídos modelos ocultos de Markov (HMMs) que, posteriormente, foram empregados para escanear os arquivos de proteínas das espécies de fungos patogênicos. Utilizando um limiar de E-value de 0,01, as proteínas identificadas foram classificadas em uma das cinco categorias GH28 previamente determinadas. Quando uma mesma proteína foi atribuída a mais de uma categoria, prevaleceu a classificação associada ao menor E-value..

## 2.2 Análise filogenética

As sequências de aminoácidos das proteínas selecionadas (Tabela S3.2) foram alinhadas utilizando a ferramenta MUSCLE disponível no software MEGA 11 (<http://www.megasoftware.net>). Em seguida, foi construída uma árvore filogenética pelo método Neighbor-Joining (NJ), com 1000 repetições de bootstrap, empregando o modelo JTT (Jones-Taylor-Thornton) (Tamura; Stecher; Kumar, 2021).

Como grupo externo, utilizou-se uma sequência de GH28 (Pfr\_1400292) da espécie *Perenniporia fraxinea*, escolhida devido à sua distinta distância evolutiva em relação aos demais fungos analisados e por representar um membro da ordem Polyporales. As sequências de aminoácidos e nucleotídeos desta espécie foram obtidas a partir do MycoCosm (<https://myco cosm.jgi.doe.gov/myco cosm/home>).

## 2.3 Propriedades das proteínas

Com base nas sequências de aminoácidos das proteínas, foram investigadas diversas características referentes às suas propriedades bioquímicas, tais como, o peso molecular (Mw), ponto isoelétrico (pI), e valor médio de hidropaticidade (Gravy), utilizando ferramentas disponíveis on-line (<https://www.bioinformatics.org/sms2/>). Adicionalmente, a composição centesimal dos aminoácidos foi calculada pelo Microsoft Excel e os resultados utilizados para construção de um HeatMap.

## 2.4 Localização subcelular

Para prever a localização subcelular das proteínas GH28, as sequências de aminoácidos foram analisadas utilizando a ferramenta online CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) (Yu *et al.*, 2006). Com base nos resultados, foi gerado um HeatMap que indica as localizações mais prováveis das proteínas dentro das células.

Simultaneamente à presença de peptídeo sinal, segmento com significativa importância para polipeptídeos secretados para o espaço extracelular, a presença de domínios transmembrana nas proteínas foi avaliada por meio de diversas ferramentas: PROTTER (<https://wlab.ethz.ch/protter/start/>) (Omasits *et al.*, 2014), TMHMM (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (Möller; Croning; Apweiler, 2001), CCTOP (<https://cctop.ttk.hu/>), TOPCONS (<https://topcons.cbr.su.se/>) (Tsirigos *et al.*, 2015) e

SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) (Almagro Armenteros *et al.*, 2019). Como critério para a confirmação da presença de um domínio transmembrana, exigiu-se que a predição fosse corroborada por, pelo menos, três das ferramentas utilizadas.

## 2.5 Estrutura tridimensional das poligalacturonases

A configuração espacial das poligalacturonases foi predita utilizando a ferramenta AlphaFold (<https://colab.research.google.com/github/deepmind/alphafold/blob/main/notebooks/AlphaFold.ipynb>), e as imagens tridimensionais foram posteriormente analisadas com o auxílio do software PyMol. Adicionalmente, a quantificação das estruturas secundárias,  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ , de cada proteína foi realizada de forma individual por meio da ferramenta online Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley *et al.*, 2015).

## 2.6 Domínios e motivos conservados

Para investigar o repertório e a distribuição dos domínios proteicos das proteínas selecionadas, utilizou-se o recurso online CDD-NCBI, adotando o banco de dados Pfam (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) (Lu *et al.*, 2020), com as configurações padrão e um E-value de 0,01. A presença do domínio GH28 (Pfam00295), característico das poligalacturonases (PGs), foi estabelecida como critério obrigatório para a inclusão das proteínas nesta pesquisa. Os resultados foram ilustrados utilizando recursos do TBtools (Chen *et al.*, 2020).

Além dos domínios proteicos, avaliou-se a existência de motivos estruturais nas PGs por meio da ferramenta online MEME Suite – Multiple EM for Motif Elicitation (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) (Bailey *et al.*, 2015). A busca foi configurada para identificar 15 motivos, com comprimentos variando de 6 a 50 resíduos de aminoácidos. Em seguida, para estabelecer a relação entre os domínios conservados e os motivos identificados pelo MEME, utilizou-se a ferramenta InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Paysan-Lafosse *et al.*, 2023).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Identificação e caracterização das proteínas PGs

Foram obtidas 114 sequências de aminoácidos correspondentes às proteínas da família GH28 de espécies de fungos patogênicos, além da sequência Pfr\_1400292, de *Perenniporia fraxinea*, utilizada como grupo externo. Dentre as espécies, *Aspergillus niger* foi a fonte com o maior número de sequências (20), enquanto *Cochliobolus sativus* apresentou o menor número (4). Observou-se uma predominância do filo Ascomycota, que compôs 84,35% do total, seguido pelo filo Basidiomycota (15,65%), representado por *Rhizoctonia solani* e *Perenniporia fraxinea*.

Todas as espécies analisadas apresentaram proteínas classificadas como endo e exoPGs. Destaca-se que apenas *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* produziram exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidas. Em contraste, *Cochliobolus sativus* se diferenciou ao apresentar exclusivamente endo e exoPGs, enquanto as demais espécies exibiram uma variedade maior de poligalacturonases. Assim, a distribuição das classes de poligalacturonases neste estudo foi a seguinte: 45,21% de exopoligalacturonases, 33,04% de endopoligalacturonases, 14,79% de ramnogalacturonases, 5,22% de xilogalacturonases e, finalmente, 1,74% de exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidas (Tabela S3.3).

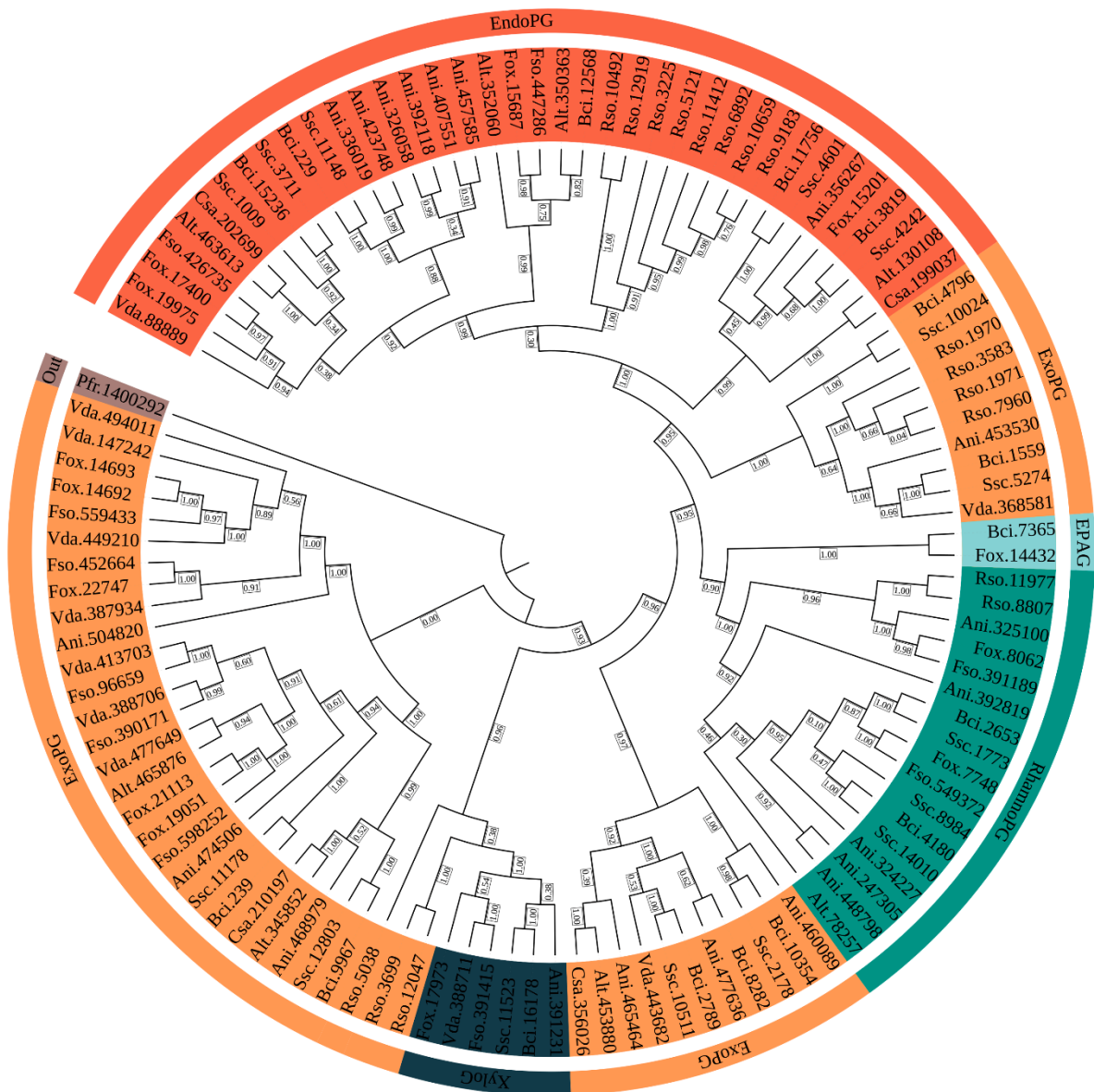
#### 3.2 Análise filogenética

A árvore filogenética, construída a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos, revelou sete clados distintos além do grupo externo (Figura 3.1). Esses clados foram organizados de acordo com a classificação da família GH28, abrangendo endopoligalacturonases (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonases (EC 3.2.1.67), exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidas (EC 3.2.1.82), ramnogalacturonases (EC 3.2.1.171) e endo-xilogalacturonase hidrolases (EC não especificado).

