

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

HIGO SANCHES BATISTA DAMIÃO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES CODIFICANTES DE
QUITINASE NO GENOMA DE *Handroanthus impetiginosus***

PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2019

HIGO SANCHES BATISTA DAMIÃO

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES CODIFICANTES DE
QUITINASE NO GENOMA DE *Handroanthus impetiginosus***

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa

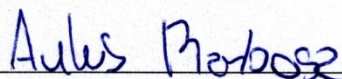
**PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2019**

HIGO SANCHES BATISTA DAMIÃO

**Identificação e caracterização de genes codificantes de quitinase no genoma de
*Handroanthus impetiginosus***

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca Examinadora:



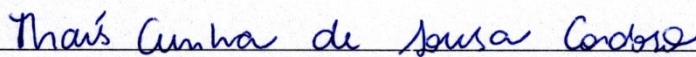
Prof. Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa – IBTEC/UFU

Presidente



Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte – IBTEC/UFU

Membro



Msc. Thaís Cunha de Sousa Cardoso – IBTEC/UFU

Membro

Patos de Minas - MG, 02 de dezembro de 2019

RESUMO

Quitinases são enzimas capazes de hidrolisar quitinas, que são o segundo polímero mais abundante no planeta, presente no exoesqueleto de insetos e parede celular de fungos. As quitinases em plantas estão divididas em duas famílias de glicosil hidrolases, famílias 18 e 19, e subdivididas nas classes I, II, III, IV e V. Estas enzimas têm sua principal função relacionada a proteção contra insetos e patógenos que possuem quitina em sua composição. Portanto, essa característica pode ser utilizada, com o auxílio da engenharia genética, para gerar plantas resistentes as pragas. Atualmente, a genômica e a bioinformática possibilitam a identificação desses genes de resistência a partir do genoma de plantas. O ipê-rosa (*Handroanthus impetiginosus*) é conhecido por sua grande resistência a insetos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi a identificação e caracterização de genes de quitinases no genoma de *Handroanthus impetiginosus*. Usando os programas BLASTp, Blast2GO e MEGAX foi realizada uma busca por genes de quitinases das famílias 18 e 19 no genoma de *H. impetiginosus*. Em seguida foram confirmadas se essas sequências possuíam domínios catalíticos de glicosil hidrolase das famílias 18 ou 19. Estas sequências foram alinhadas e analisadas por árvores filogenéticas, a fim de classificar essas quitinases dentro das cinco classes conhecidas. O site WoLF PSORT foi utilizado para indicar a possível localização celular das quitinases e o SWISS-MODEL foi utilizado para predição das estruturas 3D. As buscas resultaram em 12 genes da família 18 e 15 genes da família 19, todos apresentando os domínios e estrutura 3D características das quitinases.

Palavas-chave: Quitinases, Ipê-rosa, Resistência a insetos.

ABSTRACT

*Chitinases are enzymes capable of hydrolyzing chitins, which are the second most abundant polymer on the planet, present in insect exoskeleton and fungal cell wall. Chitinases in plants are divided into two families of glycosyl hydrolases, families 18 and 19, and subdivided into classes I, II, III, IV and V. These enzymes have their main function related to protection against chitin-containing insects and pathogens. composition. Therefore, this trait can be used, with the help of genetic engineering, to generate pest resistant plants. Currently, genomics and bioinformatics make it possible to identify these resistance genes from the plant genome. The pink ipe (*Handroanthus impetiginosus*) is known for its great insect resistance. Therefore, the objective of this work was the identification and characterization of chitinases genes in the *Handroanthus impetiginosus* genome. Using the BLASTp, Blast2GO and MEGAX programs, a search for chitinase genes from families 18 and 19 in the *H. impetiginosus* genome was performed. These sequences were then confirmed to have family 18 or 19 glycosyl hydrolase catalytic domains. These sequences were aligned and analyzed by phylogenetic trees to classify these chitinases into the five known classes. The WoLF PSORT site was used to indicate the possible cellular location of chitinases and SWISS-MODEL was used to predict 3D structures. The searches resulted in 12 family 18 genes and 15 family 19 genes, all featuring the 3D domains and structure characteristic of chitinases.*

Keywords: Chitinases. Pink-ipe. Insect resistan

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da quitina.....	8
Figura 2 - Estrutura polimórficas das quitinas, onde as setas representam as disposições das lamelas.	8
Figura 3 - Estrutura 3D de quitinases: (A) Uma quitinase GH18 de <i>Aspergillus fumigatus</i> mostrando as 8 α -hélices e 8 β - folhas (PDB ID: 2XVP). (B) Uma quitinase GH19 de <i>Carica papaya</i> mostrando a estrutura rica em α -hélices (PDB ID: 3CQL).	10
Figura 4 - Ipê-rosa (<i>Handroanthus impetiginosus</i>)	13
Figura 5 - Alinhamento das sequencias de quitinases de <i>H. impetiginosus</i> A: Alinhamento das quitinases da família 18 da classe III de <i>H. impetiginosus</i> , contra quitinases de plantas descritas na Tabela 1. Circulado em vermelho estão os domínios catalíticos conservados. B: Alinhamento das quitinases da família 18 da classe V de <i>H. impetiginosus</i> , contra quitinases de plantas descritas na Tabela 1. Circulado em vermelho estão os domínios catalíticos conservados	20
Figura 6 - Alinhamento das quitinases da família 19 de <i>H. impetiginosus</i> , contra quitinases de plantas descritas na Tabela 1. Circulado em roxo estão os domínios catalíticos conservados.	21
Figura 7 - Árvore filogenética das proteínas de quitinase encontrados no genoma de <i>H. impetiginosus</i> da família 18 classes III e V. A árvore foi construída no programa MEGA-X (versão 10.1.1) baseada no modelo Neighbor-Joining, usando um alinhamento das sequências de proteínas descritos na Tabela 1.	22
Figura 8 - Árvore filogenética das proteínas de quitinase encontrados no genoma de <i>H. impetiginosus</i> da família 19, classes I, II e IV. A árvore foi construída no programa MEGA-X (versão 10.1.1) baseada no modelo Neighbor-Joining, usando um alinhamento das sequências de proteínas descritos na Tabela 1	23
Figura 9 - Estruturas 3D da família 18 classe III: A (PIN06881.1), B (PIM97840.1), C (PIM97839.1).	28
Figura 10 - Estruturas 3D de quitinases da família 18 classe V: A (PIN03288.1) B (PIN12608.1) C (PIN20583.1), D (PIM97645.1), E (PIN04207.1), F (PIN20582.1), G (PIN20581.1), H (PIN04206.1.), I (PIN04208.1).....	29
Figura 11 - Estruturas 3D de quitinases da família 19 classe I: A (PIN25493.1), B (PIN20556.1).....	29
Figura 12 - Estruturas 3D de quitinases da família 19 classe II.....	30
Figura 13 - Estruturas 3D de quitinases da família 19 classe IV: A (PIN15007.1), B (PIN18442.1), C (PIN18433.1), D (PIN14601.1), E (PIN15006.1), F (PIN15005.1), G (PIN18439.1), H (PIN18440.1), I (PIN14602.1), J (PIN18441.1), K (PIN03387.1), L (PIN15008.1).....	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REFERENCIAL TEÓRICO	7
2.1	Quitina	7
2.2	Classificação das quitinases	9
2.3	Funções e aplicações das quitinases	11
2.4	Ipê-rosa (<i>Handroanthus impetiginosus</i>)	12
2.5	Bioinformática	13
3	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivo geral	14
3.2	Objetivos específicos	14
4	Material e métodos	14
4.1	Busca por genes de quitinase no genoma de ipê-rosa	14
4.2	Análise de domínios conservados	15
4.3	Alinhamento e construção da árvore filogenética	15
4.4	Busca por peptídeo sinal	16
4.5	Modelagem da estrutura 3D	16
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1	Genes encontrados contra o genoma de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	16
5.2	Árvore filogenética e classificação dos genes	21
5.3	Análise de predição de localização subcelular de genes quitinase expressos em <i>Handroanthus impetiginosus</i>	23
5.4	Predição da estrutura 3D	26
6	Conclusão	31
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

Na agricultura mundial predominam as técnicas de monocultura onde várias plantas de uma mesma espécie são plantadas próximas umas das outras, com o objetivo de aproveitar melhor o espaço e aumentar a produtividade. O problema da monocultura é que se uma plantação for atingida por uma praga ela se espalhará muito rapidamente, o que gera enormes perdas para os agricultores. Por isso, para o controle de pragas os agricultores fazem usos de pesticidas.

Os pesticidas são muito nocivos e prejudiciais e, por isso, foram desenvolvidas, através de técnicas de engenharia genética, cultivares resistentes a pragas que necessitam de menos agrotóxicos. Para a criação dessas cultivares geneticamente melhoradas, é necessário o conhecimento de genes que confirmam a essas plantas as características de resistência a insetos e patógenos que atacam as lavouras e, através da bioinformática, são realizadas pesquisas que identificam estes genes a partir do genoma de plantas.

