

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



Autor: Johana Rincones Pérez

**Vassoura-de-Bruxa: Organização Genômica, Variabilidade de Isolados e Análise da Identidade e Expressão de Genes Ligados à Patogenicidade do Fungo *Crinipellis pernicioso***

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira  
Co-Orientador: Dr. Lyndel Wayne Meinhardt

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Johana Rincones Pérez e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Campinas - São Paulo  
2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**Rincones Pérez, Johana**

**R471v** Vassoura-de-bruxa: organização genômica, variabilidade de isolados e análise da identidade e expressão de genes ligados à patogenicidade do fungo *Crinipellis pernicioso* / Johana Rincones Pérez. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

**Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães  
Pereira.**

**Co-orientador: Lyndel Wayne Meinhardt.**

**Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.**

**Título em inglês:** Witches' broom disease of cocoa: genome organization, genetic variability and analysis of the identity and expression of pathogenicity genes of the fungal pathogen *Crinipellis pernicioso*.

**Palavras-chave em inglês:** Witches' broom disease; Cocoa; Karyotypes; Phytopathogenic fungi; Gene expression.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Doutora em Biologia Funcional e Molecular.

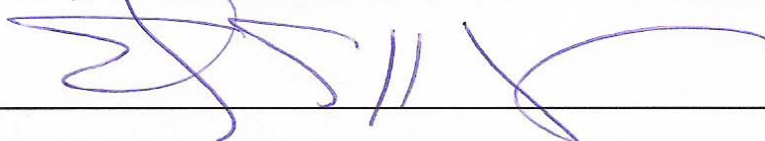
**Banca examinadora:** Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Maria Sueli Soares Felipe, Nilce Maria Martinez Rossi, Marcelo Menossi Teixeira, Michel Georges Albert Vincentz.

**Data da defesa:** 03/04/2006.

Data da Defesa: 03/04/2006

Banca Examinadora:

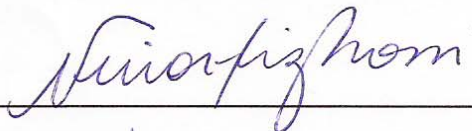
Prof. Dr. GONÇALO AMARANTE GUIMARÃES PEREIRA (Orientador)



Profa. Dra. MARIA SUELI SOARES FELIPE



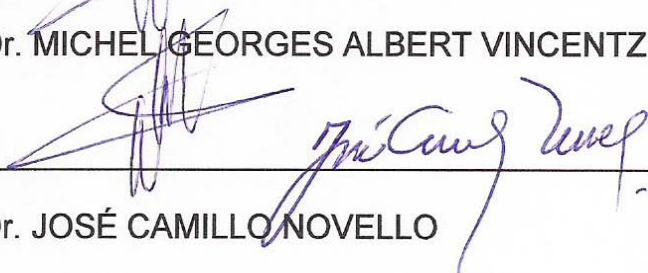
Profa. Dra. NILCE MARIA MARTÍNEZ ROSSI



Prof. Dr. MARCELO MENOSSI TEIXEIRA



Prof. Dr. MICHEL GEORGES ALBERT VINCENTZ



Prof. Dr. JOSÉ CAMILLO NOVELLO

Prof. Dr. CLÁUDIO LUIZ MESSIAS

Profa. Dra. MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

Dedico este trabalho ao Alberto e a meus pais, Juan e  
Dinorah, pelo amor incondicional, apoio e incentivo.

*Ustedes son mi inspiración.*

## AGRADECIMENTOS

*Muchas gracias...*

Ao Prof. Dr. Gonçalo Pereira por ter me dado a grande oportunidade e confiança para realizar este trabalho; sua orientação e motivação em todos os momentos foram extremamente valiosas. Além disso, este trabalho só foi possível graças aos recursos humanos e em infraestrutura que ele providencia no LGE. Seu ânimo, profissionalismo e grande coração fazem do Gonçalo uma pessoa digna de admiração.

Ao Dr. Lyndel Meinhardt. Sua ampla experiência em biologia molecular e fitopatologia foi essencial não só em todas as etapas do trabalho, mas também para minha formação profissional. Muito obrigada pela orientação, paciência, motivação e amizade.

Ao Prof. Dr. Benedicto Vidal e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Mello pela colaboração na realização de parte deste trabalho e também pelo grande apoio e amizade.

À Eliane Laranja Dias. Sua dedicação, capacidade de organização e grande coração são o motor do LGE e uma fonte de inspiração. Obrigada pela grande ajuda e amizade.

A meus estagiários: Gabriel Dias Mazotti, Daniela Tomazella, Bruvo Vaz de Oliveira, Maria Carolina Grassi e Tiago Luz Farani pela inestimável ajuda na realização deste projeto.

À Carolina Cotomacci, à Raquel Bertolim, à Marina Rovani, ao Vítor Hugo Silva, ao Prof. Dr. Júlio Cascardo e ao Robson Dias pelo apoio técnico na área de seqüenciamento.

Ao pessoal do Laboratório de Bioinformática do LGE: Marcelo Carazolle, Marcos Renato Araújo, Eduardo Formighieri, Ricardo Tibúrcio, Buda, Luciano Digiampietri, Gustavo Costa, Danilo Cursi, Diego e Lucas. Sua ajuda e apoio técnico foram essenciais na realização deste trabalho.

Ao pessoal do LGE: Odalys, Carla, Leandra, Ana Paula, Zapa, Silvia, Maricene, Ana D., Anderson, Carol, Gabriel, Bruno, Dani, Maria Carolina G., Maria Carolina S. Naiara, Anders, Rodrigo, Cinthia, Lilica, Acássia, Sula, Diana, Camila, Victor, Jorge L., Jorge M., Andrea, Eliézer e Welbe, pelas enriquecedoras discussões, apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo A. Azevedo e ao pessoal do Laboratório de Bioquímica e Genética de Plantas da ESALQ-USP por haverme permitido realizar parte deste trabalho no seu laboratório.