Ao observar a disposição da árvore, a partir do grupo externo, nota-se a existência de dois subclados bem definidos de exoPGs, além de um terceiro subclado que, iniciado pela sequência Rso\_5038 (classificada como exoPG), se organiza juntamente com o clado das endo-xilogalacturonase hidrolases. Este último clado, composto por 6 proteínas, posiciona-se entre dois grupos de exoPGs, um grupo maior com 31 proteínas e outro menor com 11 proteínas.

A distribuição das proteínas de diferentes espécies no cladograma mostra que os clados correspondentes aos grupos de endoPGs e exoPGs incluem, em geral, pelo menos uma proteína de cada espécie estudada. Um destaque adicional é que apenas os fungos *Cochliobolus sativus* e *Verticillium dahliae* não possuem proteínas representadas no grupo das ramnogalacturonases. Por sua vez, embora o clado das endo-xilogalacturonase hidrolases seja pequeno, ele foi identificado em todas as espécies, com exceção de *Alternaria alternata*, *Cochliobolus sativus* e *Rhizoctonia solani*.

Figura 3.1 — Árvore filogenética de poligalacturonases



Legenda: As proteínas foram distribuídas na árvore filogenética de acordo com suas classificações dentro da família GH28.

Fonte: Da autora (2025)

### 3.3 Propriedades das proteínas

As propriedades das proteínas analisadas apresentaram variações significativas. O tamanho variou desde 247 aminoácidos na proteína Rso\_3699 (classificada como exoPG), refletindo o menor peso molecular (26,66 kDa), até 997 aminoácidos na proteína Ani\_504820 (também exoPG), que apresentou o maior peso molecular (110,94 kDa). Em média, as proteínas contêm aproximadamente 424 aminoácidos. O ponto isoelétrico também variou consideravelmente, indo de 3,71 na proteína Ani\_336019 até 9,42 na Fox\_15687. The grand average of hydropathicity (Gravy) também oscilou, desde -0,464, em Bci\_3819, até 0,256, em Fox\_14693 (Tabela S3.4). Quanto à composição das sequências, os aminoácidos glicina (G), serina (S) e treonina (T) foram os mais abundantes, enquanto triptofano (W) e metionina (M) foram os menos frequentes (Figura 3.2) (Tabela S3.5).

### 3.4 Localização subcelular

De acordo com as predições realizadas pelo programa online CELLO, a localização na região extracelular foi confirmada para a maioria das proteínas deste estudo, correspondendo a 94,78% dos casos (Figura 3.3) (Tabela S3.6). Para as demais, outros locais de atuação foram preditos. Quatro proteínas (3,48%), foram preditas para o citoplasma (Fox\_14432, Ani\_504820, Fox\_14693 e Vda\_147242), uma proteína (Bci\_7365) foi associada à membrana plasmática (0,87%) e outra (Alt\_465876) ao núcleo (0,87%), o que se torna indicativo de adaptações funcionais.

Dada a indicação de localização extracelular, a presença de peptídeo sinal foi investigada e detectada em 84,35% das proteínas, conforme as ferramentas PROTTER, TMHMM, CCTOP, TOPCONS e SignalP. Utilizando as mesmas ferramentas e CCTOP, a presença de domínios transmembrana foi confirmada em apenas três proteínas (Rso\_10659, Ani\_477636 e Vda\_494011), o que representa 2,61% do total. Curiosamente, segundo as predições do PROTTER, SignalP e TOPCONS, essas três proteínas não possuem peptídeo sinal (Tabela S3.7).

### 3.5 Estrutura tridimensional das poligalacturonases

Para uma compreensão detalhada da arquitetura tridimensional das poligalacturonases e identificação de características estruturais essenciais, como a organização dos sítios ativos e

a distribuição dos motivos conservados, buscou-se analisar as estruturas secundárias de cada proteína pelo Phyre2. Estas análises indicaram que, em média, as PGs possuem 5,54% de  $\alpha$ -hélices e 49,41% de folhas- $\beta$  (Figuras 4A-B; Tabela S3.8). Utilizando o software PyMol, as imagens geradas permitiram visualizar detalhadamente as estruturas secundárias, com destaque para as  $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$ , fenda associada aos sítios ativos e o conjunto de motivos conservados (Figuras 4C, 4D, 4E e 4F). De acordo com o modelo estrutural apresentado pela proteína Fox\_17400, as proteínas da família GH28 exibem dez voltas completas na estrutura de folhas- $\beta$  paralela, cada volta composta por três folhas- $\beta$ , configurando a arquitetura típica deste grupo enzimático.

### 3.6 Domínios e motivos conservados

Na análise dos domínios conservados, foram observadas diversas particularidades. O domínio Glyco\_hydro\_28, característico das poligalacturonases, foi identificado em 100% das proteínas avaliadas. Em seguida, o domínio Pectate\_lyase\_3 apareceu em 9,57% das proteínas, ocorrendo exclusivamente nas ramnogalacturonases. O domínio Beta\_helix mostrou-se predominante no grupo das endoPGs, ou seja, em proteínas evolutivamente mais recentes, não sendo predito nas ramnogalacturonases, nas xilogalacturonases e nas exoPGs dos clados V e VII (Tabela S3.9).

Outros domínios foram detectados, tais como NosD, DUF5585, TRP\_N, ML, DUF3237, DUF383, cobW, CobW\_C e P-loop NTPase, cada um aparecendo de forma única em proteínas específicas (Figura 5).

No que diz respeito aos motivos estruturais, o programa MEME gerou 15 motivos (Figura 6), dos quais os motivos 1, 2, 4, 7 e 14 estão presentes em todas as 115 proteínas analisadas. Dentre esses, destacam-se os motivos 1, 2, 4 e 5, que contêm, respectivamente, os resíduos conservados NTD, DD, GHG e RIK, elementos fundamentais da família GH28 (Figura 7). Embora o motivo 5 contenha a sequência conservada RIK, essa sequência não foi encontrada nas proteínas classificadas como exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidases (Bci\_7365 e Fox\_14432). O motivo 11 chamou atenção por estar presente exclusivamente nas endopoligalacturonases e no grupo externo.

O MEME produziu 15 logotipos que permitem aferir a distribuição e a frequência dos aminoácidos ao longo de cada motivo, refletindo o nível de conservação em posições específicas (Figura 8). Ao analisar esses motivos com a ferramenta online InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), constatou-se que os motivos 6, 10 e 11 correspondem ao

domínio de pectina liase, sendo que o motivo 11 também está relacionado ao domínio Glyco\_hydro\_28 (Tabela S3.10).

No alinhamento múltiplo das sequências, observou-se o seguinte padrão nos diferentes clados. No Clado I, das endopoligalacturonases, a maioria das proteínas contém os quatro motivos conservados: NTD, DD, GHG e RIK. Exceções foram a proteína Rso\_6892, que apresenta ausência do motivo NTD, e a proteína Rso\_3223, que não possui o motivo RIK. No Clado II, das exopoligalacturonases (exoPGs), foram identificados os motivos NTD e DD, com variações no motivo GHG, que em algumas proteínas aparece como xHG (onde “x” pode ser T ou S). O motivo IV foi identificado como RFK. No que se refere ao clado III, que abrange as exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidases, observou-se uma alteração no segundo resíduo do motivo I, passando de NTD para NGD, mantendo-se o motivo II, apresentando-se uma variação no motivo III (de GHG para THG) e com ausência completa do motivo IV (RIK).

No clado IV, relacionado às ramnogalacturonases, constatou-se uma escassez dos motivos conservados típicos da família GH28. Apenas a proteína Ani\_325100 exibiu o motivo NTD, enquanto três outras – Ani\_247305, Ani\_448798 e Alt\_78257 – apresentaram o motivo III. No clado V, as exopoligalacturonases contêm os motivos NTD e DD, embora a proteína Ani\_465464 não possua o motivo II. As endo-xilogalacturonase hidrolases do clado VI apresentam os motivos I e II, com uma variação no motivo III (de GHG para SHG) e outra no motivo IV (de RIK para GIK).

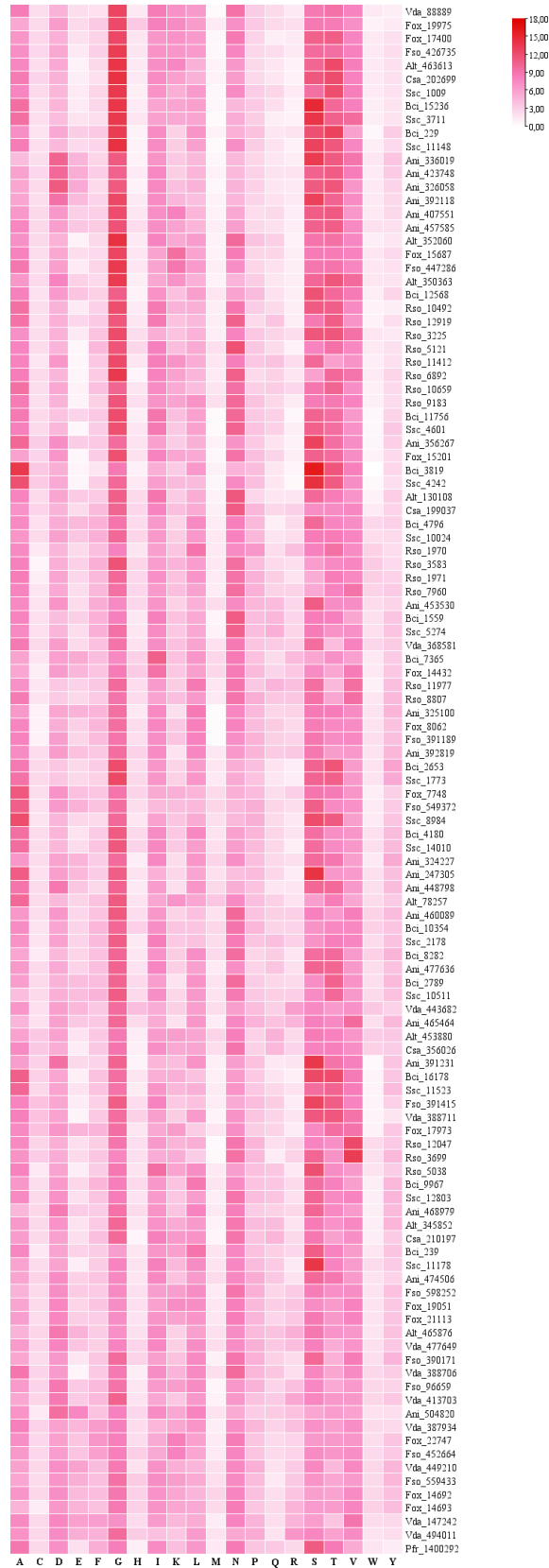
Por fim, as exopoligalacturonases do clado VII foram caracterizadas por variações em todos os quatro motivos conservados. O motivo I apresentou uma variação no segundo resíduo (NxD), com as variantes A, T, S e G. O motivo II permaneceu conservado na maioria das proteínas, exceto por uma alteração no primeiro resíduo (de DD para LD) na proteína Bci\_9967.