O ipê-rosa (*Handroanthus impetiginosus*) foi a primeira planta do Cerrado a ter seu genoma sequenciado, e é conhecido por sua fácil adaptação e resistência a insetos. Essa espécie apresenta um grande potencial para a presença de genes de quitinase, enzima que está associada à resistência a insetos e a patógenos em plantas. Estes genes, identificados no genoma de ipê-rosa poderão ser usados na criação de plantas resistentes a insetos e a patógenos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

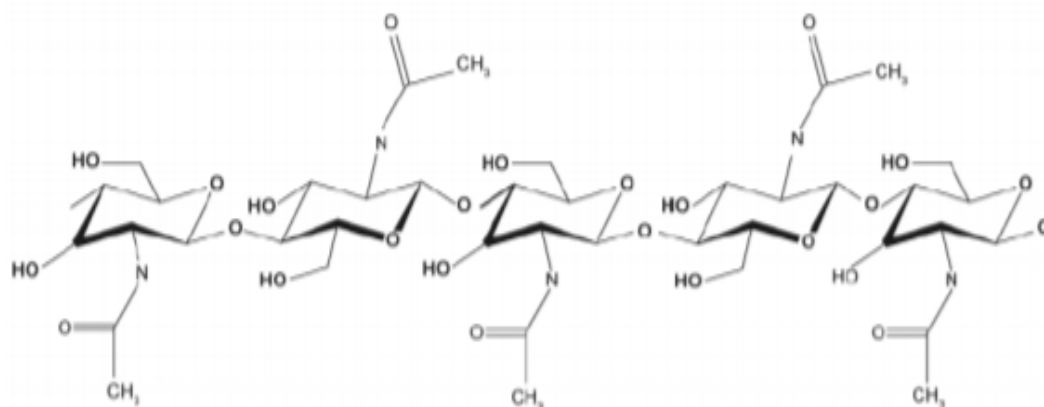
2.1 Quitina

Semelhante à celulose a quitina é um polissacarídeo linear, cujos monômeros são N-acetilglicosaminas (GlcNAc) unidos por meio de ligações glicosídicas β -1,4 (Figura 1). Sendo o principal componente da parede celular de fungos, do exoesqueleto dos insetos e das conchas dos moluscos (NEIVA, 2005). As quitinas apresentam três diferentes estruturas polimórficas: α -quitina, β -quitina e γ -quitina (Figura 2).

A α -quitina é a mais comum delas e tem uma estrutura mais densa, com diferentes lamelas ou folhas dispostas de forma antiparalela das cadeias poliméricas. Essa estrutura favorece a existência de numerosas ligações hidrogênio inter- e intra-cadeias da mesma

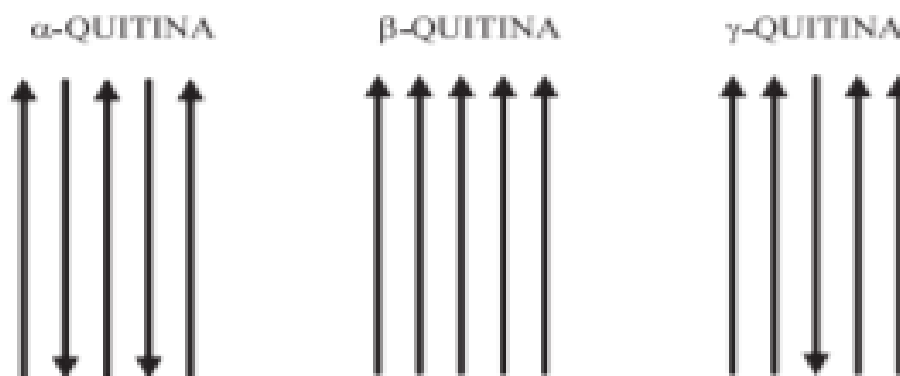
lamela e de lamelas vizinhas. Ela é encontrada na parede celular dos fungos e carapaças dos caranguejos, lagostas, camarões e na cutícula de insetos. A β -quitina é mais rara e menos densa, formada por diferentes lamelas que se dispõem paralelamente. Isto dificulta a formação de ligações hidrogênio intermoleculares envolvendo cadeias de lamelas adjacentes e resulta em material menos densamente empacotados, são encontradas em gládios de cefalópodes. E a γ -quitina ocorre como se fosse uma combinação das α -quitinas e β -quitina, sendo cadeias de duas lamelas em disposição paralela são intercaladas por lamela que se dispõem antiparalelamente. Essa estrutura é menos estudada e conhecida, sugerindo que possa ser uma distorção das duas estruturas anteriores. São encontradas em casulos de insetos (Figura 2) (GODONE, 2011; CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Figura 1 - Estrutura da quitina.



Fonte: Borgognoni, Polakiewicz e Pitombo (2006).

Figura 2 - Estrutura polimórficas das quitinas, onde as setas representam as disposições das lamelas.



Fonte: Campana-Filho et al., (2007)

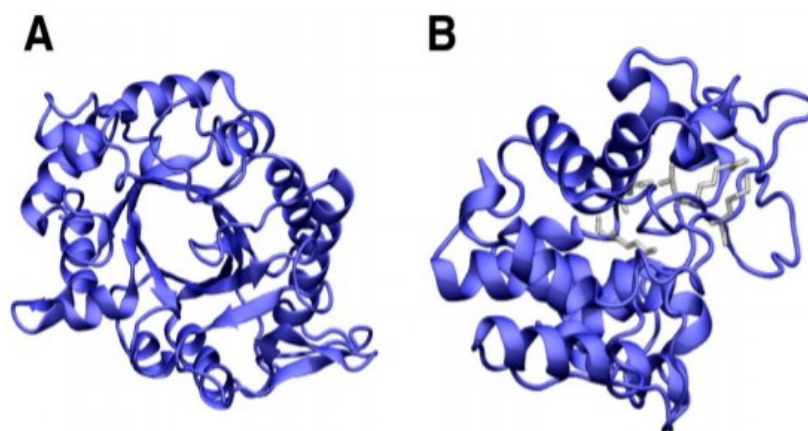
2.2 Classificação das quitinases

As quitinases são enzimas capazes de degradar a quitina e são divididas em dois grupos quanto ao seu mecanismo catalítico, as endoquitinases e exoquitinases. As endoquitinases atuam clivando aleatoriamente sítios internos da quitina, produzindo múltiplos de N-acetilglicosamina de baixo peso molecular. E as exoquitinases são divididas em dois subgrupos: quitobiosidases, que clivam a quitina a partir da extremidade não redutora liberando diacetilquitobiose (dímero de N-acetilglicosamina), e 1-4- β -glicosaminidase, que clivam os oligômeros da quitina liberados pelas endoquitinases e quitobiosidases, produzindo monômeros GlcNAc (ALEXANDRE, 2018).

As quitinases também são classificadas baseadas na similaridade de sequências de resíduos de aminoácidos. Sendo divididas então em famílias denominadas 18, 19 e 20. As famílias 18 e 19 são subdivididas em cinco classes I, II, III, IV, V. Sendo as classes I, II e IV pertencentes a família 19, que está presente em plantas e bactérias *Streptomyces*. As classes III e V pertencente à família 18, que está presente em vírus, fungos, bactérias, insetos e algumas plantas. E a família 20 e o grupo de quitinases encontradas nos seres humanos, no ameboide *Dictyostelium discoideum* e na bactéria *Vibrio harveyi* (NEIVA, 2005; ALEXANDRE, 2018).

Quitinases que pertencem a família 18 têm estrutura tridimensional característica formada por 8 α -hélices e 8 β -folhas (Figura 3A). Já as quitinases que pertencem a família 19 possuem em sua estrutura 10 α -hélices podendo ou não encontrar folhas β em sua estrutura, e possuem seu processo de hidrólise realizado por catálise assistida pelo substrato (Figura 3B). O mecanismo catalítico da proteína da família 19 requer um resíduo de Glutamina que atua como um catalisador ácido para atacar o átomo de carbono 1 do fragmento de quitina. Possui catálise mediada por acidez com inversão do carbono anomérico de β para α . (GUIMARÃES, 2019; KERN, 2003).

Figura 3 - Estrutura 3D de quitinases: (A) Uma quitinase GH18 de *Aspergillus fumigatus* mostrando as 8 α -hélices e 8 β -folhas (PDB ID: 2XVP). (B) Uma quitinase GH19 de *Carica papaya* mostrando a estrutura rica em α -hélices (PDB ID: 3CQL).



Fonte: Humphrey et al. (1996).

As quitinases GH18 classe III são caracterizadas por 8 α -hélices e 8 β -folhas formando uma topologia em barril, um sítio ativo contendo dois aspartatos e um resíduo de ácido glutâmico separados por fenilalanina e isoleucina. A classe III hidrolisa a quitina por um mecanismo de deslocamento duplo que envolve dois resíduos catalíticos e prossegue através de um intermediário de oxocarbonium distorcido geometricamente. O local catalítico é formado pelas extremidades do terminal C dos fios e dos laços que os ligam às hélices subsequentes (KESARI et al., 2015).

As quitinases de classe V incluem o domínio principal e um domínio de inserção dispostos de maneira que o sítio ativo seja formado no meio para acomodar a cadeia da quitina. Esta interação ocorre por meio do empilhamento entre os anéis de piranose do GlcNAc e resíduos hidrofóbicos que revestem a fenda. O domínio é homólogo da família GH18 e adota dobra de 8 α -hélices e 8 β -folhas paralelas que se alternam ao longo da estrutura do peptídeo, enquanto o domínio de inserção, é composto por cinco folhas antiparalelas ladeado por uma hélice de um lado e um longo laço do outro lado. O sítio catalítico localizado em uma extremidade da fenda é muito eletronegativo (KESARI et al., 2015).

A família 19 contém as classes I, II e IV. A classe I contém um domínio de heveína rico em cisteína, uma região de dobra rica em glicina, prolina e treonina em seu N-terminal. Ela possui um peptídeo de sinal para direcionamento vacuolar na extremidade COOH-terminal. As quitinases da classe II são extracelulares e mais ácidas se comparadas as demais classes da família 19, costumam constituir a primeira linha de defesa contra fungos patogênicos. As

quitinases classe IV se assemelham a quitinase classe I, mas são menores em comparação com o domínio heveína devido a deleções de resíduos. O domínio heveína tem 43 resíduos e é estabilizado por quatro pontes dissulfeto. Essas pontes são também essenciais para a ligação à quitina (KESARI et al., 2015; MISHRA et al., 2015).

2.3 Funções e aplicações das quitinases

As quitinases em fungos estão associadas a predação e a colonização, têm extrema importância para patogênese de infestação por fungos. Por exemplo essas enzimas são largamente utilizadas por *Metarhizium anisopliae* na colonização de lagartas *Manduca sexta* digerindo a cutícula e a membrana peritrófica do inseto. Em insetos a quitinase está associada a degradação de seu exoesqueleto em suas diferentes fases larvais. Já as bactérias produzem quitinases para obtenção de nutrientes a partir da molécula de quitina (GOHEL et al., 2006).