À FAPESP pelas bolsas de estudo concedidas (Processos Nos. 00/10545-4 e 02/09280-1)

Ao CNPq pela concessão de auxílio à pesquisa, Projeto Universal No. 471609/2003-0.

*"The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing."* Albert Einstein

## RESUMO

A Vassoura-de-Bruxa do cacauzeiro constitui um patossistema complexo e até o momento não foi estabelecido um plano de controle efetivo na região produtora da Bahia. O objetivo principal deste trabalho foi aprimorar os conhecimentos sobre a interação *C. pernicioso*-Cacauzeiro com informações referentes à: 1) tamanho e organização do genoma através da obtenção do cariótipo molecular do fungo; 2) variabilidade genética deste fitopatógeno a nível cromossômico na região produtora da Bahia; e 3) expressão gênica do fungo em presença de extratos do hospedeiro. O cariótipo molecular foi estabelecido por eletroforese em gel de campo pulsado. Esta mesma metodologia foi utilizada em combinação com análise tipo microsátélites para um estudo de variabilidade a nível cromossômico de 38 isolados provenientes de três biótipos e diferentes regiões geográficas. Para análise da expressão gênica foram seqüenciadas quatro bibliotecas de cDNA do fungo sob diferentes condições de cultivo e em diferentes estágios do desenvolvimento, incluindo uma biblioteca subtrativa obtida por SSH. Como resultados, apresentamos o cariótipo molecular de *C. pernicioso* e a existência de polimorfismos cromossômicos. A análise dos 38 isolados permitiu observar que o cariótipo do biótipo-C é estável ao longo do tempo e sua variabilidade na região da Bahia é baixa, mostrando assim a fragilidade do programa de melhoramento genético do cacauzeiro na Bahia, onde os clones resistentes selecionados no campo foram desafiados contra apenas dois genótipos do patógeno. Com relação à análise da expressão do fungo, obtivemos 1427 unigenes e sua análise por similaridade com as bases de dados permitiu a identificação de diversos mecanismos pelos quais o fungo poderia estar manipulando o metabolismo da planta para seu benefício e em detrimento da produção de cacau. Assim, consideramos que a partir deste trabalho foi possível obter uma maior compreensão dos mecanismos utilizados por *C. pernicioso* no desenvolvimento da Vassoura-de-Bruxa em cacauzeiro e estudos mais aprofundados, baseados nos resultados aqui obtidos, deverão auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle para esta importante doença.



## ABSTRACT

Witches' broom disease of cocoa is a complex pathosystem that has evaded an efficient control program in the cacao-producing region of Bahia, Brazil. The main goal of this work was to acquire a better understanding of the *C. pernicioso*-Cacao interaction by providing new data regarding: 1) the size and organization of the fungal genome through molecular karyotyping; 2) the genetic variability of this phytopathogen at the chromosomal level in the cacao-producing region of Bahia; and 3) the gene expression of the fungus in the presence of host extracts. The molecular karyotype was obtained through pulsed-field gel electrophoresis. This same technique was applied in combination with microsatellite PCR analysis of 38 isolates from different biotypes and geographic regions in order to study the chromosomal-level genetic variability of this pathogen. For the gene expression analysis, four cDNA libraries of the fungus grown under different culture conditions and developmental stages, including a subtractive library using SSH, were sequenced and searched for similarities in the public databases. As results, we present the molecular karyotype of *C. pernicioso* and the existence of chromosome-length polymorphism. The analysis of the 38 isolates showed that the karyotype of the C-biotype is very stable in time and that the variability of the pathogen in Bahia is very low, thus indicating the fragility of the current cacao-breeding program in Bahia, where the resistant cacao clones selected in the field were challenged against only two different genotypes of the pathogen. With regards to the gene expression analysis, we obtained 1427 unigenes and the similarity searches allowed the identification of various mechanisms through which the fungus might be manipulating the metabolism of the plant for its own benefit and in detriment of cocoa production. Therefore, we consider that this work allowed us to acquire a better understanding of the molecular mechanisms used by *C. pernicioso* during witches' broom development in cacao and more detailed studies, based on the results presented here, might aid in the development of novel control strategies for this important disease.

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	3
2.1. A Doença Vassoura-de-Bruxa do Cacaueiro.....	3
2.2. O Fungo <i>Crinipellis perniciosa</i> e seu Mecanismo de Ação.....	4
2.3. Tentativas de Controle.....	9
2.3.1. Controle Químico.....	9
2.3.2. Controle Biológico.....	10
2.3.3. Melhoramento Genético do Cacaueiro.....	10
2.4. O Projeto Genoma da Vassoura-de-Bruxa.....	11
3. CAPÍTULO 1: Análise do Cariótipo Molecular de <i>Crinipellis perniciosa</i> , o Agente Etiológico da Vassoura-de-Bruxa do Cacaueiro ( <i>Theobroma cacao</i> ).....	14
3.1. Introdução.....	15
3.2. Materiais e Métodos.....	17
3.2.1. Isolados do Fungo.....	17
3.2.2. Preparação de Cromossomos Intactos de <i>C. perniciosa</i> .....	17
3.2.3. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado.....	18
3.2.4. Transferência e Hibridação Tipo Southern.....	19
3.2.5. Determinação do Tamanho do Genoma por Reação de Feulgen e Análise de Imagens.....	19
3.2.6. Avaliação Genotípica dos Isolados por Microsatélites.....	21
3.3. Resultados.....	21
3.3.1. Cariótipo Molecular de <i>C. perniciosa</i> .....	21