O motivo III também mostrou variações, apresentando S ou T na forma xHG, enquanto, no motivo IV, seis proteínas exibiram a alternativa RLK em vez de RIK.

Essa análise dos motivos conservados revela a diversidade funcional e estrutural das proteínas da família GH28 em fungos, destacando variações que podem influenciar suas atividades biológicas. Entre as cinco classificações da família GH28, o motivo DD foi aquele que foi mais conservado, seguido pelo NTD, enquanto os motivos RIK e GHG foram os menos conservados.

Como ilustração, os motivos NTD, DD, GHG e RIK da proteína Fox\_17400 são apresentados nas Figuras 4D–F. Com o auxílio da ferramenta PyMol, foi possível ilustrar a estrutura tridimensional da proteína, com ênfase especial nos motivos conservados localizados na região de uma fenda proteica correspondente ao sítio ativo.

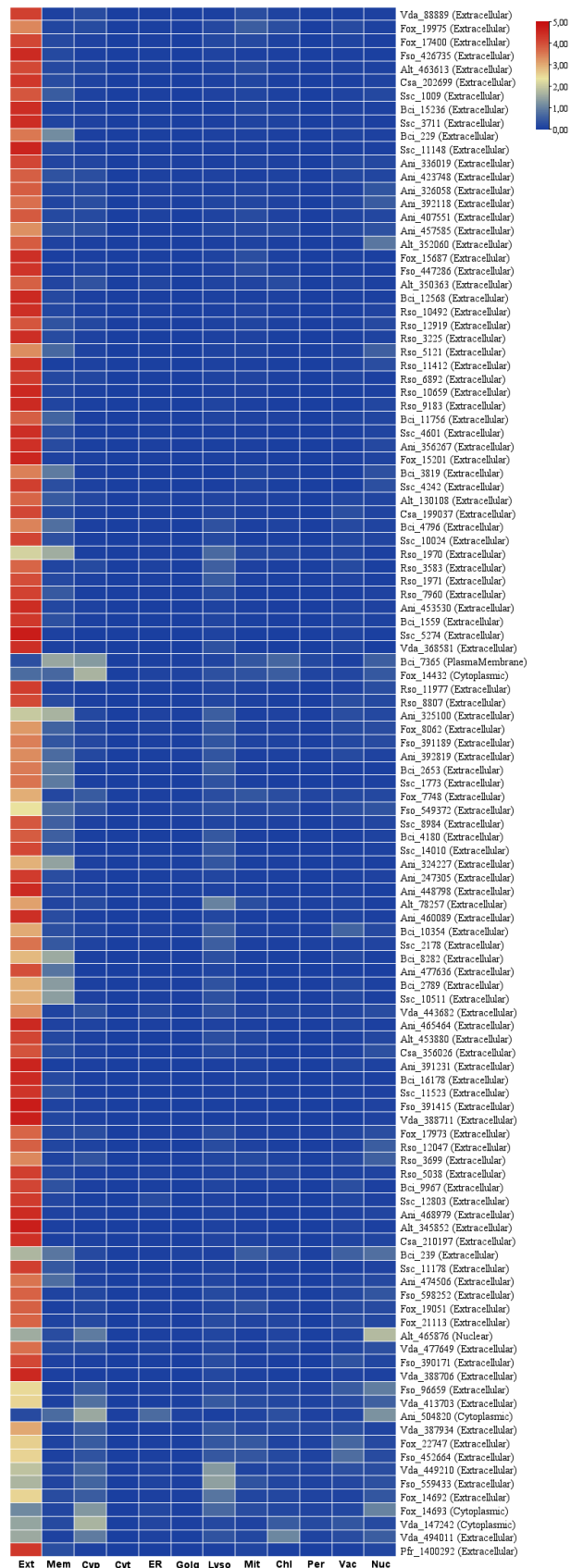
Figura 3.2 — Composição centesimal das poligalacturonases GH28



Legenda: O HeatMap mostra os aminoácidos nas colunas e as PGs fúngicas nas linhas. Cores mais avermelhadas representam maior frequência.

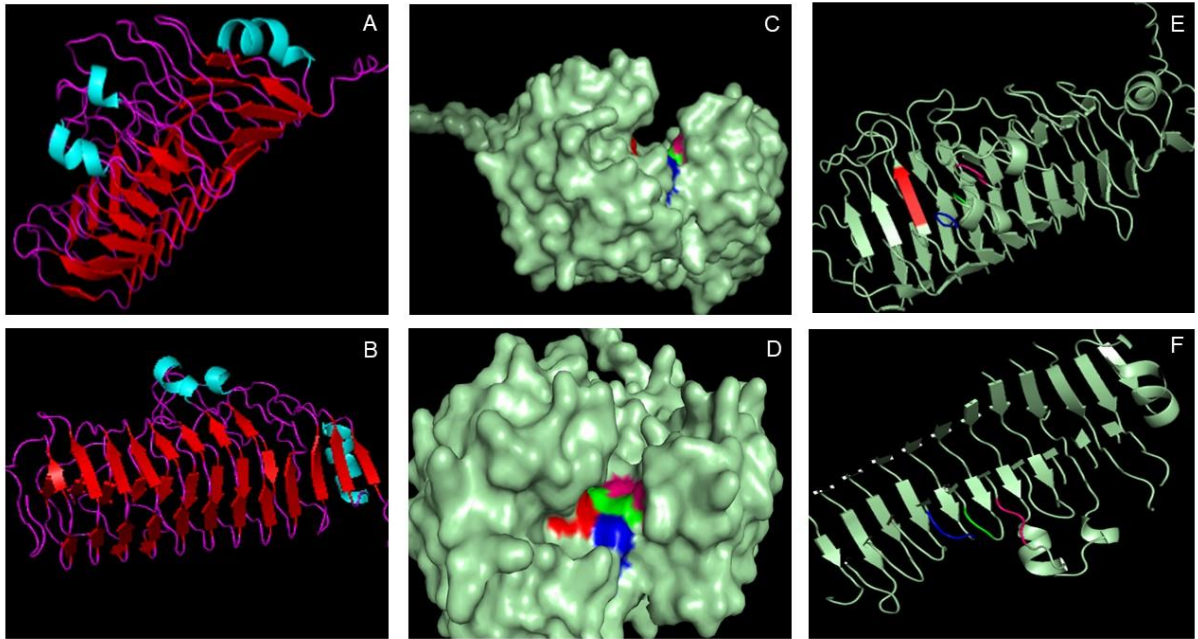
Fonte: Da autora (2025).

Figura 3.3 — Localização subcelular das poligalacturonases GH28



Legenda: Predição da localização subcelular das PGs  
 Fonte: Da autora (2025).

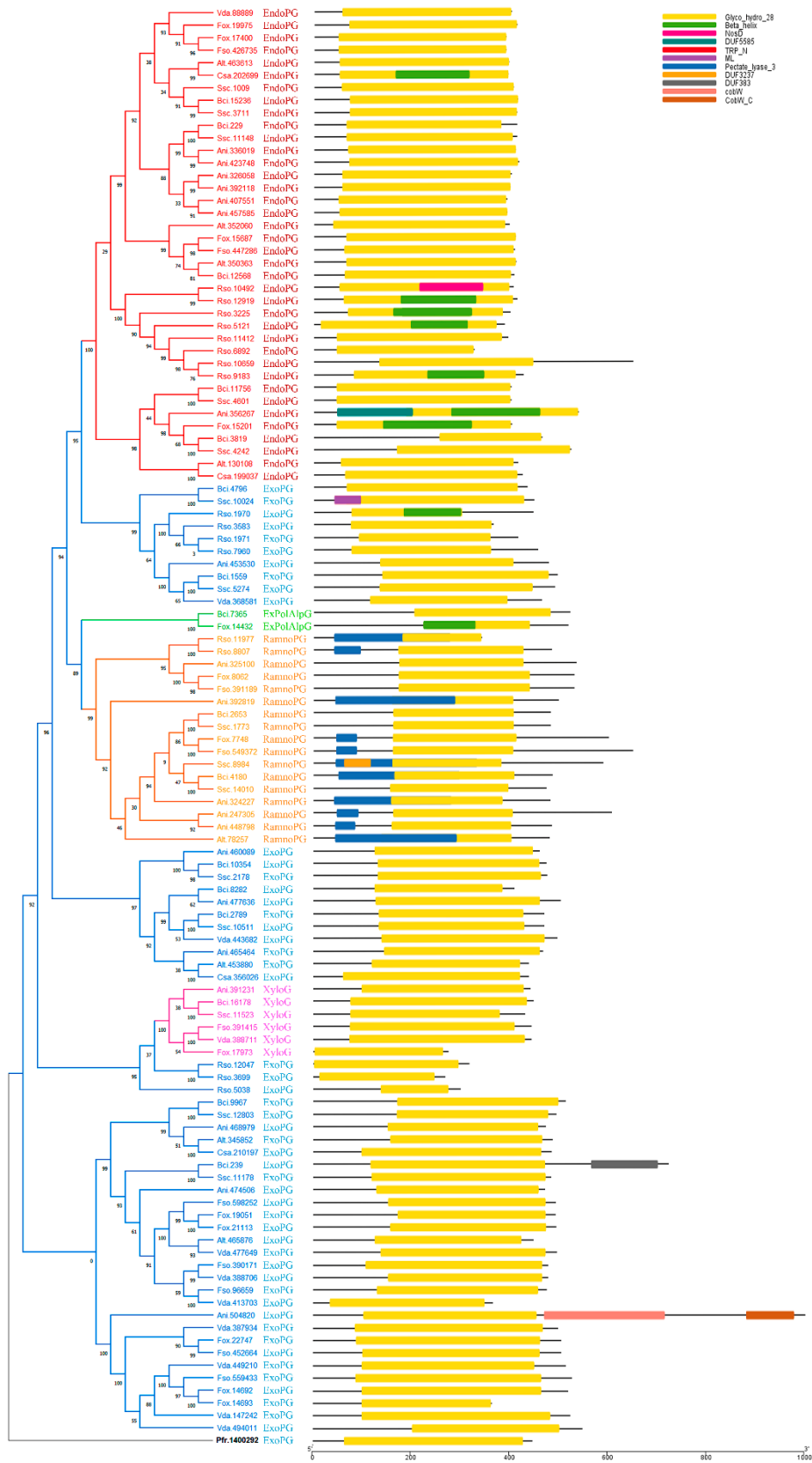
Figura 3. 4 — Estrutura tridimensional da poligalacturonase