Quitinases em plantas estão associadas a defesas contra pragas que possuem quitina em sua composição, como fungos e insetos (GODONE, 2011). Quando ingeridas pelos insetos elas causam danos à membrana peritrófica no intestino que podem resultar na diminuição significativa na alimentação (AUGUSTO, 2018). A quitinase também inibe o crescimento de fungos como demonstrado por alguns estudos (ALEXANDRE, 2018). As quitinases em plantas também apresentam outras funções fisiológicas que não estão relacionadas diretamente com sua atividade hidrolítica. Por exemplo, endoquitinases do centeio apresentaram atividades anticongelante (YEH et al., 2000), e Yang e colaboradores (2011) mostraram que quitinases podem agir como proteínas armazenadoras de cálcio.

As quitinases possuem uma variedade de aplicações que vão desde a degradação eficiente e não poluente de resíduos quitinosos, até o combate de pragas e fitopatógenos, já que fungos e insetos possuem quitina como estrutura vital (DAHIYA; TEWARI; HOONDAL, 2006). Os produtos formados pela hidrólise da quitina também possuem aplicações. Os monômeros GlcNAc, por exemplo, são utilizados em produtos alimentícios como prébióticos, promovendo o crescimento de bifidobactérias. As quitinases também tem sido utilizada para obtenção de quitosana, pois evita a formação de subprodutos indesejáveis e controla a cinética de produção dos polímeros de quitosanas com graus desejados de desacetilação. As quitosanas possuem propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de ser um ótimo agente adsorativo, podendo ser integrado a biomateriais e compor sistemas nanoestruturados carreadores de fármacos (ALEXANDRE, 2018).

A caracterização bioquímica e atividades biológicas de quitinases foi realizada por VIANA (2015) no látex de *Calotropis poncera*. Essas proteínas foram testadas contra células cancerígenas HCT-116 de colon, Ovar-8 de ovário e SF-295 de glioblastoma, as quais apresentaram efeito citotóxico contra as células cancerígenas. Os autores do trabalho acreditam que esse efeito citotóxico se deve a presença de quitinases nesse látex. Isso também foi observado no trabalho de Pan, Shi e Harday (2005), onde foi evidenciado efeito citotóxico de quitinases isoladas de *Serratia marcescens* e *Streptomyces griseus*, *in vitro* e antitumoral *in vivo*, sendo capaz de causar lise em células de câncer de mama MCF-7.

2.4 Ipê-rosa (*Handroanthus impetiginosus*)

O ipê-rosa pertence à família Bignoniaceae (FLORA, 2012) e é uma árvore de madeira de lei, amplamente distribuída em florestas tropicais sazonalmente secas do sul e da Mesoamérica. Essa árvore produz grandes quantidades de produtos naturais, como os quinoides, metabólitos especializados com efeitos antitumorais e anti-inflamatórios. Adicionalmente, antibióticos promissores, em extratos obtidos da casca de *Handroanthus impetiginosus*, demonstraram propriedades antifúngicas (SILVA-JUNIOR et al, 2018; HASHIMOTO, 1996).

Esta árvore tem sido escolhida para arborização urbana, por ter uma fácil adaptação a variados tipos de condições climáticas. São encontrados diversos tipos de subespécies regionais, e que não exigem cuidados especiais na hora do cultivo. Apresentam também uma boa durabilidade e resistência contra organismos que se alimentam da madeira, conhecido como xilófagos, tendo uma madeira difícil de serrar ou pregar, o que faz com que seja usada para acabamentos internos, bolas de boliche, construção civil, currais e instrumentos musicais (SANTOS et al., 2018). Notavelmente, o ipê-rosa é a primeira planta do Cerrado e da família Bignoniaceae a ter seu genoma sequenciado (SILVA-JUNIOR et al, 2018).

O genoma de *H. impetiginosus* tem 503Mbp dos 557 Mb originais (90%) divididos em 13.206 “scaffolds” distribuídos entre 20 cromossomos. O tamanho médio das sequências de “scaffolds” foi de 38.118 pb. Contigs gerados por corte dos “scaffolds” em cada intervalo de pelo menos 25 pares de bases, produziu um N50 de 40.064 pb com um tamanho médio de sequência de 19.765 pb. As lacunas restantes compreendiam 26.447.057 pb (5,25% do conjunto do genoma) em 11.094 segmentos, com um tamanho de 2.384 a 3.167 pb. Foram identificados 31 688 genes que codificam proteínas no genoma, onde 28.603 (90%) produziram modelos de genes de confiança elevada (SILVA-JUNIOR et al, 2018).

Figura 4 - Ipê-rosa (*Handroanthus impetiginosus*)



Fonte: SILVA-JUNIOR et al, 2018

2.5 Bioinformática

A bioinformática é uma área de conhecimento de extrema importância para a manipulação dos dados biológicos. Ela pode ser definida como uma modalidade que abrange todos os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação de informação biológica. Várias ferramentas que nos auxiliam a compreender o

significado biológico, representado nos dados genômicos, são desenvolvidos através da combinação de procedimentos e técnicas da matemática, estatística e ciência da computação. Além disso, a criação de bancos de dados, com as informações já processadas, acelera a investigação em outras áreas como a medicina, a biotecnologia e agronomia (BORÉM e SANTOS, 2003). A bioinformática permite, também, a estruturação de proteínas 3D, dado de extrema importância pois a ação das proteínas está relacionada a esta estrutura. A bioinformática possibilita de maneira mais fácil e rápida a busca por genes em um genoma, e a comparação de um genoma com outros genomas, o que possibilita identificar a proximidade ou parentesco entre eles.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar genes codificantes de quitinase no genoma do ipê-rosa (*Handroanthus impetiginosus*)

3.2 Objetivos específicos

- Identificar genes codificantes das quitinases no genoma de ipê-rosa.
- Classificar as sequências encontradas nas subfamílias 18 e 19.
- Identificar a provável localização celular
- Modelar a estrutura 3D das quitinases do ipê-rosa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Busca por genes de quitinase no genoma de ipê-rosa

Foi realizada uma busca na literatura científica, no banco de dados PubMed, por artigos que descreviam as quitinases de plantas suas famílias e classes (CARBOHYDRATE ACTIVE ENZYMES, 2019; KESARI et al., 2015). Após revisão da literatura, foram retiradas do site CAZy (CARBOHYDRATE ACTIVE ENZYMES, 2019) sequências de proteínas de quitinase de cada família e classe (Tabela 1).

Os genes listados na tabela 1 foram salvos no formato FASTA e utilizados em uma busca usando o BLASTp (NCBI - NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY

INFORMATION, 2019) presente no banco de dados NCBI contra o genoma da planta *Handroanthus impetiginosus*. Os resultados foram salvos em formato FASTA.

Tabela 1 – Proteínas de quitinase utilizadas como “query” no estudo e suas respectivas famílias e classes com código de acesso ao NCBI.

Família	Classe	Espécie	Código de acesso
Família 18	III	<i>Acacia koa</i>	AFY08286.1
	V	<i>Lotus japonicus</i>	ANS10044.1
Família 19	I	<i>Casuarina equisetifolia</i>	ADQ43720.1
	II	<i>Theobroma cacao</i>	EOX95466.1
	IV	<i>Actinidia chinensis</i>	AET25429.1

Fonte: (CAZy, 2019).

4.2 Análise de domínios conservados

Os resultados obtidos com o BLASTp foram avaliados pelas ferramentas Blast e InterProScan do programa Blast2GO Free 5.2 (CONESA et al., 2005). Foi selecionado somente o banco de dados PFAM na análise do InterProScan. Foram selecionados os genes que apresentaram os domínios catalíticos de glicosil hidrolase da família 18 ou 19, nos genes de *Handroanthus impetiginosus*.

4.3 Alinhamento e construção da árvore filogenética

As sequências de proteínas positivas para a presença dos domínios de glicosil hidrolases das famílias 18 e 19 foram separadas por família e alinhadas com os genes de quitinases de plantas listadas na Tabela 1. O alinhamento múltiplo foi feito pelo método MUSCLE realizado pelo programa MEGA-X (versão 10.1.1) (KUMAR et al., 2019). Estes alinhamentos foram editados e salvos em formato FASTA. As imagens para apresentação dos domínios conservados das quitinases foram feitos utilizando o programa BioEdit (versão 7.0.5.3) (HALL, 1999).

Após a edição, foram adicionados aos arquivos FASTA, contendo as sequências de proteína das quitinases de *Handroanthus impetiginosus*, as sequências de proteína quitinase de outras plantas. Esse arquivo foi utilizado para análise filogenética pelo programa MEGA-X (versão 10.1.1) (KUMAR et al., 2019.). Duas árvores foram construídas, uma para a família

18 e outra para a família 19. As árvores foram construídas com o método Neighbor-Joining (NJ), modelo JTT e com teste de filogenia pelo método “bootstrap” com 1000 réplicas. Após a construção da árvore filogenética de cada família, foi possível a classificação das quitinases de *Handroanthus impetiginosus*. Foram separadas as classes III e V da família 18 por apresentarem domínio catalítico diferente e novamente alinhadas pelo método MUSCLE realizado pelo programa MEGA (versão 10.1.1) (KUMAR et al., 2019.).

4.4 Busca por peptídeo sinal

Análise de peptídeo sinal foi realizada utilizando o site WoLF PSORT (GENSCRIPT, 2019). Este programa busca similaridade com peptídeo sinal de outras plantas comparando com as sequências de *Handroanthus impetiginosus* e indica o possível local o qual aquela enzima é enviada após a síntese.