3.3.2. Avaliação Genotípica por Microsatélites.....	25
3.4. Discussão.....	26
3.5. Agradecimentos.....	28
3.6. Literatura Citada.....	29
<b>4. CAPÍTULO 2: Variabilidade Genética e Polimorfismos Cromossômicos do Agente Etiológico da Vassoura-de-Bruxa, <i>Crinipellis perniciosa</i>, Isolado de Diversos Hospedeiros na América do Sul .....</b>	<b>33</b>
4.1. Introdução.....	34
4.2. Materiais e Métodos.....	36
4.2.1. Isolados do Fungo.....	36
4.2.2. Obtenção do Genótipo dos Isolados por amplificação de Microsatélites.....	40
4.2.3. Obtenção do Cariótipo Molecular.....	40
4.3. Resultados.....	41
4.3.1. Avaliação Genotípica dos Isolados por análise de Microsatélites.....	41
4.3.2. Avaliação do Cariótipo Molecular.....	43
4.3.3. Análise da Hibridação tipo Southern.....	45
4.4. Discussão.....	48
4.5. Agradecimentos.....	54
4.6. Literatura Citada.....	54
<b>5. CAPÍTULO 3: Identificação de Genes Expressos nos Micélios Biotrófico e Saprotrófico do Fungo Causador da Vassoura-de-Bruxa, <i>Crinipellis perniciosa</i>.....</b>	<b>59</b>
5.1. Introdução.....	61
5.2. Materiais e Métodos.....	64
5.2.1. Isolados do Fungo e Condições de Crescimento.....	64
5.2.2. Extração de RNA e Construção de Bibliotecas de cDNA.....	65

<b>5.2.3. Seqüenciamento e Análise das seqüências</b> .....	67
<b>5.2.4. Validação do Processo de Subtração</b> .....	70
<b>5.2.5. Validação por Northern Blot de Clones Seleccionados</b> .....	73
<b>5.3. Resultados e Discussão</b> .....	75
<b>5.3.1. Seqüenciamento e Análise das Seqüências</b> .....	75
<b>5.3.2. Validação da Subtração Cacau menos Glicose</b> .....	100
<b>5.3.2.1. Validação por PCR semiquantitativo</b> .....	100
<b>5.3.2.2. Validação por Northern Reverso</b> .....	101
<b>5.3.3. Validação por Northern Blot de Clones Seleccionados</b> .....	105
<b>5.4. Agradecimentos</b> .....	107
<b>5.5. Literatura Citada</b> .....	107
<b>6. Conclusões e Sugestões para Próximos Trabalhos</b> .....	118
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	122
<b>8. Anexos</b> .....	127
<b>8.1 Anexo A. Resultados do Ensaio Tipo Northern Reverso Para Validação do Processo de Subtração Cacau menos Glicose</b> .....	127
<b>8.2 Anexo B. Unigenes que Apresentaram Similaridade com Proteínas nas Bases de Dados Públicas</b> .....	133
<b>8.3. Anexo C. Manuscrito Aceito Para Publicação na Revista <i>Current Microbiology</i> de Co-autoria da Aluna</b> .....	145

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 2.1.</b> Sintomas da vassoura-de-bruxa em frutos de <i>Theobroma cacao</i> .....	5
<b>Fig. 2.2.</b> Ciclo de Vida de <i>Crinipellis perniciosa</i> em <i>Theobroma cacao</i> .....	7
<b>Fig. 3.1.</b> Cariótipo Molecular de <i>C. perniciosa</i> .....	22
<b>Fig. 3.2.</b> Análise densitométrica da coloração com brometo de etídio do padrão de bandas cromossômicas de <i>C. perniciosa</i> .....	23
<b>Fig. 3.3.</b> Hibridação da região ITS do rDNA ao cariótipo molecular de <i>C. perniciosa</i> .....	25
<b>Fig. 3.4.</b> Análise tipo microsatélites de isolados de <i>C. perniciosa</i> utilizando primers baseados em seqüências teloméricas.....	25
<b>Fig. 4.1.</b> Mapas detalhando os locais de coleta dos isolados de <i>Crinipellis perniciosa</i> .....	39
<b>Fig. 4.2.</b> Análise tipo microsatélites utilizando o primer TeloC1.....	41
<b>Fig. 4.3.</b> Análise tipo microsatélites utilizando o primer TeloA1R. ....	42
<b>Fig. 4.4.</b> Polimorfismos cromossômicos observados entre isolados do Biótipo-C de <i>Crinipellis perniciosa</i> coletados no Brasil.....	44
<b>Fig. 4.5.</b> Análise dos polimorfismos cromossômicos entre isolados dos Biótipos-S e L de <i>Crinipellis perniciosa</i> coletados na América do Sul.....	46
<b>Fig. 5.1.</b> Distribuição dos clusters entre as bibliotecas de ESTs.....	79
<b>Fig. 5.2.</b> Distribuição dos clusters por similaridade com as três bases de dados utilizadas para busca de homólogos.....	83
<b>Fig. 5.3.</b> Distribuição dos clusters em categorias funcionais do Gene Ontology para cada biblioteca (SAP-CAC, SAP-GLI, SAP-SUB e BIO).....	85
<b>Fig. 5.4.</b> Validação da eficiência da hibridação subtrativa Cacau-Glicose por PCR semiquantitativo.....	100

<b>Fig. 5.5.</b> Resultados da validação tipo Northern Reverso a partir da hibridação tipo dot blot.....	103
<b>Fig. 5.6.</b> Resultados da validação tipo northern blot de clones selecionados.....	106
<b>Fig. 8.1.</b> Rearranjo dos clones selecionados em placa de 96 poços para a validação por northern reverso.....	130

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> Isolados do Biótipo C de <i>C. pernicioso</i> examinados por eletroforese em gel de campo pulsado.....	17
<b>Tabela 3.2.</b> Tamanho e número dos cromossomos de quatro isolados de <i>C. pernicioso</i> .....	24
<b>Tabela 3.3.</b> Estatística básica do conteúdo de DNA de núcleos em G1 do Isolado 1 de <i>Crinipellis pernicioso</i> estimado por reação de Feulgen e análise de imagens (n= 81).....	24
<b>Tabela 4.1.</b> Isolados de <i>C. pernicioso</i> utilizados no presente estudo.....	37
<b>Tabela 4.2.</b> Tamanho e número dos cromossomos de 38 isolados examinados de <i>Crinipellis pernicioso</i> . .....	47
<b>Tabela 5.1.</b> Distribuição dos reads por clusters.....	76
<b>Tabela 5.2.</b> Clusters com similaridade a genes de patogenicidade de outros patógenos.....	92
<b>Tabela 8.1.</b> Clones selecionados para validação por northern reverso.....	127
<b>Tabela 8.2.</b> Resultados da validação por northern reverso da subtração Cacau menos Glicose.....	130
<b>Tabela 8.3.</b> Unigenes com similaridade nas bases de dados públicas.....	133