Legenda: As estruturas das imagens são referentes à Fox\_177400, utilizada como modelo para ilustrar as estruturas secundárias e terciárias e a região concava, composta pelos motivos conservados NTD, DD, GHG e RIK, identificando o local da ocorrência da interação com a PGIP.

Fonte: Da autora (2025).

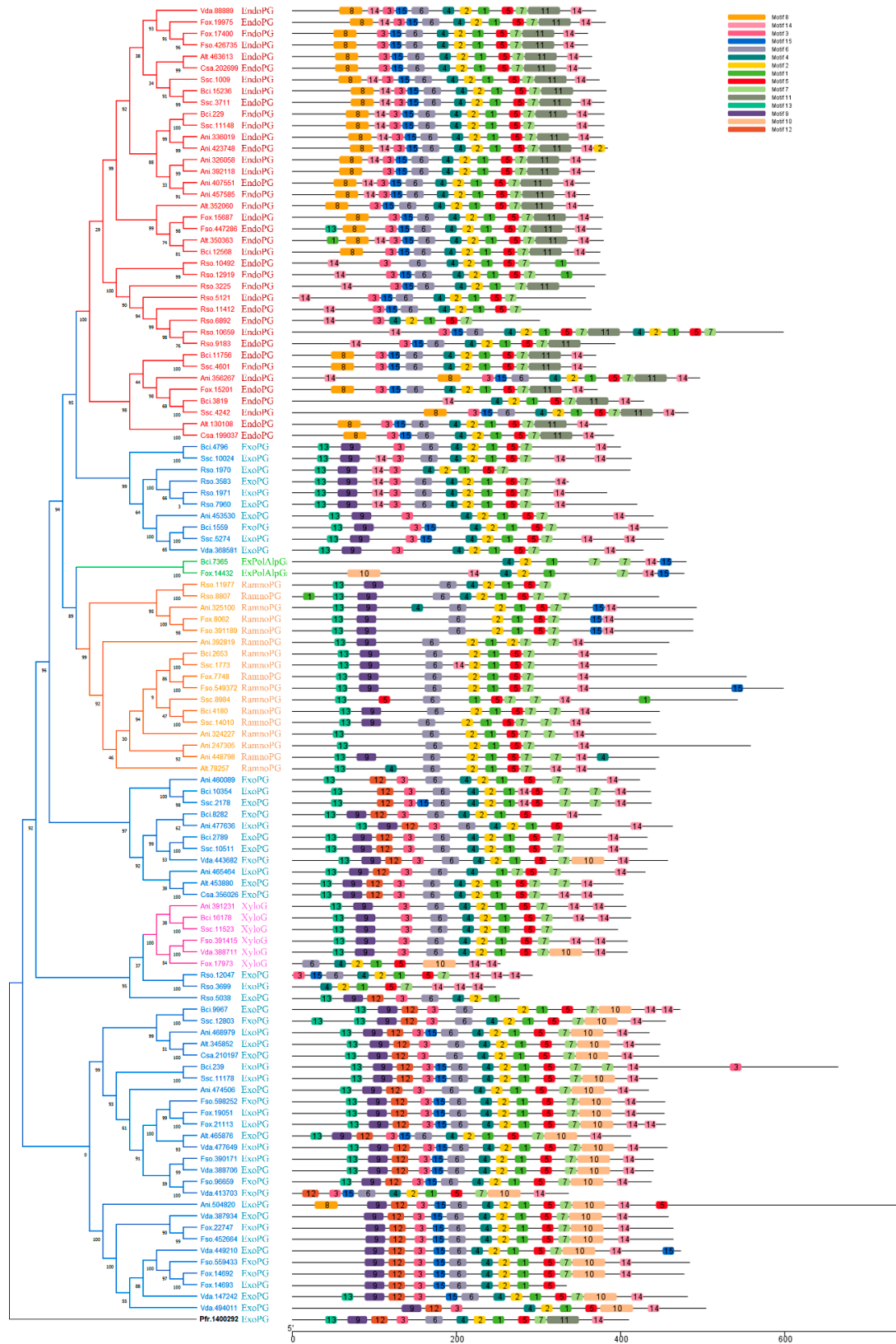
Figura 3.5 — Árvore filogenética e domínios conservados de poligalacturonases



Legenda: Todas as proteínas possuem o domínio Glicosil-hidrolase (amarelo). O domínio pectato liase está presente apenas nas ramnogalacturonases.

Fonte: Da autora (2025).

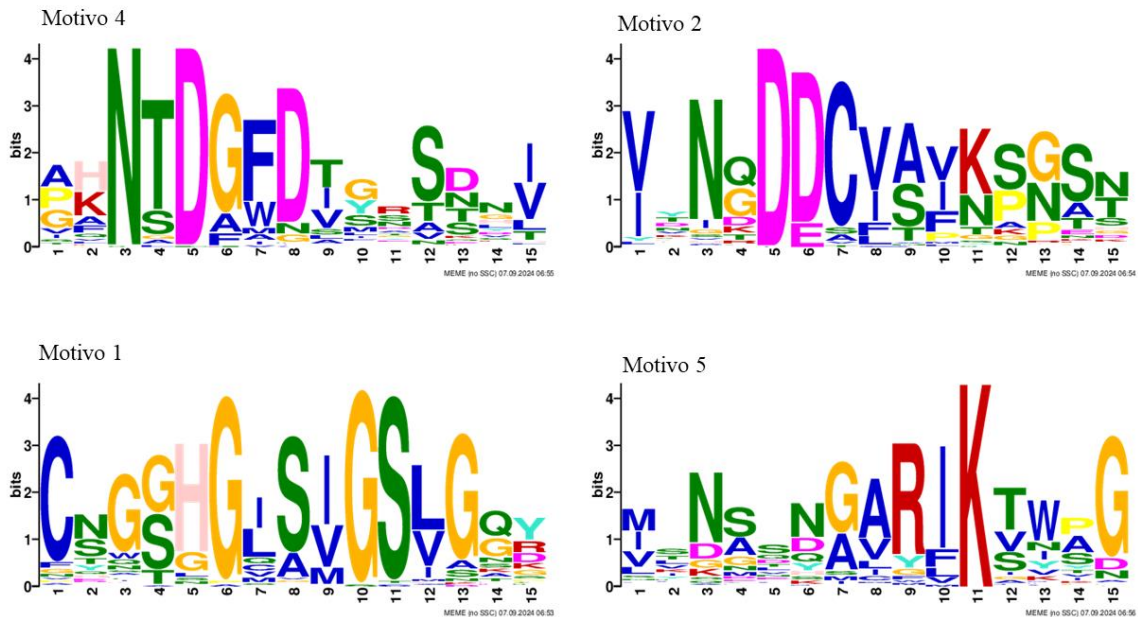
Figura 3.6 — Motivos conservados das poligalacturonases



Legenda: Motivos conservados distribuídos na árvore filogenética. Os motivos 1, 2, 4, 7 e 14 estão presentes em todas as 115 proteínas analisadas. O motivo 11 está presente exclusivamente nas endoPGs e grupo externo. Motivo 8 predominantemente nas endoPGs e uma exoPG (Ani\_504820).

Fonte: Da autora (2025).

Figura 3.7 — Logos dos motivos conservados das poligalacturonases



Legenda: Os gráficos representam os Motivos gerados pelo MEME Suite. O gráfico Motivo 4 representa o motivo I, que contém os aminoácidos NTD; o Motivo 2, representa o motivo II, com os aminoácidos DD; Motivo 1 representa o motivo III, com os aminoácidos GHG; e o Motivo 5 representa o motivo IV, com os aminoácidos RIK. Os gráficos ilustram a conservação de aminoácidos em diferentes posições do motivo correspondente. O eixo X indica as posições dos aminoácidos dentro do motivo, enquanto o eixo Y mostra a quantidade de informação conservada em cada posição, medida em bits. Quanto maior a altura da letra no gráfico, mais conservado é o aminoácido naquela posição.