4.5 Modelagem da estrutura 3D

Para a modelagem da estrutura 3D das proteínas de *Handroanthus impetiginosus* foi utilizado o programa on-line SWISS-MODEL (BIOZENTRUM, 2019). Onde as sequências de proteínas foram comparadas a outros modelos e geradas de acordo com as já existentes no banco de dados. Com base nesse modelo o programa cria a possível estrutura 3D da enzima para aquela sequência

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Genes encontrados contra o genoma de *Handroanthus impetiginosus*

A busca por proteínas de quitinases contra o genoma de *H. impetiginosus* revelou 27 genes de quitinases, sendo elas 12 da família 18 e 15 da família 19 (Tabelas 2 e 3). Comparando com resultados de buscas de genes de quitinases em outras plantas Cao e Tan (2019) identificaram 43 genes de quitinases entre as famílias 18 e 19 em *Solanum lycopersicum*, e Tobias et al (2017) identificaram 67 genes de quitinase pertencentes as famílias 18 e 19 em *Eucalyptus grandis*. Adicionalmente, foram identificados 24 genes de quitinase em *Arabidopsis*, entre as famílias 18 e 19 (PASSARINHO e VRIES, 2002), e Mir e

colaboradores (2019) identificaram 47 e 79 genes que codificam quitinases em *Brassica juncea* e *Camelina sativa*, respectivamente distribuídos entre família 18 e 19.

O número de genes encontrados em *H. impetiginosus* se mostrou próximo ao encontrados em *Arabidopsis*, e abaixo do encontrado em *Solanum Lycopersicum*, *Eucalyptus grandis*, *Brassica juncea* e *Camelina sativa*. Esse número menor pode ter ocorrido devido ao fato de *H. impetiginosus* ser a primeira planta da família Bignoniaceae e do bioma Cerrado a ser sequenciada, sendo ela geneticamente muito distante das plantas onde as quitinases foram avaliadas.

Os resultados do Interproscan mostraram que todas as proteínas de quitinase encontrados no genoma de *H. impetiginosus* possuem o domínio conservado de glicosil hidrolases. Indicando que elas possuem as funções catalíticas das hidrólises de ligações glicosídicas, mantendo suas ações como degradantes de quitina (tabela 2 e 3).

Tabela 2– Código de acesso das proteínas de quitinase da família 18 encontrados no genoma *Handroanthus impetiginosus*. Número de aminoácidos (Nº de aa) e Similaridade (Simil).

Código	Resultado BLASTp	Nº de aa	E-value	Simil.	Nº Interproscan	Interproscan hit
PIN06881.1	acidic endochitinase-like	296	0.0	89.31	IPR001223 (PFAM)	Glycoside hydrolase family 18
PIM97840.1	Acidic endochitinase	302	0.0	88.9	IPR001223 (PFAM)	Glycoside hydrolase family 18
PIM97839.1	Acidic endochitinase	302	0.0	87.66	IPR001223 (PFAM)	Glycoside hydrolase family 18
PIN03288.1	class V chitinase-like	395	0.0	82.15	IPR001223 (PFAM)	Glycoside hydrolase family 18
PIN12608.1	Serine/threonine protein kinase	375	0.0	81.46	IPR001223 (PFAM)	Glycoside hydrolase family 18
PIN20583.1	Serine/threonine protein kinase	751	0.0	81.51	IPR001223 (PFAM)	Glycoside hydrolase family 18
PIM97645.1	Serine/threonine protein kinase	499	0.0	76.05	IPR001223 (PFAM)	Glycoside hydrolase family 18
PIN04207.1	Serine/threonine protein kinase	764	0.0	80.4	IPR001223 (PFAM)	Glycoside hydrolase family 18
PIN20582.1	Serine/threonine protein kinase	713	0.0	78.07	IPR001223 (PFAM)	Glycoside hydrolase family 18
PIN20581.1	Serine/threonine protein kinase	715	0.0	74.5	IPR001223 (PFAM)	Glycoside hydrolase family 18
PIN04208.1	cysteine-rich receptor-like protein kinase 10	643	0.0	79.43	IPR001223 (PFAM)	Glycoside hydrolase family 18
PIN04206.1	Serine/threonine protein kinase	647	0.0	68.2	IPR001223 (PFAM)	Glycoside hydrolase family 18

Tabela 3 – Código de acesso das proteínas de quitinase da família 19 encontrados no genoma *Handroanthus impetiginosus*. Número de aminoácidos (N de aa) e Similaridade(Simil).

Código	Resultado BLASTp	Nº de aa	E-value	Simil.	Nº Interproscan	Interproscan hit
PIN20105.1	chitinase 10	265	0.0	92.45	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN15007.1	endochitinase EP3-like	270	0.0	84.7	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN18442.1	putative chitinase	270	0.0	83.59	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN18433.1	endochitinase EP3-like	270	0.0	83.46	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN14601.1	endochitinase EP3-like	276	0.0	92.54	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN15006.1	putative chitinase	251	0.0	85.02	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN15005.1	endochitinase EP3-like	254	0.0	85.51	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN18439.1	endochitinase EP3-like	279	0.0	90.53	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN18440.1	endochitinase EP3-like	279	0.0	91.26	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN14602.1	endochitinase EP3-like	279	0.0	91.29	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN25493.1	chitinase-like protein 1	323	0.0	89.64	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN18441.1	endochitinase EP3-like	238	7,94E-163	90.24	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN20556.1	chitinase-like protein 1	385	0.0	92.56	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN03387.1	putative chitinase	137	8,84E-95	77.82	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19
PIN15008.1	putative chitinase	136	2,80E-90	84.9	IPR000726 (PFAM)	Glycoside hydrolase, family 19

O alinhamento das sequências de proteínas foi realizado pelo método MUSCLE do programa MEGA-X (versão 10.1.1) (KUMAR et al., 2019). O alinhamento das sequências permitiu a identificação da presença do domínio conservado das famílias 18 e 19 (Figuras 5 e 6).

Os mesmos domínios catalíticos das quitinasases foram encontradas por Tobias et al. (2017) em *Eucalyptus grandis*, nas famílias 18 e 19. Estes domínios foram demonstrados também por Passarinho e Vries (2002) em *Arabidopsis*, e também foram encontrados por Gama (2017) em genes de quitinasases do inseto *Rhodnius prolixus*. Estes dados demonstram a conservação do domínio catalítico de quitinase, mesmo comparados em espécies diferentes.

Figura 5 - Alinhamento das sequências de quitinasases de *H. impetiginosus* **A:** Alinhamento das quitinasases da família 18 da classe III de *H. impetiginosus*, contra quitinasases de plantas descritas na Tabela 1. Circulado em vermelho estão os domínios catalíticos conservados. **B:** Alinhamento das quitinasases da família 18 da classe V de *H. impetiginosus*, contra quitinasases de plantas descritas na Tabela 1. Circulado em vermelho estão os domínios catalíticos conservados

A:

```

120      130      140      150      160
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AFY08286.1 classe III  NSAAEANQPATYLNWNNFLGGRSNS--RPLGNAVLDGIDFDIEAGPGQHW
PIN06881.1             SSADDAKQVASYLNWNNFLGGESS--RPLGDAVLDGIDFDIEAGTNLYWD
PIM97840.1             SSKEDTQNFSLYLNWNNFLGGRSGSATRPLGDAFLDGIDLDIEAGSSLYD
PIM97839.1             SSKEDAQNFSLYLNWNNFLAGSGSATRPLGDAFLDGIDLDIEAGSSLYD

```

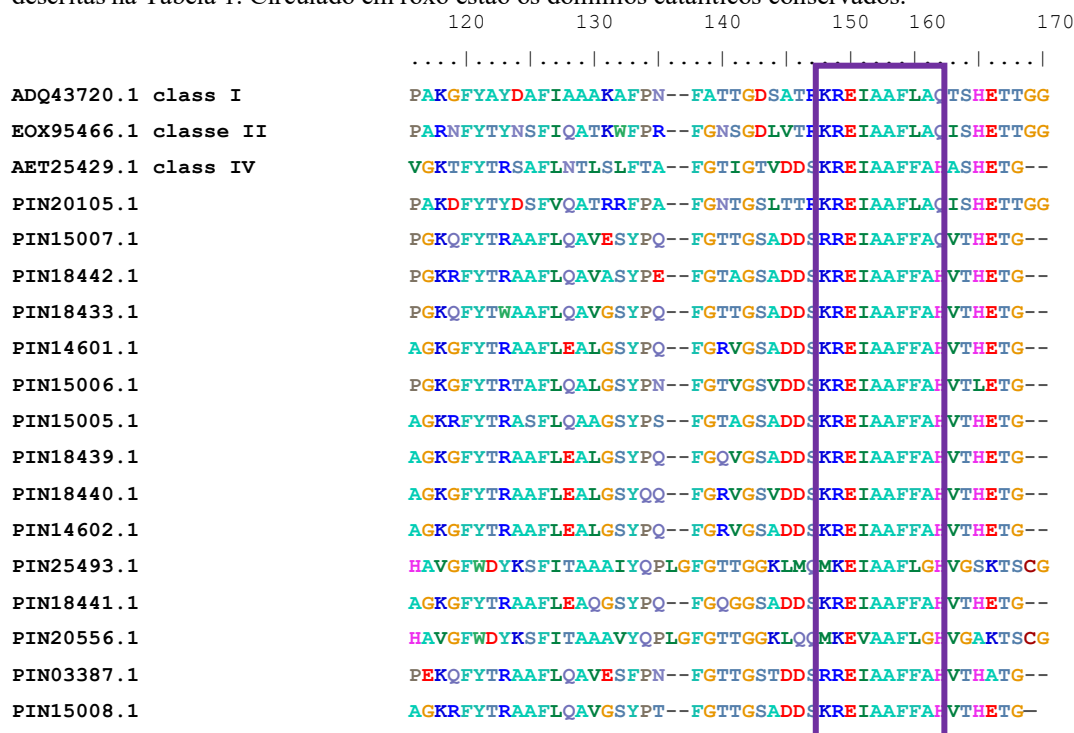
B:

```

160      170      180      190      200
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
ANS10044.1 classe V   NSTIHVARKHFFNGLDLDEWEPGDEKMSNLALLLKEWYKALVVEANTSR
PIN03288.1            DSSIRVARAYQFSGLDLDWEYPQTAGDMTNLGTLLTEWRAAVATEARSSG
PIN12608.1            RSAMIAARRHCFMGLDLSYVTPSTSANKANMRSEFFDEWREAINSEPRKYD
PIN20583.1            ESSIVAARRHCFMGLDLSYVTPPTPANMANMGSEFFTEWREAINLEPRKYD
PIM97645.1            KSSIMAARRHCFMGLDLSYVTPPTPANKANMGSEFFYEWREATNSEPRKYN
PIN04207.1            RSAMMAARRHCFMGLDLSYVTLSTSANMANMGSEFFDEWREAINSEPRKYD
PIN20582.1            ESSIMAARQYCFIGLDLSDVTPPTPANMASMGSEFFDEWREAINSEPRKYD
PIN20581.1            RSAMIAARRHCFMGLDLYDVTPSTSANKANMGSEFFDEWREAINSEPRKYD
PIN04208.1            ESSIMAARRHCFMGLDLFDVTPSTPANMDNMGIFLDEWRQAINSEPRKYD
PIN04206.1            ESSIMAARRNCFMGLDLFDVTPSTPANMANMGSEFLDEWRQAINSEQRKYN

```

Figura 6 - Alinhamento das quitinases da família 19 de *H. impetiginosus*, contra quitinases de plantas descritas na Tabela 1. Circulado em roxo estão os domínios catalíticos conservados.