## ABREVIATURAS

**cDNA:** DNA complementar

**DNA:** Ácido Dessoxiribonucléico

**EROs:** Espécies Reativas de Oxigênio

**ESTs:** *Expressed Sequence Tags*

**GABA:** Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**mRNA:** RNA mensageiro

**rDNA:** DNA ribossômico

**RH: Resposta Hipersensitiva**

**RNA:** Ácido Ribonucléico

**SSH:** *Suppressive Subtractive Hybridization*

**VB:** Vassoura-de-Bruxa



## 1. INTRODUÇÃO

A doença Vassoura-de-Bruxa (VB) em *Theobroma cacao* L. (cacaueiro), causada pelo fungo basidiomiceto *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, é uma das doenças de maior impacto econômico nos países produtores de cacau da América do Sul e das ilhas do Caribe (PURDY e SCHMIDT, 1996). A VB constitui um patossistema complexo que até o momento tem evadido o estabelecimento de um plano economicamente viável para seu controle na Bahia, principal região produtora de cacau no Brasil. Desde sua primeira aparição na Bahia em 1989 (PEREIRA *et al.*, 1989), esta doença tem causado queda de 60% na produção regional de cacau. Esta situação afeta não só à região produtora, onde milhões de pessoas dependem desta atividade, como também à indústria do chocolate a nível nacional, constituindo assim um dos principais problemas fitopatológicos do país.

Em 1999, a primeira prioridade de pesquisa para a Sociedade Americana de Fitopatologia (APS, do inglês *American Phytopathological Society*) era a utilização de “genômica aplicada nas pesquisas sobre plantas e microorganismos com o intuito de obter o conhecimento básico e a tecnologia necessária para aumentar a produtividade das plantas através de mecanismos de resistência” (<http://www.apsnet.org>). O Projeto Genoma de *Crinipellis pernicioso* foi iniciado no ano 2000 com o intuito de decifrar geneticamente este patógeno e ajudar assim na identificação alvos para desenho de drogas ou para manipulação genética do patógeno ou da planta gerando assim estratégias inovadoras para o controle da doença.

O estabelecimento do cariótipo molecular de *C. pernicioso* é uma parte importante do Projeto Genoma, já que proveria as primeiras evidências sobre o tamanho e a organização do genoma e ajudaria a determinar as necessidades de seqüenciamento. Este cariótipo serve também como base para a construção de mapas físicos do genoma e para o estudo da variabilidade genética do patógeno a nível cromossômico, já que permitiria identificar a presença ou ausência de polimorfismos cromossômicos para esta espécie.

Em vista do interesse em obter clones de cacau resistente à VB, o estudo da variabilidade genética do patógeno na região produtora da Bahia resulta essencial, já que enquanto maior a variabilidade do fungo menor a chance de sucesso deste tipo de programa de controle. Igualmente, este estudo também pode trazer à luz as fontes e/ou os mecanismos de geração de variabilidade do patógeno, ajudando assim a estabelecer um plano de manejo integrado para a doença.

Enquanto começamos a compreender a variabilidade genética e biológica que existe em *C. pernicioso*, notamos que a informação existente com respeito à expressão gênica e a patogenicidade envolvida na interação planta-patógeno é limitada. Em consequência, além do seqüenciamento genômico, o Projeto Genoma da VB visa à compreensão global do processo de fitopatogenicidade e, para isso, prevê a aplicação de outras técnicas de biologia molecular, tais como o seqüenciamento de DNA complementar (cDNA) e a avaliação do transcriptoma por microarranjos de DNA. Este trabalho pretende ampliar estes conhecimentos, gerando informações valiosas com relação à expressão gênica do fungo durante a interação com o hospedeiro através da geração de bibliotecas de cDNA e a análise de Expressed Sequence Tags (ESTs).

Em vista destes fatos, o objetivo principal deste trabalho é aprimorar os conhecimentos sobre a interação *C. pernicioso*-Cacaueiro, no marco do Projeto Genoma da VB, com informações referentes à: 1) tamanho e organização do genoma através da obtenção do cariótipo molecular de *C. pernicioso*; 2) variabilidade genética do patógeno a nível cromossômico na região produtora da Bahia; e 3) expressão gênica do fungo em presença de extratos do hospedeiro (identificação de genes possivelmente associados à sua fitopatogenicidade).

Tomados em conjunto, os dados referentes à variabilidade genética do fungo e a sua expressão gênica em presença do hospedeiro facilitarão nossa compreensão sobre a doença, o que possivelmente levaria à criação de novas alternativas de controle para este fungo fitopatogênico. Adicionalmente, a informação adquirida poderá auxiliar no entendimento dos mecanismos gerais de fitopatogenicidade que poderão ser aplicados a outros sistemas planta/fungo.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. A DOENÇA VASSOURA-DE-BRUXA EM CACAUEIRO

A doença VB em *Theobroma cacao* L. (cacaueiro), causada pelo fungo basidiomiceto *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, é uma das doenças de maior impacto econômico nos países produtores de cacau da América do Sul e das ilhas do Caribe.