Fonte: Da autora (2025)

#### 4 DISCUSSÃO

As poligalacturonases (PGs), integrantes da família GH28, são enzimas extracelulares fundamentais para a degradação da parede celular vegetal, facilitando a colonização por fungos fitopatogênicos, como *Fusarium oxysporum* e *Ustilago maydis*, e desempenhando papel crucial na patogenicidade (Castruita-Domínguez *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2022). Essas enzimas demonstram alta especificidade para a homogalacturonana e outros componentes da pectina, mas também são sintetizadas pelas próprias plantas durante processos como maturação de frutos e senescência das folhas (Sprockett; Piontkivska; Blackwood, 2011; Zhai *et al.*, 2021).

No presente estudo, a análise detalhada das proteínas GH28 provenientes de fungos fitopatogênicos possibilitou a identificação de cinco grupos distintos, evidenciando a diversidade estrutural e funcional dessas enzimas. A classificação em grupos diferenciados e a identificação dos motivos conservados (motivos I, II, III e IV) ressaltam a complexidade dessas proteínas. Observou-se que variações na composição de aminoácidos e em estruturas

específicas, como o domínio beta-hélice presente nas endoPGs e o domínio de pectato-liase exclusivo das ramnogalacturonases, podem influenciar tanto a eficácia enzimática quanto a interação com os inibidores de poligalacturonase (PGIPs) produzidos pelas plantas (FEDERICI et al., 2001).

Compreender as características genômicas, estruturais e composicionais das PGs é, portanto, fundamental para o desenvolvimento de estratégias alternativas que visem mitigar os prejuízos causados por patógenos de grande impacto econômico. Em síntese, os resultados deste estudo ampliaram nosso entendimento sobre os mecanismos moleculares que regem a patogenicidade fúngica e apontam para potenciais aplicações no manejo integrado de doenças em culturas agrícolas, contribuindo para a sustentabilidade e a segurança alimentar.

#### 4.1 Análise filogenética

A partir da identificação de 114 proteínas de fungos responsáveis por doenças em plantas, foi possível construir uma árvore filogenética, que mapeou as características das proteínas com base em seu modo de ação e as dividiu em sete clados distintos. Curiosamente, três desses clados agruparam exopoligalacturonases (exoPGs) em diferentes posições, sugerindo tanto uma diversificação funcional quanto uma proximidade evolutiva com outros grupos.

Observou-se que 45,21% das proteínas foram classificadas como exoPG, enquanto 33,04% correspondem às endopoligalacturonases (endoPGs). Esses dados, entretanto, divergem de estudos anteriores no reino Fungi. Por exemplo, Markovič e Janeček (2001) analisaram 43 proteínas de fungos e relataram uma predominância de endoPGs (82,7%) em comparação com exoPGs (7,7%). Em outro estudo com *Rhizopus oryzae*, foram expressos 15 genes em *Pichia pastoris*, dos quais 80% correspondiam a endoPGs e 20% a exoPGs (Mertens; Burdick; Rooney, 2008).

Quanto à distribuição das PGs entre os diferentes fungos, constatou-se que todas as espécies apresentaram proteínas de várias classificações. Uma exceção foi *Cochliobolus sativus*, que exibiu apenas 4 PGs, sendo 2 endoPGs e 2 exoPGs. Em contraste, *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* apresentaram proteínas representativas de todos os cinco tipos de PGs, distribuídas em diferentes clados. Por sua vez, *Rhizoctonia solani*, representante do filo Basidiomycota, apresentou endoPGs, exoPGs e ramnogalacturonases. Ainda, em *Claviceps purpureum*, outra espécie de basidiomicetos, foram identificadas cinco

endoPGs formando um cluster isolado, o que difere dos fungos ascomicetos, que geralmente formam clusters contendo tanto Endo quanto ExoPGs (Mertens; Burdick; Rooney, 2008).

Esses achados evidenciam a diversidade das PGs entre diferentes espécies e reforçam a necessidade de estudos mais detalhados sobre essa família gênica, a fim de melhor compreender sua evolução e suas implicações na patogenicidade fúngica.

## 4.2 Propriedades das proteínas

O conhecimento sobre as propriedades bioquímicas das proteínas é fundamental para diversas aplicações biotecnológicas (Niture, 2008). No caso das poligalacturonases (PGs), assim como ocorre com o metabolismo dos fungos, a atividade enzimática geralmente apresenta um pH ótimo entre 3 e 6 (Niture e Pant, 2004). Em nosso estudo, os valores do ponto isoelétrico (pI) das 115 proteínas analisadas variaram entre 3,71 e 9,42, com uma média de 6,13, que contempla o valor do pH ótimo. Além disso, 93 das 115 proteínas (80,87%) apresentaram valores negativos de GRAVY, indicando uma natureza hidrofílica na maioria dos casos (Roy *et al.*, 2023).

A massa molecular das PGs variou consideravelmente, de 26,6 kDa a 110,94 kDa, refletindo a relação direta entre o tamanho da proteína (em número de aminoácidos) e sua massa. Esses valores estão em consonância com dados reportados para PGs fúngicas purificadas, que apresentaram massa molecular entre 25 e 82 kDa (Sakamoto *et al.*, 2002). Especificamente, para *Aspergillus niger*, a média da massa molecular de 20 proteínas foi de 48,84 kDa, comparada à PGII purificada, que apresentou 61 kDa (Singh e Appu Rao, 2002).

É relevante destacar que muitos fungos produzem diferentes formas da enzima, o que pode ser atribuído à presença de múltiplos genes e a modificações pós-traducionais que alteram as propriedades físicas das enzimas (Caprari *et al.*, 1993; Mikhailova *et al.*, 2000). Por exemplo, na análise de 16 exoPGs de *Botrytis cinerea*, foram obtidas médias de 46,09 kDa para a massa molecular e de 5,57 para o pI. Em outro ensaio envolvendo duas poligalacturonases secretadas por esse mesmo fungo, a PGI (exoPG) apresentou massa molecular de 65 kDa e pI de 8,0, enquanto a PGII (endoPG) exibiu massa molecular de 52 kDa e pI de 7,8 (Cabanne e Donèche, 2002).

Os valores médios obtidos para as proteínas de *Sclerotinia sclerotiorum* neste estudo foram semelhantes aos encontrados na literatura. A análise de 15 proteínas desta espécie resultou em um pI médio de 5,8 e massa molecular média de 44,93 kDa. Em estudos anteriores, Martel *et al.* (1998) relataram que, para duas poligalacturonases de *S. sclerotiorum*, o pI médio

havia sido de 4,8, enquanto a massa molecular ficou em torno de 42 kDa para a PGI e 41,5 kDa para a PGII. Esses dados demonstram a importância de complementar previsões *in silico* com ensaios laboratoriais, os quais aprimoram as informações sobre a estrutura e função das enzimas. Diferenças entre previsões computacionais e dados experimentais podem, por vezes, levar a considerações distintas, ressaltando a necessidade de validação experimental para um entendimento mais preciso das propriedades bioquímicas das PGs.

### 4.3 Localização subcelular

A determinação da localização subcelular das proteínas é fundamental para corroborar suas funções celulares (Sahu; Loaiza; Kaundal, 2020). Como se sabe, a partir da sequência de aminoácidos, é possível prever o provável local de atuação de uma proteína utilizando ferramentas online, como o CELLO, que aplica uma abordagem multi-classe baseada em SVM (Support Vector Machine). Essa técnica codifica as sequências por meio de informações como composição de aminoácidos, di-peptídeos, composição particionada e propriedades físico-químicas dos resíduos (Yu *et al.*, 2006).

Conhecendo a localização subcelular, torna-se viável inferir a função da proteína (Zhou *et al.*, 2020). Neste estudo, os resultados indicaram que 94,78% das PGs são preditas como extracelulares, evidenciando sua relevância nesse compartimento. Em estudos anteriores, como o de Roy *et al.* (2023), observou-se que, para enzimas CAZ de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, envolvidas no crescimento, colonização e patogênese, cerca de 90% das proteínas analisadas apresentavam localização extracelular, incluindo representantes da família GH28.

Essa predominância extracelular pode ser explicada pelo fato de que as endopoligalacturonases (PGs) são frequentemente uma das primeiras proteínas secretadas pelos patógenos durante a infecção do hospedeiro (De Lorenzo; D'ovidio; Cervone, 2001). Ao degradarem, reorganizarem e decomporem a parede celular, as PGs facilitam a obtenção de nutrientes e o acesso a outros componentes da parede, contribuindo para a penetração e infecção do tecido hospedeiro (Dong e Wang, 2015; De Lorenzo; D'ovidio; Cervone, 2001; Schuster; Schweizer; Kahmann, 2018). Embora nem todas as PGs atuem diretamente como fatores de virulência, elas estão, de alguma forma, envolvidas na patogênese, seja degradando o ácido galacturônico ou por meio da aquisição de nutrientes (Villarreal; Stocchi; Have, 2022). Em *Verticillium dahliae*, por exemplo, a PG1 (VdEPG1) é provavelmente secretada no espaço extracelular durante a infecção (Liu *et al.*, 2023).

O controle da localização subcelular das proteínas é, em grande parte, mediado pela presença de peptídeos sinal, que, localizados na região N-terminal, direcionam as proteínas para o retículo endoplasmático e sua subsequente entrada na via secretora. Esses sinais variam em estrutura, comprimento e posição, ajustando-se conforme o compartimento de destino, e desempenham um papel crucial na determinação da localização final da proteína (Almagro Armenteros *et al.*, 2019).

Curiosamente, das cinco proteínas que não foram preditas como extracelulares, duas delas, Bci\_7365 (associada à membrana plasmática) e Fox\_14432 (citoplasmática), foram classificadas como exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidas. As outras três, Alt\_465876 (nuclear), Fox\_14693 e Vda\_147242 (citoplasmáticas), foram classificadas como exoPGs. Essa diversidade nas predições sugere que, ao longo da evolução, a família pode ter expandido e adquirido funções adicionais, refletindo uma diversificação funcional.