5.2 Árvore filogenética e classificação dos genes

Na biologia as árvores filogenéticas são usadas para comparar as relações entre genes ou espécies. A determinação dessa relação é importante para compreender a evolução e conservação de um determinado gene entre as espécies vegetais. Sendo utilizada para identificar características similares com base nas características de genes ou fragmentos de DNA (MISHRA et al., 2015; DE OLIVEIRA, 2015). Por meio da construção da árvore filogenética gerada no programa MEGA (versão 10.1.1) (KUMAR et al., 2019.) foi possível a classificação dos genes das famílias 18 e 19 em suas respectivas classes.

Na família 18 foram classificados três genes da classe III agrupados no mesmo ramo com quitinases de mesma classe obtida da planta *Acacia koa*; e nove genes de classe V agrupados no mesmo ramo com quitinase do de *Lotus japonicus* (Figura 7).

Já na família 19 pela árvore foi classificado dois genes da classe I agrupado com a quitinase de *Sesamum indicum*. Um gene da classe II foi agrupado com a quitinase de

Theobroma cacao e doze genes da classe IV agrupados com as quitinases de *Actinidia chinensis* e *Capsicum annuum*, (Figura 8).

Figura 7 - Árvore filogenética das proteínas de quitinase encontrados no genoma de *H. impetiginosus* da família 18 classes III e V. A árvore foi construída no programa MEGA-X (versão 10.1.1) baseada no modelo Neighbor-Joining, usando um alinhamento das sequências de proteínas descritos na Tabela 1.

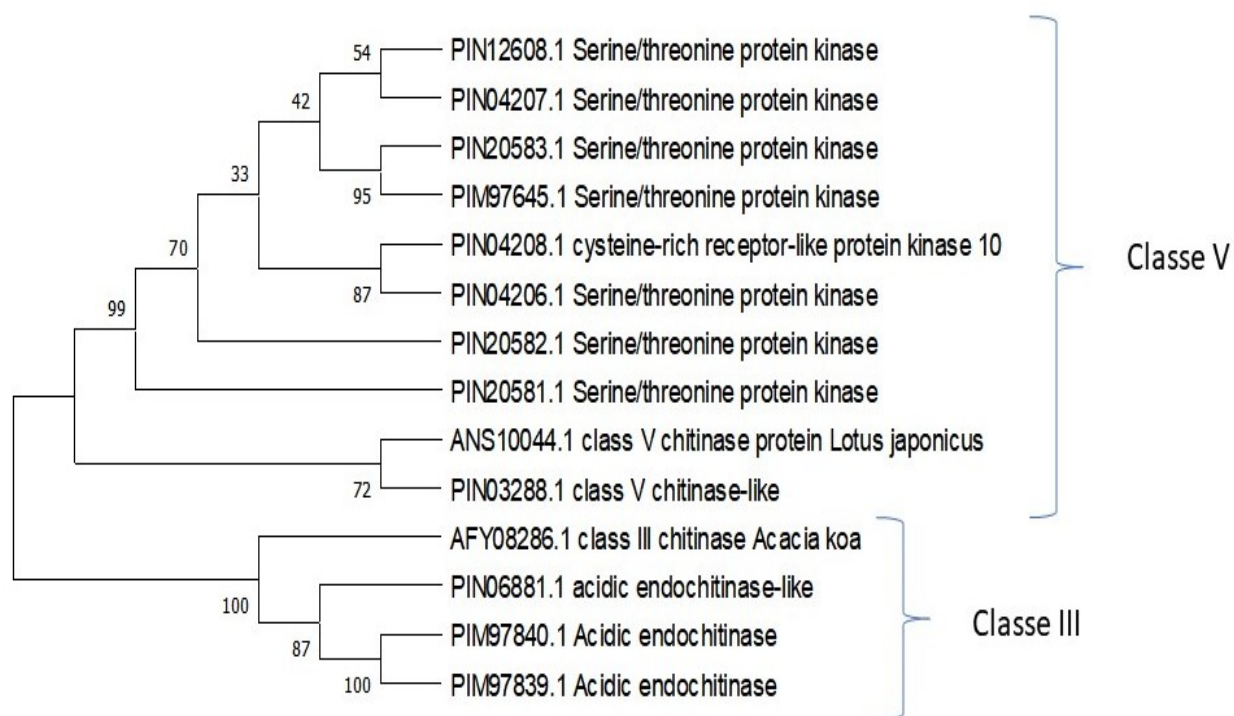
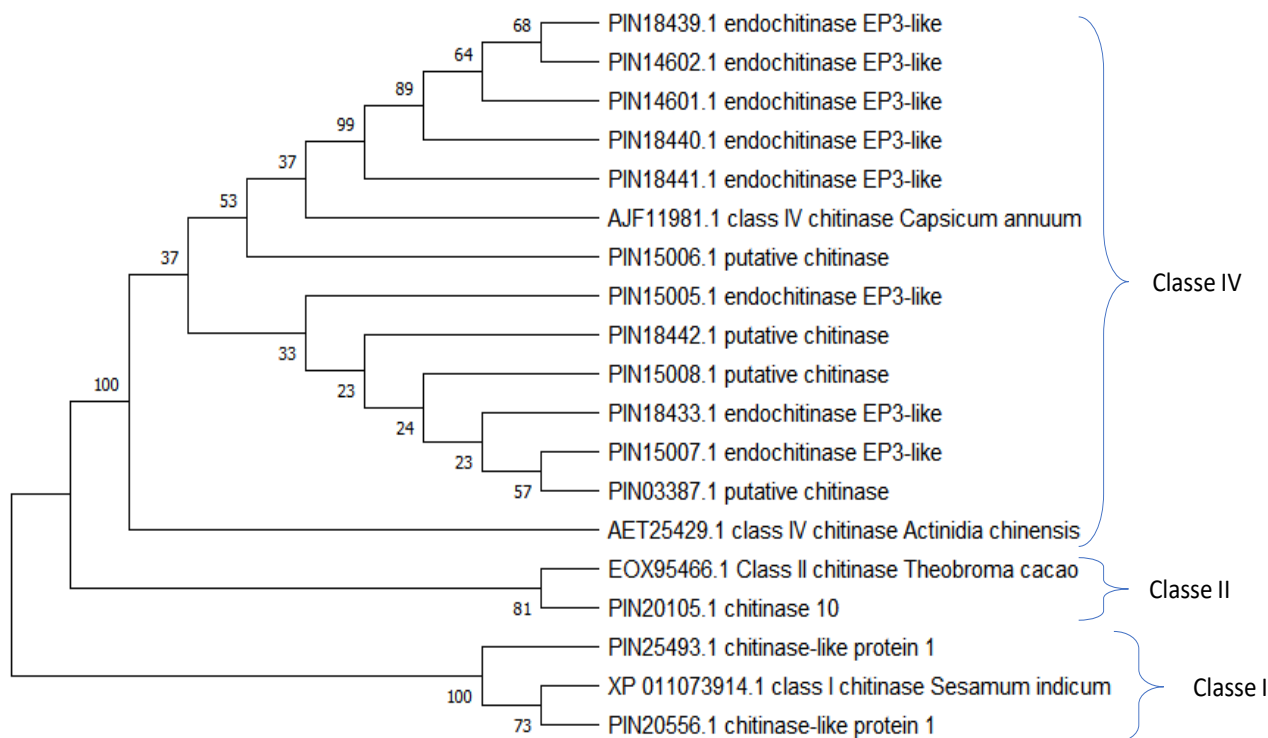


Figura 8 - Árvore filogenética das proteínas de quitinase encontrados no genoma de *H. impetiginosus* da família 19, classes I, II e IV. A árvore foi construída no programa MEGA-X (versão 10.1.1) baseada no modelo Neighbor-Joining, usando um alinhamento das sequências de proteínas descritos na Tabela 1



Tobias et al (2017) identificaram 67 genes que codificam quitinases em *Eucalyptus grandis*. Dos quais foram identificados 1 gene de classe I, 16 de classe II, 10 de classe III, 14 de classe IV e 26 de classe V. Mir e colaboradores (2019) identificaram 47 genes que codificam quitinases em *B. juncea* dos quais foram identificados sendo 10 genes de classe I, 6 genes de classe II, 2 genes de classe III, 25 genes de classe IV e 4 genes de classe V. E 79 genes que codificam quitinases em *C. sativa*, sendo 4 genes de classe I, 21 genes de classe II, 3 genes de classe III, 26 genes de classe IV e 20 genes de classe V. Nota-se que os genes da classe I, normalmente, são menos numerosos, assim como foi observado em *H. impetiginosus*.