*C. pernicioso* ataca as regiões meristemáticas do cacaueiro, principalmente frutos, brotos e almofadas florais, ocasionando queda acentuada na produção. Atualmente, a doença constitui o maior problema fitopatológico do estado da Bahia e, talvez, do Brasil. A doença é originária da bacia amazônica e só foi detectada no sul da Bahia em 1989 (PEREIRA *et al.*, 1989). De 1991 para 2000 o Brasil teve sua produção anual reduzida de 320,5 mil toneladas para 191,1 mil toneladas, caindo a sua participação no mercado internacional de 14,8% para 4%. Esse quadro, associado aos baixos preços do produto praticados no momento da introdução da doença, tem fragilizado consideravelmente a situação sócio-econômica e o equilíbrio ecológico das regiões produtoras do cacau no país, onde cerca de 2,5 milhões de pessoas dependem dessa atividade (BRAZILIAN MINISTRY OF AGRICULTURE, 2002). Este problema afeta economicamente não só às regiões produtoras (Bahia, Pará, Rondônia e Amazonas), mas também ao Estado de São Paulo, onde é produzida grande parte do chocolate nacional. Devido à drástica redução na produção de cacau, o Brasil hoje deve importar este produto para assim suprir sua demanda interna de cacau, incrementando os custos de produção de chocolate.

Os sintomas da doença VB foram descritos pela primeira vez em 1895 (STELL, 1928). Porém, o fungo causador da doença foi descrito somente em 1915 por Stahel, quem lhe deu o nome de *Marasmius perniciosus*. Singer transferiu esta espécie para o gênero *Crinipellis* e o nome de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer tem sido usado até o momento (SINGER, 1942).

## 2.2. O FUNGO *CRINPELLIS PERNICIOSA* E SEU MECANISMO DE AÇÃO

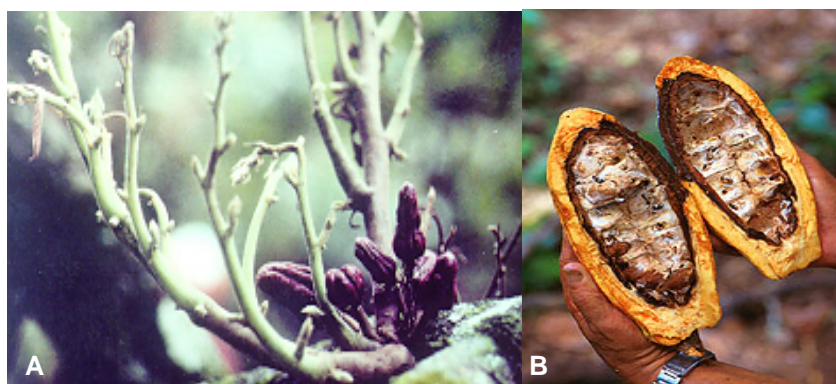
Taxonomicamente, *C. pernicioso* tem sido classificado dentro da divisão Eumycota, subdivisão Basidimycotina, classe Basidiomycetes, subclasse Homobasidiomycetidae, ordem Agaricales e família Tricholomataceae (PURDY e SCHMIDT, 1996). Baseado em caracteres morfológicos, PEGLER (1978) descreveu três variedades para esta espécie: *C. pernicioso* var. *pernicioso*, *C. pernicioso* var. *ecuatoriensis* e *C. pernicioso* var. *citriniceps*, sendo que todas elas atacam o cacauero causando a doença VB. Contudo, esta classificação desconsidera as variações associadas à distribuição geográfica e ao hospedeiro.

Inicialmente, acreditava-se que *C. pernicioso* estava restrito a hospedeiros pertencentes a dois gêneros da família Sterculiaceae: *Theobroma* e *Herrania* (HEDGER *et al.*, 1987). Porém, mais recentemente o fungo foi encontrado associado a outros hospedeiros. Griffith e Hedger (GRIFFITH e HEDGER, 1994a) consideram que, apesar das similaridades morfológicas, o fungo pode ser classificado em quatro biótipos dependendo do hospedeiro: i) o Biótipo C, que infecta cacau e outros membros da família Sterculiaceae (BASTOS *et al.*, 1988); ii) o Biótipo S, que infecta várias espécies da família Solanaceae (BASTOS e EVANS, 1985); iii) o Biótipo B, que foi encontrado numa plantação de urucuzeiro (*Bixa orellana*) (Bixaceae) (BASTOS e ANDERBRHAN, 1986), e iv) o Biótipo L, que foi encontrado infectando lianas das espécies *Arrabidaea verrucosa* (Bignoniaceae) e *Entada gigas* (Leguminosae) assim como também galhos mortos de diversas espécies de árvores suspensos na copa de florestas primárias na bacia amazônica (EVANS, 1978; HEDGER *et al.*, 1987). Os Biótipos C, S e B causam os sintomas característicos da VB (hiperplasia e hipertrofia do tecido afetado) nos seus hospedeiros correspondentes, porém, estes tipos de sintomas não têm sido observados durante a infecção pelo Biótipo L, o qual parece ser um saprófito não seletivo (HEDGER *et al.*, 1987). Adicionalmente, o Biótipo L também difere dos outros biótipos em que sua estratégia reprodutiva é do tipo heterotálico bifatorial e em que não possui uma etapa biotrófica em seu ciclo de vida (GRIFFITH e HEDGER, 1994b).

Os biótipos C, S e B de *C. pernicioso* exibem um ciclo de vida hemibiotrófico com dois tipos de micélio: o biotrófico ou parasítico, que invade os

tecidos meristemáticos do hospedeiro na forma infectiva de basidiósporos; e o saprofítico ou necrótico (fase perfeita do fungo) que cresce em tecidos necrosados ou mortos e culmina com a formação de novos basidiomas (GRIFFITH e HEDGER, 1994a).

*C. pernicioso* se desenvolve unicamente em tecido novo, sendo muito raro nos tecidos do parênquima. O ataque nos ramos, ou brotos vegetativos, provoca inchaço da parte afetada, acompanhada da proliferação de pequenos brotamentos próximos uns dos outros, onde se prendem as folhas grandes, curvadas e retorcidas, cuja forma lembra uma vassoura, daí o nome de VB. Nas almofadas florais infectadas formam-se cachos de flores anormais e hipertrofiadas que podem não produzir frutos, dar origem a frutos que morrem prematuramente ou que crescem com formatos anormais.