#### 4.4 Estrutura tridimensional das poligalacturonases

A primeira estrutura tridimensional de uma poligalacturonase foi elucidada por Pickersgill *et al.* (1998) por meio de cristalografia, que por sua vez, permitiu identificar a endoPG da bactéria *Erwinia carotovora ssp. carotovora*. Nesse estudo, foi descrito que essa enzima apresenta 10 voltas de hélices- $\beta$  paralelas orientadas à direita, intercaladas por duas regiões de alça que formam uma fenda semelhante a um túnel. Nesta fenda, encontram-se as sequências conservadas do sítio ativo, essenciais para a ligação com o substrato. No ano seguinte, ocorreu o primeiro relato sobre a estrutura de PGs provenientes de fungos (Van Santen *et al.*, 1999).

A estrutura cristalina da PGII de *Aspergillus niger* foi descrita de maneira análoga àquela encontrada para a bactéria, também com 10 voltas à direita de hélices- $\beta$  paralelas, com número de aminoácidos variando de 22 a 39 por volta. Essas voltas, dispostas em tandem, são formadas por três ou quatro folhas- $\beta$ , nomeadas como PB1, PB1a, PB2 e PB3, que em conjunto configuram uma hélice (Federici *et al.*, 2001; Villarreal; Stocchi; Have, 2022). Vale lembrar que a codificação das folhas- $\beta$  foi inicialmente baseada na estrutura  $\beta$ -helicoidal da pectato-liase C, que possui apenas 3 folhas- $\beta$  (Yoder; Keen; Jurnak, 1993).

Quando esses primeiros relatos são comparados com os resultados obtidos por meio do PyMol, verifica-se uma concordância notável. As proteínas analisadas apresentaram de 10 a 11 voltas completas, orientadas à direita, sendo cada volta composta por três folhas- $\beta$  paralelas.

Contudo, (Federici *et al.*, 2001) salientaram que pode ocorrer a formação de 3 ou 4 folhas- $\beta$  em cada volta, a depender da proteína.

Em uma endoPG típica, como a enzima PG1 de *Aspergillus aculeatus* (AaPG1), o sítio ativo é caracterizado por uma fenda em forma de túnel, permitindo que a enzima se ligue ao polissacarídeo e gere fragmentos pécticos, os oligogalacturonídeos (OGs), com variados graus de polimerização e diferentes padrões de substituição por grupos metil e acetil (Cho; Lee; Shin, 2001; Davidsson *et al.*, 2017). Por outro lado, em exoPGs, uma extensão de loop transforma o canal aberto em uma cavidade fechada, restringindo o ataque à extremidade não redutora do substrato, resultando na liberação de monômeros ou dímeros de ácido galacturônico sem metilesterificação (Abbott; Boraston, 2007).

#### 4.5 Domínios e motivos conservados

Motivos conservados são regiões proteicas cujos resíduos de aminoácidos permanecem preservados ao longo da evolução, em razão das funções essenciais que desempenham na estrutura e atividade das proteínas (Saldaño *et al.*, 2016). Mutações ou recombinações gênicas que resultem na perda ou alteração desses resíduos podem comprometer a função enzimática (Wang; Bitbol; Wingreen, 2019).

As poligalacturonases de *Aspergillus niger* têm sido amplamente estudadas desde a década de 1990 (Bussink *et al.*, 1991; Van Pouderoyen *et al.*, 2003; De Vries *et al.*, 2002), dada a abundância dessas enzimas nesse fungo (Sprockett; Piontkivska; Blackwood, 2011). Em nossa análise, *A. niger* apresentou o maior número de poligalacturonases (21), seguido por *Botrytis cinerea* (18) e *Sclerotinia sclerotiorum* (17). O gene que codifica a PGII é o mais expresso em *A. niger* (Bussink *et al.*, 1991), e estudos têm revelado que PGI e PGII compartilham uma região altamente conservada, também encontrada em PGs bacterianas e em tomates, sugerindo uma função catalítica preservada ao longo do tempo. Markovič e Janeček (2001) confirmaram a presença de quatro motivos conservados, designados NTD<sup>178</sup>, DD<sup>201</sup>, GHG<sup>222</sup> e RIK<sup>256</sup> (numeração baseada na ORF da PGII de *A. niger*), os quais, em plantas, correspondem a sequências como SPNTDG, GDDC, CGPGHG e RIK (Lu *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2008).

Embora diversos estudos tenham destacado a conservação dos quatro motivos (NTD, DD, GHG e RIK) em endoPGs, exoPGs e exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidas (Markovič e Janeček, 2001; Pickersgill *et al.*, 1998; Van Santen *et al.*, 1999), nossos dados indicam que esses motivos ocorrem simultaneamente apenas nas endoPGs. Nas exoPGs, por exemplo, foram identificados os motivos NTD e DD, enquanto o motivo GHG apresentou variações, frequentemente

aparecendo como xHG, enquanto o motivo RIK, em alguns casos, apresentou substituição na posição da isoleucina. Em outras classificações de PGs, observou-se variação quanto à presença ou ausência desses motivos.

A relevância funcional dos resíduos Asp<sup>180</sup>, Asp<sup>201</sup>, Asp<sup>202</sup>, His<sup>223</sup>, Arg<sup>256</sup> e Lys<sup>258</sup> está associada aos sítios ativos e às funções catalíticas das enzimas (Armand *et al.*, 2000; Pickersgill *et al.*, 1998; Rexová-Benková; Mračková, 1978; Van Santen *et al.*, 1999). Adicionalmente, resíduos como Arg<sup>265</sup>, Lys<sup>267</sup> e Ile<sup>299</sup> estão envolvidos na ligação do substrato (Mertens; Burdick; Rooney, 2008). Em estudos com *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersicum*, os resíduos conservados identificados incluíram a sequência GHNTDxF<sup>(196–202)</sup>, onde "x" representa principalmente Ala ou Gly, seguida de NQDDC<sup>(219–223)</sup>, QDY<sup>(307–309)</sup>, HGxSIGSxG<sup>(243–251)</sup>, e RIK<sup>(274–276)</sup> (Roy *et al.*, 2023).

Em *F. oxysporum* f.sp. *lycopersicum*, foi demonstrado que as GH28 possuem um peptídeo sinal e um domínio PF00295.19 correspondente ao Glyco\_hydro\_28, relacionado ao sítio ativo por meio dos resíduos Asp<sup>221</sup> e His<sup>243</sup> (Federici *et al.*, 2001). O domínio Glyco\_hydro\_28, presente em todas as poligalacturonases, foi utilizado como critério obrigatório para a seleção das proteínas deste estudo, enquanto o domínio Pectate\_lyase\_3 foi encontrado exclusivamente nas ramnogalacturonases. Além desses domínios, outros foram detectados de forma esporádica, tais como NosD, DUF5585, TRP\_N, ML, DUF3237, DUF383, cobW, CobW\_C e P-loop NTPase, cada um aparecendo apenas em proteínas específicas (Figura 3.5; Tabela S3.9).

Em termos de motivos, o programa MEME identificou 15 motivos estruturais nas 115 proteínas analisadas, dos quais aqueles nomeados 1, 2, 4, 7 e 14 foram universais. Destacam-se os motivos 4, 2, 1 e 5, que contêm os resíduos conservados NTD, DD, GHG e RIK típicos da família GH28; contudo, o motivo 5 não apresentou a sequência RIK nas proteínas classificadas como exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidasas, e o motivo 11 foi exclusivo das endoPGs e do grupo externo. Os logotipos gerados evidenciam a distribuição e frequência dos aminoácidos em cada motivo, e a análise via InterPro associou os motivos 6, 10 e 11 ao domínio de pectato-liase, sendo o motivo 11 também relacionado ao domínio Glyco\_hydro\_28. Adicionalmente, o alinhamento múltiplo revelou variações específicas nos diferentes clados: no clado III, por exemplo, houve uma alteração de NTD para NGD no segundo resíduo do motivo I, variação de GHG para THG no motivo III e ausência do motivo IV; enquanto os clados IV, V, VI e VII apresentaram, respectivamente, escassez, ausência parcial ou variações em um ou mais dos quatro motivos conservados.

Em síntese, os resultados demonstram o potencial papel fundamental dos domínios para a função das proteínas e dos motivos estruturais conservados para a interação das poligalacturonases. A presença do domínio Glyco\_hydro\_28, associada a variações nos motivos conservados, contribui para o entendimento das estratégias enzimáticas dos fungos, permitindo adaptações e a perpetuação das espécies ao longo da evolução.