5.3 Análise de predição de localização subcelular de genes quitinase expressos em *Handroanthus impetiginosus*

Com o programa WoLF PSORT foi possível identificar que em ambas as famílias a maior parte dos genes possuíam peptídeo sinal, para localização extracelular. Os genes de *H. impetiginosus* da família 18 apresentaram similaridades com peptídeo sinal, para diversas espécies de plantas, sendo elas algumas delas *Cucumis sativus*, *Arabidopsis thaliana*, *Capsicum annuum* e *Hordeum vulgare*. Porém, as sequências de proteínas *Cicer arietinum*, foram as que apresentaram maior similaridade com as sequências de proteínas de *H. impetiginosus*, na família 18 os genes possuíam peptídeo sinal em sua maioria, para localização extracelular ou cloroplasto (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise de peptídeo sinal das proteínas de quitinase em *H. impetiginosus*, família 18. As análises indicam a quantidade de sequências de peptídeos sinais encontrados, a localização celular, a porcentagem de identidade e o código de acesso das sequências de peptídeo de sinal.

Gene	Nº de sequências	Identidade	Localização celular	Código de acesso
PIN06881.1	14	59,33%	Extracelular	CHIA_CICAR
PIM97840.1	14	50,66%	Extracelular	CHIA_CUCSA
PIM97839.1	14	50,99%	Extracelular	CHIA_CUCSA
PIN03288.1	14	17,72%	Cloroplasto	CB22_HORVU
PIN12608.1	14	15,64%	Cloroplasto	At1g16400.1
PIN20583.1	14	16,25%	Cloroplasto	METB_ARATH
PIM97645.1	14	16,43%	Cloroplasto.	CYSL_CAPAN
PIN04207.1	14	16,10%	Extracelular	CKX4_ARATH
PIN20582.1	14	14,45%	Vacúolo	VCLC_PEA
PIN20581.1	14	17,00%	Membrana Plasmática	At1g21230.1
PIN04208.1	14	14,91%	Vacúolo	At2g05170.1
PIN04206.1	14	21,10%	Membrana Plasmática	At1g21230.1

O peptídeo sinal de genes de quitinase da família 19 encontrados em *H. impetiginosus* também apresentaram similaridade com peptídeo sinal de outras plantas como, *Holcus lanatus*, *Impatiens balsamina* e *Raphanus sativus*, contudo, as sequências de proteínas *Brassica napus* foi a que apresentou maior similaridade com as sequências de quitinases de *H. impetiginosus* (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise de peptídeo sinal das proteínas de quitinase em *H. impetiginosus*, família 19. As análises indicam a quantidade de sequências de peptídeos sinais encontrados, a localização celular, a porcentagem de identidade e o código de acesso das sequências de peptídeo de sinal.

Gene	Nº de sequências	Identidade	Localização celular	Código de acesso
PIN25493.1	14	22,15%	Extracelular	CHI4_BRANA
PIN20556.1	14	16,36%	Extracelular	MPH1_HOLLA
PIN20105.1	14	29,39%	Extracelular	MPH1_HOLLA
PIN15007.1	14	56,00%	Extracelular	CHI4_BRANA
PIN18442.1	14	13,73%	Extracelular	PGL2_ARATH
PIN18433.1	14	15,94%	Extracelular	MPH1_HOLLA
PIN14601.1	14	56,78%	Extracelular	CHI4_BRANA
PIN15006.1	14	51,03%	Extracelular	CHIP_BETVU
PIN15005.1	14	54,18%	Extracelular	CHI4_BRANA
PIN18439.1	14	15,62%	Extracelular	AMP_IMPBA
PIN18440.1	14	56,18%	Extracelular	CHI4_BRANA
PIN14602.1	14	16,77%	Extracelular	AMP_IMPBA
PIN18441.1	14	14,41%	Complexo de golgi	At4g38240.1
PIN03387.1	14	17,52%	Extracelular	AFP4_RAPSA
PIN15008.1	14	24,63%	Extracelular	CHI4_BRANA

Embora a maioria, contando as duas famílias, tenha similaridade com o peptídeo de sinal para direcionamento extracelular. A família 18 apresentou 33,33% para localização extracelular, 33,33% para localização no cloroplasto, 16,66% para localização no vacúolo e 16,66% para localização na membrana plasmática (Tabela 5). Já na família 19, 93,33% das sequências apresentaram peptídeo de sinal similar para localização extracelular e 6,67% apresentou peptídeo de sinal similar para localização no complexo de golgi (Tabela 6).

Essa predominância de peptídeo de sinal para direcionamento extracelular foi observada também em outras plantas como em *Eucalyptus grandis*, onde foram encontrados locais de clivagem previstos para o N-terminal, indicando secreção de proteínas maduras, sendo 26 de 36 dos peptídeos da família 18 e 27 dos 31 peptídeos da família 19. Sendo assim 53 proteínas maduras de quitinases são secretadas (TOBIAS et al.,2017).

Essa predominância do peptídeo de sinal para direcionamento extracelular dos resultados está diretamente relacionada ao mecanismo de defesa da planta contra patógenos. Viana (2015) demonstrou a eficácia das quitinases obtidas de *Calotropis poncera* contra insetos e fungos, o que também foi observado por Ramos et al. (2007), o qual observou que o látex de *Calotropis poncera* possuía um efeito deletério em insetos como *Ceratis capitata*, onde esse efeito foi atribuído a presença de quitinases.

5.4 Predição da estrutura 3D

A predição das estruturas 3D das quitinases de *H. impetiginosus* foi realizada por homologia no programa on-line SWISS-MODEL (BIOZENTRUM, 2019). Sendo essas estruturas 3D propriedades conformacionais e relacionadas as funções dessas enzimas. Na família 18, foi possível identificar que os primeiros três genes pertencentes a classe III tiveram identidade de 71,75%, 70,15%, 69,60%, com o código do PDB 1llo.1 heveína A (endoquitinase de planta/ lisoenzima) complexada com allosamidin (Figura 9). Já na classe V, obteve-se 39,40%, 41,49%, 39,94%, 39,88% e 40,90% de identidade com o código do PDB 3alg.1.A (Estrutura cristalina da quitinase classe V mutante E115Q de *Nicotiana tabaccum* em complexo com NAG4), 66,86%, 40,37% e 40,07% de identidade com o código do PDB 3alf.1.A (Estrutura cristalina da quitinase classe V de *N. tabaccum*) e 38,01% de identidade com o código do PDB 3ulz.1.A (Estrutura cristalina da apo BAK1 da quitinase de *N. tabaccum*) (Figura 10).

Na família 19, a quitinase da classe I mostrou 38,43% e 38,58% de identidade com o código do PDB 2dkv.1.A (Estrutura cristalina da quitinase classe I de *Oryza sativa* L. japônica) (Figura 11). A quitinase com similaridade a classe II obteve a identidade de 59,34% também com o código do PDB 2dkv.1 (Figura 12). E a classe IV onde foram observados 45,83%, 45,42%, 43,57%, 47,08%, 48,51%, 45,64%, 46,47%, 45,64%, 39,81% e 37,04% de identidade com o código do PDB 2dkv.1.A, e dois dos genes mostraram 64,36% e 62,87% de identidade com o código do PDB 5h7t.1.A (Domínio de quitinase família 19 do alérgeno de pólen de *Cryptomeria japonica*) (Figura 13).

Tabela 7 - Similaridade das quitinasas do ipê-rosa com o seu modelo no banco PDB.

Família	Gene	Classe	Identidade	Código do PDB	Espécie do modelo
18	PIN06881.1	III	71,75%	1llo.1.A	<i>Hevea brasiliensis</i>
	PIM97840.1	III	70,15%	1llo.1.A	<i>Hevea brasiliensis</i>
	PIM97839.1	III	69,60%	1llo.1.A	<i>Hevea brasiliensis</i>
	PIN03288.1	V	66,86%	3alf.1.A	<i>Nicotiana tobaccum</i>
	PIN12608.1	V	39,40%	3alg.1.A	<i>Nicotiana tobaccum</i>
	PIN20583.1	V	41,49%	3alg.1.A	<i>Nicotiana tobaccum</i>
	PIM97645.1	V	39,94%	3alg.1.A	<i>Nicotiana tobaccum</i>
	PIN04207.1	V	39,88%	3alg.1.A	<i>Nicotiana tobaccum</i>
	PIN20582.1	V	40,90%	3alg.1.A	<i>Nicotiana tobaccum</i>
	PIN20581.1	V	40,37%	3alf.1.A	<i>Nicotiana tobaccum</i>
	PIN04208.1	V	38,01%	3ulz.1.A	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	PIN04206.1	V	40,07%	3alf.1.A	<i>Nicotiana tobaccum</i>
19	PIN25493.1	I	38,43%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>
	PIN20556.1	I	38,58%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>
	PIN20105.1	II	59,34%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>
	PIN15007.1	IV	45,83%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>
	PIN18442.1	IV	45,42%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>
	PIN18433.1	IV	43,57%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>
	PIN14601.1	IV	47,08%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>
	PIN15006.1	IV	48,51%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>
	PIN15005.1	IV	64,36%	5h7t.1.A	<i>Cryptomeria japonica</i>
	PIN18439.1	IV	45,64%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>
	PIN18440.1	IV	46,47%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>
	PIN14602.1	IV	45,64%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>
	PIN18441.1	IV	62,87%	5h7t.1.A	<i>Cryptomeria japonica</i>
	PIN03387.1	IV	39,81%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>
	PIN15008.1	IV	37,04%	2dkv.1.A	<i>Oryza sativa</i>

A predição da estrutura 3D de *Triticum aestivum* apresentou uma homologia maior que as encontradas em *H. impetiginosus*, as de classe I apresentaram 73% de identidade com código PDB 2DKV (estrutura cristalina da quitinase classe I de *O.*

sativa), já as de classe II apresentaram 94% de identidade com código PDB 4DWX (cristal de glutathione estrutura de uma família 19 quitinase de sementes de centeio) e as de classe IV apresentaram 60% de identidade com código PDB 4MCK (estrutura cristalina da família 19, classe Quitinase IV de *Zea mays*) (MISHRA et al., 2015). Já Rafiq (2018) realizou a predição da estrutura 3D para *Gladiolus grandiflorus*, porém obteve valores de homologia menores que as encontradas em *H. impetiginosus*, sendo 49% de identidade com o código PDB 3SIM (Análise da estrutura cristalográfica da família 18 quitinase de *Crocus vernus*), 16% de identidade com o código PDB 2HVM (Hevamina-a a resolução de 1,8 angstrom de *Hevea brasiliensis*), 16% de identidade com o código PDB 1CNV (Estrutura de cristal da concanavalina b em 1,65 a resolução de *Canavalia ensiformes*) e 33% de identidade com o código PDB 1NAR (Estrutura cristal de narbonne refinada na resolução de 1.8 angstroms de *Vicia narbonensis*).