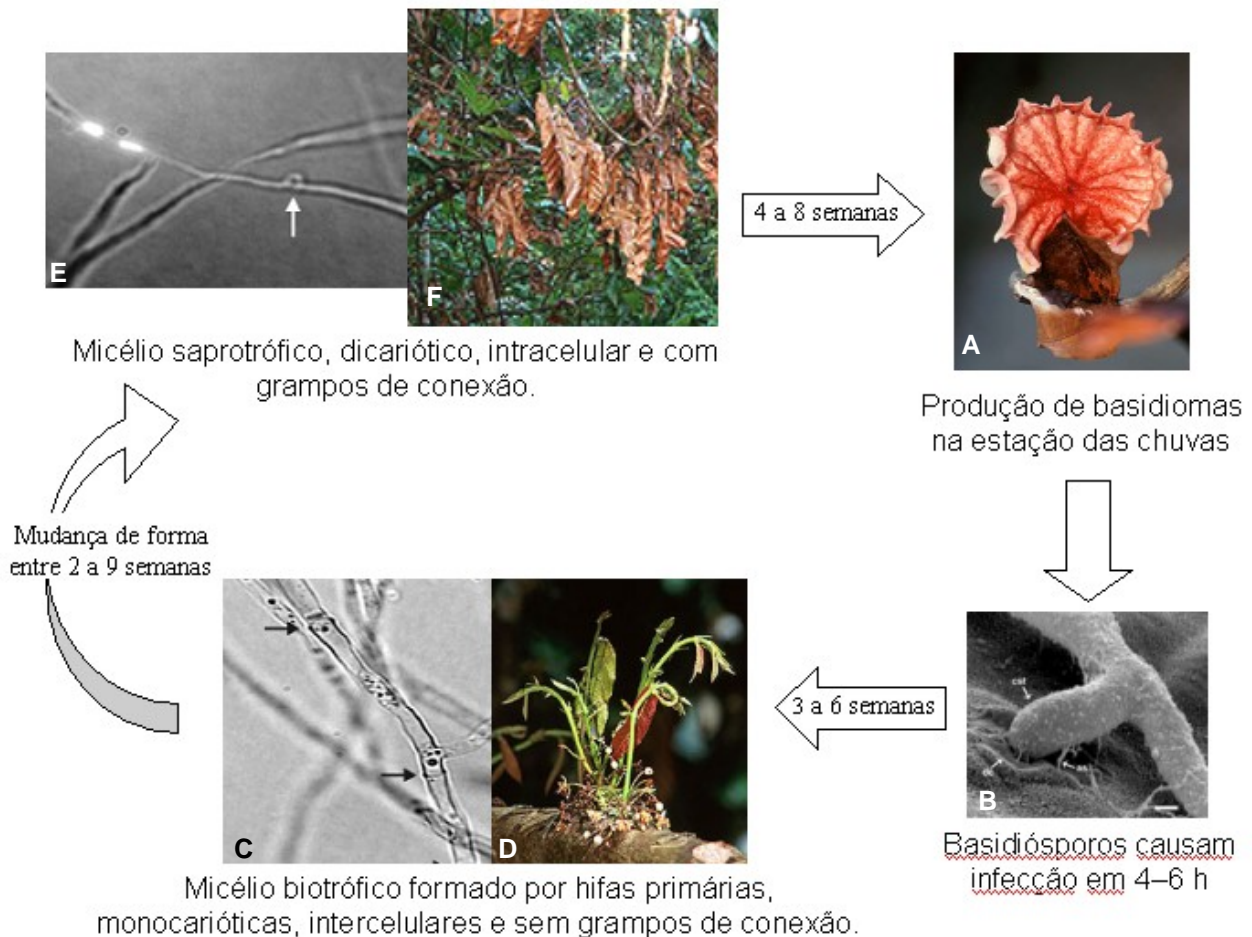
**Fig. 2.1.** Sintomas da vassoura-de-bruxa em frutos de *Theobroma cacao*. A) Deformidade dos frutos (forma de cenoura ou morango) devido à infecção de *C. pernicioso* em almofadas florais; B) corte longitudinal do fruto infectado mostrando as sementes ligadas.

Os frutos infectados apresentam diversos sintomas, dependendo do tipo de contaminação. Quando a infecção se dá através do ponto de inserção da flor, ou por infecção basidiospórica na inflorescência, surgem frutos partenocárpicos, deformados, com formas parecidas com o morango e que também morrem prematuramente, tornando-se negros e petrificados (Fig. 2.1.A.). Se a infecção afeta diretamente flores já polinizadas resultam frutos com aspecto de cenoura, os quais se tornam pretos e petrificados. Nos frutos jovens (com oito semanas), com 2-5 cm de comprimento, resultam órgãos com maturidade precoce, sobre os quais aparece uma mancha negra, dura e irregular, que corresponde internamente a

tecidos e amêndoas afetados, ficando as sementes ligadas entre si e inaproveitáveis (Fig 2.1B). Frutos infectados com idade aproximada de 11 semanas apresentam podridão externa e interna (ORCHARD *et al.*, 1994).

O ciclo da doença (Fig. 2.2) começa quando os basidiósporos germinam sobre a cutícula e a base dos tricomas, emitindo tubos germinativos longos, mas sem a formação de apressórios e sem nenhuma orientação específica na superfície da planta hospedeira. Os tubos germinativos penetram nos tecidos meristemáticos jovens de folhas e do tronco, causando inicialmente reações em forma de clorose, entumescimento a partir do ponto inoculado e, posteriormente, inflamação provocando superbrotas e anomalias nos frutos e almofadas florais (EVANS e BASTOS, 1979). SREENIVASAN e DABYDEEN (1989) descrevem que a penetração pode ser pelo estômato, tecidos lesados ou pela penetração direta dos tubos germinativos, sugerindo que substâncias do patógeno degradam o tecido do hospedeiro sem que haja a formação de apressórios. A fase inicial de germinação no substrato do basidiósporo uninuclear e haplóide, assim como a produção de um micélio uninuclear e haplóide que invade os espaços intercelulares do tecido, constituem a fase vegetativa (parasítica) do ciclo de vida do patógeno.