## 5 CONCLUSÃO

A análise genômica ampla das enzimas poligalacturonases da família GH28 em fungos fitopatogênicos revelou a diferenciação e caracterização das PGs em cinco classificações: endopoligalacturonases (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonases (EC 3.2.1.67), exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidases (EC 3.2.1.82), ramnogalacturonases (EC 3.2.1.171) e endoxilgalacturonase hidrolases (EC não especificado). As localizações subcelulares foram predominantemente preditas em espaço extracelular, que condiz com a função destas enzimas de degradar a parede celular vegetal durante o processo de infecção. A estrutura tridimensional típica das poligalacturonases (10 a 11 voltas paralelas compostas de folhas- $\beta$  e  $\alpha$ -hélice) mostrou a região de localização dos principais motivos conservados (I, II, III e IV) que estão relacionados ao local de interação com as PGIPs. Esses motivos foram altamente conservados nas endopoligalacturonases. O domínio Glicosil Hidrolase está presente em todas as proteínas analisadas; o domínio de beta-hélice se mostrou característico das endoPGs e um domínio de pectato-liase, exclusivo nas ramnogalacturonases. A análise de composição das sequências revelou que os aminoácidos mais abundantes são glicina, serina e treonina, sugerindo padrões específicos que podem influenciar suas funções biológicas.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, D. W.; BORASTON, A. B. **The structural basis for exopolygalacturonase activity in a family 28 glycoside hydrolase.** *Journal of Molecular Biology*, [s.l.], v. 368, n. 5, p. 1215–1222, 2007. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.02.083.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. *et al.* **Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning.** *Life Science Alliance*, [s.l.], v. 2, n. 5, p. e201900429, 2019. DOI: 10.26508/lsa.201900429.
- ANDRÉ-LEROUX, G.; TESSIER, D.; BONNIN, E. **Endopolygalacturonases reveal molecular features for processivity pattern and tolerance towards acetylated pectin.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, [s.l.], v. 1794, n. 1, p. 5–13, 2009. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.09.004.
- ARMAND, S. *et al.* **The active site topology of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II as studied by site-directed mutagenesis.** *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 275, n. 1, p. 691–696, 2000. DOI: 10.1074/jbc.275.1.691.
- BAILEY, T. L. *et al.* **The MEME Suite.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 43, n. W1, p. W39–W49, 2015. DOI: 10.1093/nar/gkv416.
- BUSSINK, H. J. D. *et al.* **Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*.** *Current Genetics*, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 301–307, 1991. DOI: 10.1007/BF00318519.
- CABANNE, C.; DONÈCHE, B. **Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea*.** Effect of calcium ions on polygalacturonase activity. *Microbiological Research*, [s.l.], v. 157, n. 3, p. 183–189, 2002. DOI: 10.1078/0944-5013-00147.
- CAPRARI, C. *et al.* ***Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product.** *Physiological and Molecular Plant Pathology*, [s.l.], v. 43, p. 453–461, 1993.
- 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.** *The Plant Journal*, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 1–30, 1993. DOI: 10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x.
- CASTRUITA-DOMÍNGUEZ, J. P. *et al.* **Analysis of a polygalacturonase gene of *Ustilago maydis* and characterization of the encoded enzyme.** *Journal of Basic Microbiology*, [s.l.], v. 54, n. 5, p. 340–349, 2014. DOI: 10.1002/jobm.201200606.
- CHEN, C. *et al.* **TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data.** *Molecular Plant*, [s.l.], v. 13, n. 8, p. 1194–1202, 2020. DOI: 10.1016/j.molp.2020.06.009.
- CHO, S. W.; LEE, S.; SHIN, W. **The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate**

**complex**. *Journal of Molecular Biology*, [s.l.], v. 311, n. 4, p. 863–878, 2001. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4919.

DAVIDSSON, P. *et al.* **Short oligogalacturonides induce pathogen resistance-associated gene expression in *Arabidopsis thaliana***. *BMC Plant Biology*, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 19, 2017. DOI: 10.1186/s12870-016-0959-1.

DE LORENZO, G.; D'OVIDIO, R.; CERVONE, F. **The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi**. *Annual review of phytopathology*, v. 39, n. 1, p. 313–335, 2001.

DE VRIES, R. P. *et al.* **Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger***. *FEBS Letters*, [s.l.], v. 530, n. 1–3, p. 41–47, 2002. DOI: 10.1016/S0014-5793(02)03391-4.

DONG, Z.; WANG, Z. **Isolation and heterologous expression of a polygalacturonase produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and 4**. *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 7595–7607, 2015. DOI: 10.3390/ijms16047595.

FEDERICI, L. *et al.* **Structural requirements of endo polygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein)**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 98, n. 23, p. 13425–13430, 2001. DOI: 10.1073/pnas.231473698.

GACURA, M. D. *et al.* **Comparison of pectin-degrading fungal communities in temperate forests using glycosyl hydrolase family 28 pectinase primers targeting Ascomycete fungi**. *Journal of Microbiological Methods*, [s.l.], v. 123, p. 108–113, 2016. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.02.013.

GRIGORIEV, I. V. *et al.* **Fueling the future with fungal genomics**. *Mycology*, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 192–209, 2011. DOI: 10.1080/21501203.2011.584577.

HAEGER, W. *et al.* **Direct evidence for a new mode of plant defense against insects via a novel polygalacturonase-inhibiting protein expression strategy**. *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 295, n. 33, 2020. DOI: 10.1074/jbc.RA120.014027.

KELLEY, L. A. *et al.* **The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis**. *Nature Protocols*, [s.l.], v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.

KIM, J. *et al.* **Patterns of expansion and expression divergence in the plant polygalacturonase gene family**. *Genome Biology*, [s.l.], v. 7, n. 9, p. R87, 2006. DOI: 10.1186/gb-2006-7-9-r87.

KLÖCKNER, A. *et al.* **Deconstructing the chlamydial cell wall**. *Current topics in microbiology and immunology*, [s.l.], v. 412, p. 1–33, 2018. DOI: 10.1007/82\_2016\_34.

LIU, S. *et al.* **The glycoside hydrolase 28 member VdEPG1 is a virulence factor of *Verticillium dahliae* and interacts with the jasmonic acid pathway-related gene GhOPR9**. *Molecular Plant Pathology*, [s.l.], v. 24, n. 10, p. 1238–1255, 2023. DOI: 10.1111/mpp.13366.

LU, L. *et al.* **Genome-wide identification and characterization of polygalacturonase gene family in maize (*Zea mays* L.).** International Journal of Molecular Sciences, [s.l.], v. 22, n. 19, p. 10722, 2021. DOI: 10.3390/ijms221910722.

LU, S. *et al.* **CDD/SPARCLE: The conserved domain database in 2020.** Nucleic Acids Research, [s.l.], v. 48, n. D1, p. D265–D268, 2020. DOI: 10.1093/nar/gkz991.

MARKOVIČ, O.; JANEČEK, Š. **Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution.** Protein Engineering, Design and Selection, [s.l.], v. 14, n. 9, p. 615–631, 2001. DOI: 10.1093/protein/14.9.615.

MARTEL, M. B.; LÉTOUBLON, R.; FÈVRE, M. **Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*.** FEMS microbiology letters, v. 158, n. 1, p. 133–138, 1998. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12812.x

MERTENS, J. A.; BURDICK, R. C.; ROONEY, A. P. **Identification, biochemical characterization, and evolution of the *Rhizopus oryzae* 99–880 polygalacturonase gene family.** Fungal Genetics and Biology, [s.l.], v. 45, n. 12, p. 1616–1624, 2008. DOI: 10.1016/j.fgb.2008.09.009.

MIKHAILOVA, R. V. *et al.* **Isoelectric characterization of extracellular polygalacturanases of various *Aspergillus alliaceus* strains.** Mikrobiologija, [s.l.], v. 69, p. 203–208, 2000.

MOHNEN, D. **Pectin structure and biosynthesis.** Current Opinion in Plant Biology, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 266–277, 2008. DOI: 10.1016/j.pbi.2008.03.006.

MÖLLER, S.; CRONING, M. D. R.; APWEILER, R. **Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions.** Bioinformatics, [s.l.], v. 17, n. 7, p. 646–653, 2001. DOI: 10.1093/bioinformatics/17.7.646.

NITURE, S. K. **Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases.** Biologia, [s.l.], v. 63, n. 1, p. 1–19, 2008. DOI: 10.2478/s11756-008-0018-y.

NITURE, S. K.; PANT, A. **Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*.** Microbiological Research, [s.l.], v. 159, n. 3, p. 305–314, 2004. DOI: 10.1016/j.micres.2004.06.002.

OMASITS, U. *et al.* **Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data.** Bioinformatics, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 884–886, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt607.

PARK, K. C. *et al.* **Gene structure dynamics and divergence of the polygalacturonase gene family of plants and fungus.** Genome, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 30–40, 2008. DOI: 10.1139/G07-093.

PAYSAN-LAFOSSE, T. *et al.* **InterPro in 2022**. *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 51, n. D1, p. D418–D427, 2023. DOI: 10.1093/nar/gkac993.

PICKERSGILL, R. *et al.* **Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora***. *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 273, n. 38, p. 24660–24664, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.38.24660.

REIGNAULT, Ph.; VALETTE-COLLET, O.; BOCCARA, M. **The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type**. *European Journal of Plant Pathology*, [s.l.], v. 120, n. 1, p. 1–11, 2007. DOI: 10.1007/s10658-007-9184-y.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MRAČKOVÁ, M. **Active groups of extracellular endo-d-galacturonanase of *Aspergillus niger* derived from pH effect on kinetic data**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, [s.l.], v. 523, n. 1, p. 162–169, 1978. DOI: 10.1016/0005-2744(78)90018-9.

ROY, A. *et al.* **Computational identification and characterization of vascular wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) CAZymes in tomato xylem sap**. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, [s.l.], v. 41, n. 10, p. 4344–4360, 2023. DOI: 10.1080/07391102.2022.2067236.

SAFRAN, J. *et al.* **Plant polygalacturonase structures specify enzyme dynamics and processivities to fine-tune cell wall pectins**. *The Plant Cell*, [s.l.], v. 35, n. 8, p. 3073–3091, 2023. DOI: 10.1093/plcell/koad134.

SAHU, S. S.; LOAIZA, C. D.; KAUNDAL, R. **Plant-mSubP: a computational framework for the prediction of single- and multi-target protein subcellular localization using integrated machine-learning approaches**. *AoB PLANTS*, [s.l.], v. 12, n. 3, 2020. DOI: 10.1093/aobpla/plz068.

SAKAMOTO, T. *et al.* **Purification and characterisation of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, [s.l.], v. 1572, n. 1, p. 10–18, 2002. DOI: 10.1016/S0304-4165(02)00277-5.

SALDAÑO, T. E. *et al.* **Evolutionary conserved positions define protein conformational diversity**. *PLOS Computational Biology*, [s.l.], v. 12, n. 3, p. e1004775, 2016. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004775.

SCHUSTER, M.; SCHWEIZER, G.; KAHMANN, R. **Comparative analyses of secreted proteins in plant pathogenic smut fungi and related Basidiomycetes**. *Fungal Genetics and Biology*, [s.l.], v. 112, p. 21–30, 2018. DOI: 10.1016/j.fgb.2016.12.003.

SINGH, S. A.; APPU RAO, A. G. **A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of, two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger***. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, [s.l.], v. 35, n. 2, p. 115–123, 2002. DOI: 10.1042/BA20010077.