Figura 9 - Estruturas 3D da família 18 classe III: A (PIN06881.1), B (PIM97840.1), C (PIM97839.1).

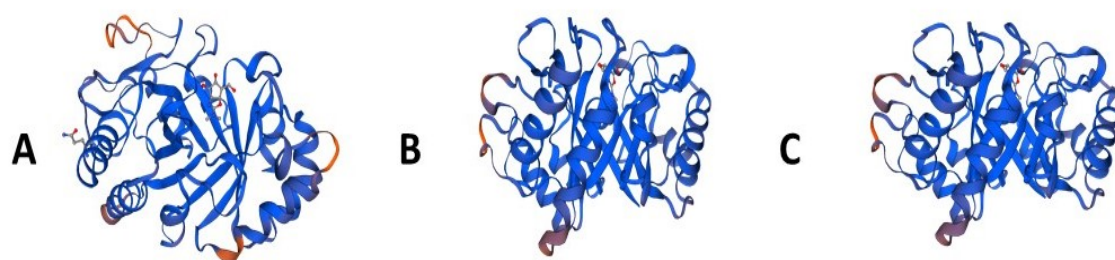


Figura 10 - Estruturas 3D de quitinases da família 18 classe V: A (PIN03288.1) B (PIN12608.1) C (PIN20583.1), D (PIM97645.1), E (PIN04207.1), F (PIN20582.1), G (PIN20581.1), H (PIN04206.1.), I (PIN04208.1).

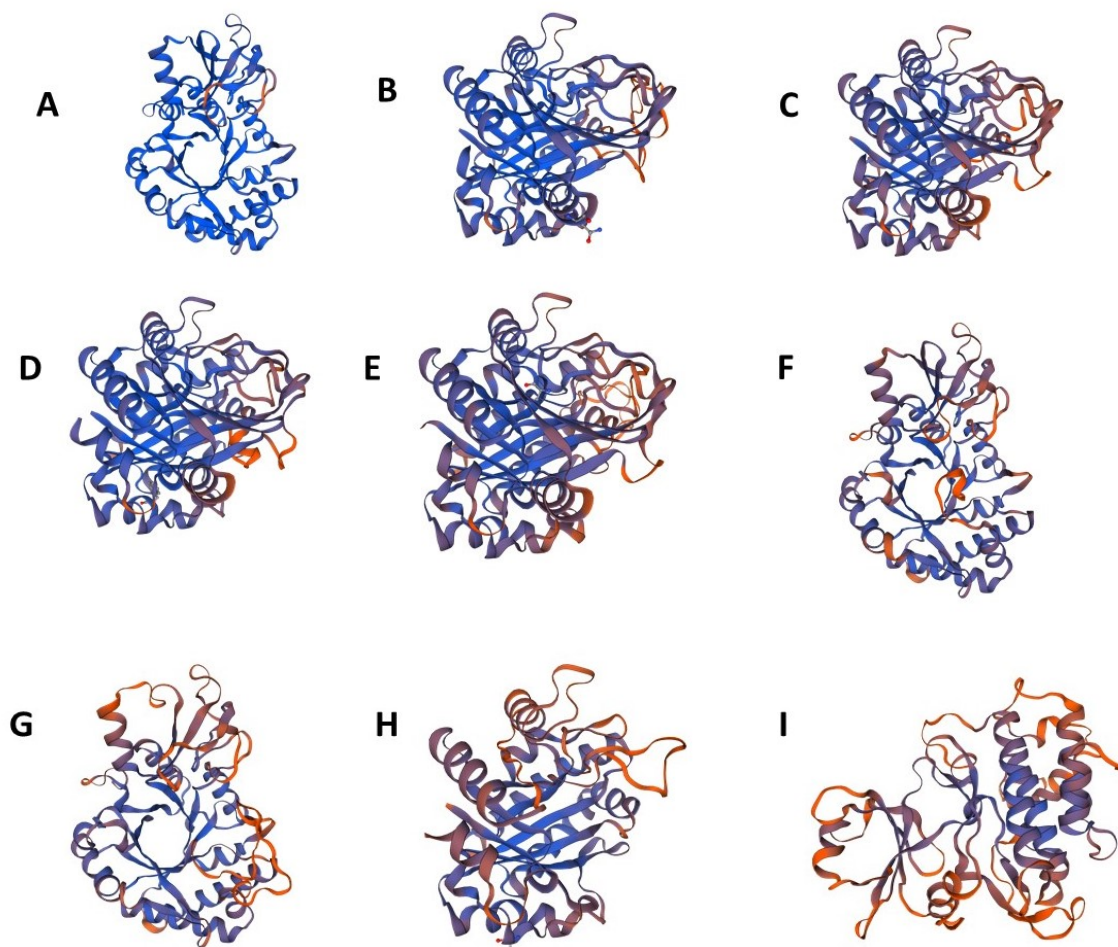


Figura 11 - Estruturas 3D de quitinases da família 19 classe I: A (PIN25493.1), B (PIN20556.1).

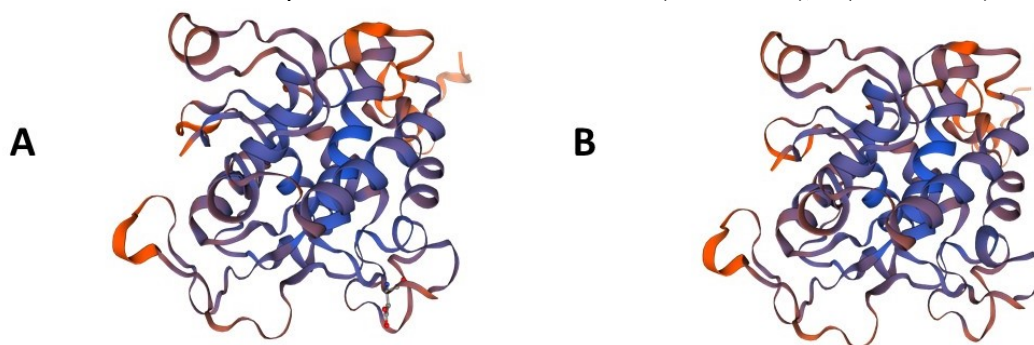


Figura 12 - Estruturas 3D de quitinases da família 19 classe II

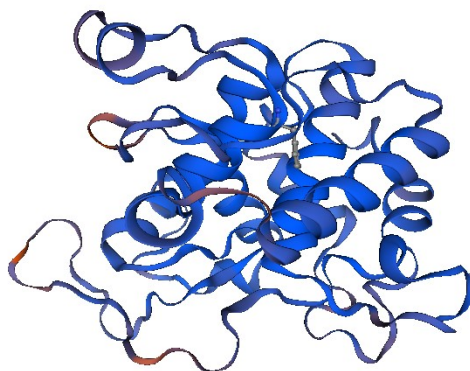
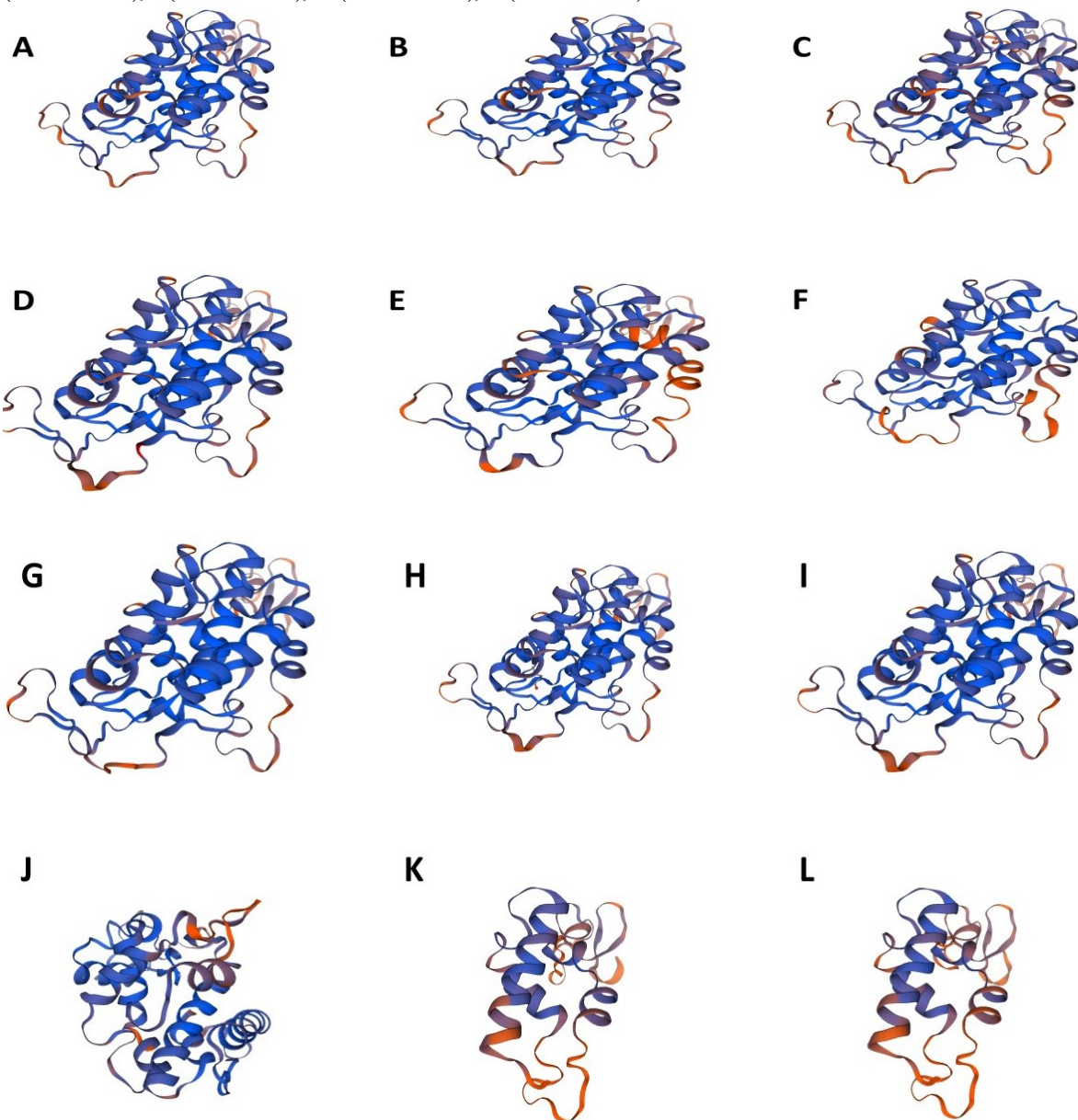