Seguindo a penetração por tubos germinativos, o fungo cresce intercelularmente, com hifas relativamente grossas (5-20  $\mu\text{m}$ ), que são freqüentemente distendidas, irregulares, monocarióticas e com ausência de grampos de conexão. Após a invasão do fungo e colonização principalmente no córtex e na medula pelas hifas intercelulares ocorrem modificações morfológicas grosseiras na parede do hospedeiro em contato com a matriz, indicando provável interface relacionada com a nutrição. Tecidos do tronco expendem-se lateralmente devido à perda da dominância apical, proliferando rapidamente e resultando no aparecimento de vassouras verdes características (ANDEBRHAN e FURTEK, 1994; SILVA e MATSUOKA, 1999).



**Fig. 2.2.** Ciclo de Vida de *Crinipellis perniciosae* em *Theobroma cacao*. **A.** o ciclo é iniciado pelo lançamento de basidiósporos, produzidos no basidioma, sobre a superfície da planta hospedeira; **B.** germinação dos basidiósporos com formação de um tubo germinativo e penetração através do estômato, tecido lesado ou diretamente; **C.** hifa biotrófica do micélio primário, encontrada em tecidos meristemáticos vivos do hospedeiro, conhecidos como vassouras verdes (**D**); **E.** hifa saprofítica do micélio secundário, encontrada nos tecidos necrosados do hospedeiro (**F**) e que dará origem à formação de basidiomas

A fase sexual é marcada pela fusão de hifas (plasmogamia ou anastomose) de dois isolados compatíveis para formar um micélio dicariótico. SILVA e MATSUOKA (1999) constataram a presença de hifas dicarióticas em micélio parasítico de *C. perniciosae* aos 30 dias da inoculação, isto mostrou que a dicarionização ocorre em hifas intercelulares. DELGADO e COOK (1976) demonstraram em estudos citológicos que a dicarionização ocorre em hifa monocariótica derivada de um único basidiósporo uninucleado, evidenciando a natureza homotática (autofértil) de *C. perniciosae*.

Quando o crescimento do cacaueteiro é inibido pela ação do patógeno, os nutrientes solúveis se tornam escassos e induzem o fungo a invadir as células, passando assim a obter energia dos tecidos mortos da planta (micélio saprofitico). É nesta fase sexual onde *C. pernicioso* causa necrose, apodrecimento e a morte dos tecidos afetados da planta hospedeira. Só nesta fase da vida do fungo aparecem os basidiomas, os quais produzem numerosos esporos que disseminam cada vez mais a doença (ANDEBRHAN e FURTEK, 1994; ORCHARD *et al.*, 1994).

Morfologicamente, o crescimento de *C. pernicioso* dicariorizado dá origem a um micélio de fase secundária (saprofitico), no qual as hifas são mais finas (1,5 a 1,0  $\mu\text{m}$ ) e apresentam grampos de conexão, necessários para a manutenção de dois núcleos diferentes por célula (SILVA e MATSUOKA, 1999). Os basidiomas do patógeno são produzidos somente sobre as vassouras e órgãos infectados secos, são abertos, do tipo cogumelo, de coloração variável entre esbranquiçados a róseo e com píleo lamelado de 5-25 mm de diâmetro. Os basídios são hialinos, clavados a fusiformes e normalmente ostentam quatro esterigmas e basidiósporos. Os basidiósporos, por sua vez, são hialinos, elipsóides a reniformes, e possuem paredes finas de 9-12,5 x 4,5-6  $\mu\text{m}$  (ORCHARD *et al.*, 1994).

Existem duas hipóteses para a causa da morte das vassouras. A primeira é que a célula do hospedeiro morre como resultado da infecção, levando a dicariorização no fungo e à formação da fase saprofitica. A outra hipótese é que primeiro ocorre a dicariorização resultando na fase saprofitica que causa a morte do tecido, originando as características vassouras secas (EVANS, 1980). ORCHARD e colaboradores (1994) assumem que o micélio da fase secundária continua seu crescimento dentro da vassoura morta, levando ao desenvolvimento dos basidiomas.

A liberação dos basidiósporos, processo reprodutivo do fungo, se dá preferencialmente à noite, estando associada à queda da temperatura e ao aumento da umidade relativa do ar, sendo disseminados pela corrente dos ventos. Os basidiósporos são liberados através de um mecanismo explosivo. Estes têm



vida curta, são sensíveis a luz e em condições naturais não vivem mais que algumas horas. A disseminação pode acontecer também pela água e através do transporte de tecidos contaminados (PURDY e SCHMIDT, 1996).

### **2.3. TENTATIVAS DE CONTROLE DA DOENÇA VASSOURA-DE-BRUXA**

Devido ao enorme impacto econômico e social causado pela VB na região produtora da Bahia, os poderes públicos Federal e Estadual têm concentrados esforços econômicos e científicos na tentativa de estabelecer um plano de controle da doença na Bahia, através das organizações CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura do Cacau), CEPEC (Centro de Pesquisas do Cacau) e FUNDECAU (Fundo Baiano de Defesa da Cacaicultura) que fomentam pesquisas sobre a viabilidade da aplicação de diferentes estratégias de controle.

Embora várias estratégias de controle químico (fungicidas e óleo de petróleo) e biológico venham sendo testadas já há alguns anos, as práticas utilizadas para o manejo da doença restringem-se à proteção de frutos com fungicidas protetores (óxido cuproso, eficiência de 50%), fungicidas sistêmicos (tebuconazole) e poda fitossanitária. Entretanto, sua implementação é onerosa e altamente dependente de mão de obra, sendo antieconômicas em condições de baixa produtividade e alta pressão de inóculo. Além disso, os esforços empreendidos no controle da VB na região sul da Bahia através de fungicidas protetores e sistêmicos assim como o uso de clones com níveis diferenciados de resistência num sistema integrado de manejo, não conseguiram até o momento manter a doença em níveis aceitáveis (RESENDE *et al.*, 2000). O desenvolvimento de novas variedades resistentes, via melhoramento genético, ainda constitui-se numa das alternativas para o controle da doença (SILVA *et al.*, 2001). Aumentando os esforços empregados para o controle da VB, métodos alternativos estão sendo propostos, como descritos a continuação.