SPROCKETT, D. D.; PIONTKIVSKA, H.; BLACKWOOD, C. B. **Evolutionary analysis of glycosyl hydrolase family 28 (GH28) suggests lineage-specific expansions in necrotrophic**

**fungal pathogens.** *Gene*, [s.l.], v. 479, n. 1–2, p. 29–36, 2011. DOI: 10.1016/j.gene.2011.02.009.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. **MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11.** *Molecular Biology and Evolution*, [s.l.], v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021. DOI: 10.1093/molbev/msab120.

TSIRIGOS, K. D. *et al.* **The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides.** *Nucleic Acids Research*, [s.l.], v. 43, n. W1, p. W401–W407, 2015. DOI: 10.1093/nar/gkv485.

VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. **Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s.l.], v. 91, n. 6, p. 1477–1492, 2011. DOI: 10.1007/s00253-011-3473-2.

VAN POUDEROYEN, G. *et al.* **Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from *Aspergillus niger*.** *FEBS Letters*, [s.l.], v. 554, n. 3, p. 462–466, 2003. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)01221-3.

VAN SANTEN, Y. *et al.* **1.68-Å Crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis.** *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 274, n. 43, p. 30474–30480, 1999. DOI: 10.1074/jbc.274.43.30474.

VILLARREAL, F.; STOCCHI, N.; HAVE, A. T. **Functional classification and characterization of the fungal glycoside hydrolase 28 protein family.** *Journal of Fungi*, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 217, 2022. DOI: 10.3390/jof8030217.

WANG, S. W.; BITBOL, A. F.; WINGREEN, N. S. **Revealing evolutionary constraints on proteins through sequence analysis.** *PLOS Computational Biology*, [s.l.], v. 15, n. 4, p. e1007010, 2019. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007010.

WEI, W. *et al.* **A fungal extracellular effector inactivates plant polygalacturonase-inhibiting protein.** *Nature Communications*, [s.l.], v. 13, n. 1, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-29788-2.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. **Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel.** *Trends in Food Science & Technology*, [s.l.], v. 17, n. 3, p. 97–104, 2006. DOI: 10.1016/j.tifs.2005.10.008.

XIAO, Y. *et al.* **A plant mechanism of hijacking pathogen virulence factors to trigger innate immunity.** *Science*, [s.l.], v. 383, n. 6684, p. 732–739, 2024. DOI: 10.1126/science.adj9529.

XU, H. *et al.* **Overexpression and biochemical characterization of an endo- $\alpha$ -1,4-polygalacturonase from *Aspergillus nidulans* in *Pichia pastoris*.** *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 21, n. 6, p. 2100, 2020. DOI: 10.3390/ijms21062100.

YODER, M. D.; KEEN, N. T.; JURNAK, F. **New domain motif: the structure of pectate lyase c, a secreted plant virulence factor.** *Science*, [s.l.], v. 260, n. 5113, p. 1503–1507, 1993. DOI: 10.1126/science.8502994.

YU, C. *et al.* **Prediction of protein subcellular localization.** *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, [s.l.], v. 64, n. 3, p. 643–651, 2006. DOI: 10.1002/prot.21018.

ZHAI, Z. *et al.* **Genome-wide identification of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) and polygalacturonase (PG) genes and characterization of their role in fruit softening of sweet cherry.** *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 22, n. 22, p. 12331, 2021. DOI: 10.3390/ijms222212331.

ZHAO, Z. *et al.* **Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi.** *BMC Genomics*, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 274, 2013. DOI: 10.1186/1471-2164-14-274.

ZHOU, X. *et al.* **Genome-wide identification and characterization of bHLH family genes from *Ginkgo biloba*.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 13723, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-69305-3.

## TERCEIRA PARTE

### 2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo investigou de forma integrada as características estruturais, funcionais e evolutivas de poligalacturonases (PGs) e proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs), com o propósito de aprofundar o entendimento sobre os mecanismos moleculares que sustentam a resistência de plantas a patógenos. Com base na importância reconhecida da interação PG–PGIP para o manejo de doenças agrícolas, buscou-se gerar informações que possam servir como fundamento para o desenvolvimento de cultivares mais resistentes e para a implementação de estratégias de controle mais sustentáveis, especialmente frente a patógenos necrotróficos como *Sclerotinia sclerotiorum*.

A análise genômica e comparativa de PGIPs de diferentes espécies vegetais revelou padrões de conservação e diversidade quanto à filogenia, propriedades proteicas, localização subcelular, domínios e motivos estruturais, estrutura gênica e elementos cis-regulatórios, apontando características associadas a funções defensivas. Ensaios de expressão transiente dos genes *PvuPGIP1* e *PvuPGIP2* em *Nicotiana benthamiana* mostraram redução significativa dos sintomas de mofo branco nos primeiros dias após a inoculação, sugerindo um papel ativo na contenção inicial do patógeno. Já a caracterização de PGs da família GH28 em fungos fitopatogênicos permitiu identificar grupos filogenéticos, motivos conservados e propriedades estruturais relevantes para a interação com PGIPs vegetais, contribuindo para a compreensão da evolução e da diversidade funcional dessas enzimas.

Como contribuição, este trabalho oferece um conjunto abrangente de dados moleculares e funcionais que fortalecem a base científica para programas de melhoramento genético e aplicações biotecnológicas voltadas à sanidade vegetal. Entre as limitações, destaca-se a necessidade de ter realizado a quantificação da expressão gênica por qPCR nos ensaios de expressão transiente, o que teria conferido maior robustez às evidências experimentais. Nesse sentido, estudos futuros podem incluir essa abordagem, além de investigar a expressão estável de PGIPs em espécies de interesse agrícola, explorar interações proteína–proteína por modelagem estrutural dinâmica e avaliar a variabilidade natural desses genes em germoplasma de cultivos estratégicos.

De forma geral, os resultados apresentados nesta tese reforçam o potencial das PGIPs como componentes-chave da defesa vegetal e evidenciam o valor de abordagens integradas — combinando análises bioinformáticas e experimentais — para avançar na compreensão e no

manejo molecular de doenças de plantas, com repercussões científicas, tecnológicas, econômicas e ambientais.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S. *et al.* **Data analysis of polygalacturonase inhibiting proteins (PGIPs) from agriculturally important proteomes.** Data in Brief, [s.l.], v. 52, p. 109831, 2024. DOI: 10.1016/j.dib.2023.109831.
- AMSELEM, J. *et al.* **Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*.** PLoS Genetics, [s.l.], v. 7, n. 8, p. e1002230, 2011. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002230.
- BORRAS-HIDALGO, O. *et al.* **A gene for plant protection: Expression of a bean polygalacturonase inhibitor in tobacco confers a strong resistance against *Rhizoctonia solani* and two oomycetes.** Frontiers in Plant Science, [s.l.], v. 3, p.268, 2012. DOI: 10.3389/fpls.2012.00268.
- DI, C. *et al.* **Role of poly-galacturonase inhibiting protein in plant defense.** Critical Reviews in Microbiology, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 91–100, 2006. DOI: 10.1080/10408410600709834.
- JANNI, M. *et al.* **The expression of a bean PGIP in transgenic wheat confers increased resistance to the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*.** Molecular Plant-Microbe Interactions, [s.l.], v. 21, n. 2, p. 171–177, 2008. DOI: 10.1094/MPMI-21-2-0171.
- JONES, T. M.; ANDERSON, A. J.; ALBERSHEIM, P. **Host-pathogen interactions IV.** Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Physiological Plant Pathology, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 153–166, 1972. DOI: 10.1016/0048-4059(72)90023-9.
- JOUBERT, D. A. *et al.* **A polygalacturonase-inhibiting protein from grapevine reduces the symptoms of the endopolygalacturonase BcPG2 from *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana* leaves without any evidence for *in vitro* interaction.** Molecular Plant-Microbe Interactions, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 392–402, 2007. DOI: 10.1094/MPMI-20-4-0392.
- MANFREDINI, C. *et al.* **Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection.** Physiological and Molecular Plant Pathology, [s.l.], v. 67, n. 2, p. 108–115, 2005. DOI: 10.1016/j.pmpp.2005.10.002.
- MURMU, S. *et al.* **In-silico study of E169G and F242K double mutations in leucine-rich repeats (LRR) polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) of *Gossypium barbadense* and associated defense mechanism against plant pathogens.** Journal of Cotton Research, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 3, 2025. DOI: 10.1186/s42397-024-00203-z.
- POWELL, A. L. T. *et al.* **Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization.** Molecular Plant-Microbe Interactions, [s.l.], v. 13, n. 9, p. 942–950, 2000. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.9.942
- WANG, Z. *et al.* **Interaction between *Brassica napus* polygalacturonase inhibition proteins and *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase: implications for rapeseed**

**resistance to fungal infection.** *Planta*, [s.l.], v. 253, n. 2, 2021. DOI: 10.1007/s00425-020-03556-2.

## ANEXOS

### ANEXO A - MEIO MES – MEIO DE INFILTRAÇÃO

#### Solução estoque:

0.5M MES-KOH ( 10X ), pH 5.6 = 9.76g/100ml (autoclave)

MgCl<sub>2</sub> 10mM<sup>-1</sup>

0.2M Acetoseríngona dissolvida em DMSO, 0.1962g/5mL

#### Concentração final dos reagentes:

5 ml 10X MES-KOH 50mM

0.5 ml 100X Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2mM

250 mg Dextrose (D-Glc) dissolver primeiro em água e depois adicionar ao meio 0.5% (w/v)  
= peso volume.

50 µl 0.2M Acetoseríngona 200 µM

### Meio de Infiltração MI

Preparar imediatamente antes da infiltração

Meio de Infiltração (100 mL)	
MES	10 mL
MgCl <sub>2</sub>	10 mL
Dextrose	10 ml
Acetoseríngona	100 µL

### Antibióticos:

Agrobactéria: **PGIP 2** = AGL1= Rifampicina (20 ml/l)+ Kanamicina (50 ml/L) + Streptomicina (200 ml/L)

Agrobactéria: **PGIP 1** = LBA 4404 = Rifampicina + Kanamicina + Streptomicina