Figura 13 - Estruturas 3D de quitinases da família 19 classe IV: A (PIN15007.1), B (PIN18442.1), C (PIN18433.1), D (PIN14601.1), E (PIN15006.1), F (PIN15005.1), G (PIN18439.1), H (PIN18440.1), I (PIN14602.1), J (PIN18441.1), K (PIN03387.1), L (PIN15008.1)



6 CONCLUSÃO

Nesse estudo os genes de quitinases no genoma do ipê-rosa foram identificados e classificados, e todos apresentaram o domínio catalítico de quitinases. As buscas resultaram em 12 genes da família 18 e 15 genes da família 19. Dos genes encontrados 66,67% apresentaram provável direcionamento extracelular o que é importante para fins comerciais, pois apresentam fácil isolamento da proteína e características de defesa contra patógenos e insetos. A predição da estrutura 3D da quitinase serve para visualizarmos os possíveis sítios de ligações das quitinases, local onde liga a quitina para sua posterior degradação, nos dando noção da possível estrutura e função de cada uma dessas quitinases.

Por apresentar genes codificantes de quitinases o ipê-rosa nos fornece a possibilidade de utilização de seus genes para o melhoramento genético de outras plantas. Algo que ajuda a desenvolver novas plantas resistentes a patógenos e a insetos, bem como pode servir para outros fins industriais e até mesmo para a área da saúde.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, A. **BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS QUITINOLÍTICAS E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA QUITINASE**. Dissertação (Mestrado Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Goiânia Disponível em: <<https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/8471>> Acesso em 10 abril 2019.
- AUGUSTO, M. **Influência da atividade enzimática e ação inseticida sobre a diatréia saccharalis (fabricius, 1794) (lepidoptera: crambidae)**. 2018. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/154265>> Acesso em 10 abril 2019.
- BIOZENTRUM. SWISS MODEL - **Protein Structure Bioinformatics Group**. Disponível em: < <https://swissmodel.expasy.org><http://www.genscript.com/wolfsort.html> Acesso em: 01 out. 2019.
- BORÉM, A e SANTOS, FR. Biotecnologia Simplificada. **Editora Suprema**. Viçosa, MG. Janeiro de 2003.
- BORGOGNONI, C. F.; POLAKIEWICZ, B.; PITOMBO, R. N. M. Estabilidade de emulsões de d-limoneno em quitosana modificada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p.502-508, set. 2006.
- CAMPANA-FILHO, S. P. et al. EXTRAÇÃO, ESTRUTURAS E PROPRIEDADES DE α - E β -QUITINA. **Química Nova**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.644-650, 2007
- CAO, J.; TAN, X. **Comprehensive Analysis of the Chitinase Family Genes in Tomato (*Solanum lycopersicum*)** Disponível em: < <https://www.mdpi.com/2223-7747/8/3/52>>. Acesso em 10 out. 2019
- CARBOHYDRATE ACTIVE ENZYMES DATABASE. **Glycoside Hydrolase Family Classification**. Disponível em: <<http://www.cazy.org/>>. Acesso em: 28 jul. 2019.
- FLORA. **Handroanthus impetiginosus in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2** Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Handroanthus impetiginosus](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Handroanthus%20impetiginosus)>. Acesso em 10 abril 2019.

CONESA, A. et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-6, 2005.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 71, n. 6, p.773-782, 21 jul. 2006.

DE OLIVEIRA, F. S. S. et al. Classification of breast regions as mass and non-mass based on digital mammograms using taxonomic indexes and svm. **Computers in biology and medicine**, 57:42–53, 2015.

GAMA, Maiara do Valle Faria. **Caracterização funcional de quitinases de *Rhodnius prolixus***. 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

GENSCRIPT. **Advanced Protein Subcellular Localization Prediction Tool**. Disponível em: <<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>>. Acesso em: 01 out. 2019.

GODONE, R. **Isolamento de uma quitinase extraída do cefalotórax do camarão marinho *Litopenaeus schmitti* (BURKENROAD, 1936): avaliação de suas atividades antimicrobiana e larvicida**. 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2011. Disponível em: < <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/12585> > Acesso em 10 abril 2019.

GOHEL, V. et al. **Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms**. **African Journal Of Biotechnology**, v. 5, n. 2, p.54-72, 2006.

GUIMARÃES, J. **Clonagem e expressão do gene da quitinase de *Anopheles gambiae* em *Pichia pastoris***. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019. Disponível em: < <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/7286>>. Acesso em: 20 set 2019.

HASHIMOTO, G. **Illustrated Encyclopedia of Brazilian Medicinal Plants**. AbocSha, Kamakura, 158 p. 1996.

HUMPHREY W., DALKE A., SCHULTEN K. VMD: Visual Molecular Dynamics. **J Mol Graph** ;14:33–8, 1996.

KERN, M., F. **Expressão de uma quitinase de *Metarhizium* em *Nicotina tabacum***: Obtenção de plantas transgênicas resistentes a doenças fúngicas. 2003. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/3167/000383078.pdf?sequence=>>>. Acesso em: 22 mar. 2019

KESARI, P. et al. Structural and functional evolution of chitinase-like proteins from plants. **Proteomics**, v. 15, n. 10, p. 1693–1705, 2015.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Mol Biol Evol**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2019.

MIR, Z.A. et al. Genome-wide identification and characterization of Chitinase gene family in *Brassica juncea* and *Camelina sativa* in response to *Alternaria brassicae*. **Genomics** 2019.

MISHRA, A. K. et al. Structural and functional analysis of chitinase gene family in wheat (*Triticum aestivum*). **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 52, n. 2, p. 169–178, 2015.

NCBI. **Taxonomy Browser**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/browser/wwwtax.cgi?id=429701>>. Acesso em: 22 mar. 2019

NEIS, A., KREMER, FS, PINTO, LS et al. **Previsão in silico de moléculas de prolactina como ferramenta para reprodução de genômica equina**. Mol Divers (2019). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11030-018-09914-3>> Acesso em 10 abril 2019

NEIVA, M. **Expressão em *Escherichia coli* de Quitinase (E.C. 3.2.1.14) de *Chromobacterium violaceum***. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração em Genética) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2005. Disponível em: <<https://bdtd.inpa.gov.br/handle/tede/679>> Acesso em: 10 abril 2019

PAN, X. Q.; SHIH, C.C.; HARDAY, J. Chitinase Induce Lysis of MCF-7 Cells in Culture and of Human Breast Cancer Xenograft B11-2 in SCID Mice. **Anticancer research**. 25: 3167-3172, 2005.

PUBMED. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>>. Acesso em: 29 jul. 2019.

PASSARINHO, P. A.; VRIES, S. C de. *Arabidopsis* Chitinases: a genomic survey. **The Arabidopsis Book**, v. 1, p. e0023, 2002.

RAFIQ, M. et al. Computational modeling and functional characterization of a GgChi: A class III chitinase from corms of *Gladiolus grandiflorus*. **Kaohsiung J Med Sci**. 34(12):673-683, 2018.

RAMOS, M. V. et al. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: role of laticifer proteins in plant defence. **Plant Science**. 173:349-357, 2007.

SANTOS, D; CARDOSO, S. Extrato de ipê roxo como inibidor de corrosão para aços em meio ácido. **Pesquisa, sociedade e desenvolvimento**, v. 8, n. 2, dez. 2018. Disponível em:<<https://rsd.unifei.edu.br/index.php/rsd/article/view/777>>. Acesso em: 11 abr. 2019

S. El-Gebali et al. *The Pfam protein families database in 2019* **Nucleic Acids Research** (2019). Disponível em < <https://pfam.xfam.org/> > Acesso em: 25 set. 2019.

SILVA-JUNIOR, O. B. et al. Genome assembly of the Pink Ipê (*Handroanthus impetiginosus*, Bignoniaceae), a highly valued, ecologically keystone Neotropical timber forest tree. **GigaScience**, 7(1), 1–16, 2018

TOBIAS, P. A. et al. Identification of the *Eucalyptus grandis* chitinase gene family and expression characterization under different biotic stress challenges. **Tree Physiology**, v. 37, n. 5, p. 565–582, 2017.

VERLI, H. Bioinformática: Da Biologia à Flexibilidade Molecular. 1 ed. São Paulo: **SBBq**, 2014.

VIANA, C. A. **Caracterização bioquímica e atividades biológicas de quitinases laticíferas de *Calotropis procera* 2015**. Dissertação (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015, Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/19406>> Acesso em 20 out 2019

YANG, H. et al. Chitinase III in pomegranate seeds (*Punica granatum* Linn.): a high-capacity calcium-binding protein in amyloplasts. **Plant J**. 68, 765–776, 2011.

YEH, S. et al. Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. **Plant Physiol** 124: 1251–1264, 2000.