#### **2.3.1. Controle Químico:**

Outros fungicidas sistêmicos do grupo dos triazoles têm sido avaliados enquanto a sua efetividade no controle de *C. pernicioso*. MCQUILKEN e colaboradores (1988) estudaram a sensibilidade do fungo ao hexaconazole e ao

triadimenole. Ambos apresentaram uma boa atividade de controle quando aplicado em situação de pré-inoculação e em plantas infectadas, mas não necrosadas. O Benzotiadiazole (BTH) foi avaliado por RESENDE *et al.* (2000) como indutor de resistência em plantas de cacau a desenvolver a VB. Verificaram que o BTH reduziu a incidência da doença em 60,2% quando comparada ao controle inoculado.

Num trabalho recente, (BASTOS, 2001) verificou que o óleo de *Piper enckea* tem um efeito fungitóxico sobre *C. pernicioso*, inibindo o crescimento micelial e germinação de esporos do fungo em concentrações acima de 1000 ppm.

### **2.3.2. Controle Biológico:**

Várias pesquisas têm sido feitas avaliando o potencial do fungo *Trichoderma stromaticum*, que parasita *C. pernicioso*, como agente de controle biológico para combater a VB. Foi verificado que *T. stromaticum* impede a formação de basidioma em *C. pernicioso* (SAMUELS *et al.*, 2000). Estudos de microscopia eletrônica de varredura revelaram a presença de hifas de *T. stromaticum* interagindo com hifas de *C. pernicioso*, além de clamidiósporos e conídios do antagonista no interior das vassouras secas de cacau (COSTA *et al.*, 2001). Em estudos citológicos foi demonstrado que diversas linhagens de *T. stromaticum* foram capazes de parasitar hifas de *C. pernicioso* produzindo antibióticos não voláteis que inibem o crescimento micelial do patógeno de cacau (SARDAGNA e MELO, 2001).

### **2.3.3. Melhoramento Genético do Cacau:**

A CEPLAC dispõe atualmente de coleções de clones de *Theobroma cacao* tolerantes ao fungo, com diferentes níveis de resistência, com o objeto de selecioná-los e adaptá-los às regiões produtoras. Dentre as coleções conhecidas e amplamente utilizadas nos países de cacau da América Central, as da série Scavinia, juntamente com outras introduzidas da região Amazônica, mostraram-se mais resistentes à doença em testes feitos pela CEPEC. A partir do cruzamento do clone Scavinia 6, procedente do Peru, com o ICS1, procedente de Trinidad e

Tobago, a CEPLAC desenvolveu a variedade Theobahia. Esta variedade apresenta graus de resistência e tolerância a *C. pernicioso* em níveis bastante promissores e suas sementes já vêm sendo amplamente distribuídas aos produtores da região cacauífera da Bahia a partir do ano 1997 (AGUILAR *et al.*, 2001).

Além do Theobahia outros cinco clones resistentes à VB, quatro deles importados da América Central e um desenvolvido pela CEPEC/CEPLAC, também estão sendo multiplicados e distribuídos aos produtores sob a forma de mudas para fins de enxertia nas plantas doentes: TSH-1188, TSH-516, TSH-565 (precedentes de Trinidad), EET-397 (procedente do Equador) e CEPEC-42 (desenvolvido pela CEPEC/CEPLAC). Estudos sobre o comportamento desses cinco clones de cacau revelaram que a incidência da VB foi relativamente baixa em todos eles, especialmente no TSH-1188 que apresentou baixos percentuais de plantas infectadas (AGUILAR *et al.*, 2001).

SILVA e colaboradores (2001) realizaram um programa de *screening* na coleção de germoplasma de cacau existente na CEPLAC e selecionaram progênies de genótipos de cacauífera resistentes a *C. pernicioso* que mais se destacaram. Respostas de descendentes de primeira e segunda geração sugerem que a resistência de Scavina é determinada por um número reduzido de marcadores dominantes, tornando necessária a busca de variedades de cacau cuja resistência seja fundada numa fonte distinta com o fim de ampliar a diversidade em cultivo. Apesar destes esforços, no Equador demonstrou-se que variedades resistentes podem tornar-se suscetíveis ao longo de várias gerações (BARTLEY, 1986), indicando assim que ainda são necessários numerosos estudos, principalmente aqueles que avaliem apuradamente a variabilidade genética do patógeno na região de interesse, antes de poder aplicar esta estratégia eficientemente.

#### **2.4. O PROJETO GENOMA DA VASSOURA-DE-BRUXA**

As técnicas de DNA recombinante e os avanços na automação do seqüenciamento de DNA que surgiram a partir do estabelecimento Projeto Genoma Humano em 1985 têm levado a um grande avanço no conhecimento do

funcionamento biológico de diversos organismos, desde bactérias até o homem. Em virtude desses avanços, na última década vários organismos de biologia pouco conhecida tiveram seus genes definidos pela biologia molecular, levando assim ao conhecimento do seu metabolismo (FLEISHMANN *et al.*, 1995; BLATTNER *et al.*, 1997; AINSCOUGH *et al.*, 1998; THE ARABIDOPSIS INITIATIVE, 2000; ADAMS *et al.*, 2000; MCPHERSON *et al.*, 2001). Hoje, estas técnicas estão sendo aplicadas com sucesso no Brasil, aprimorando assim o conhecimento de organismos que são do interesse específico para o país, além da aplicação de tecnologia de ponta num país latino americano. Exemplos deste sucesso incluem aqueles projetos da Rede ONSA (FAPESP), tais como o Projeto Genoma de *Xylella fastidiosa* (SIMPSON *et al.*, 2000), o Projeto Genoma da cana da açúcar (<http://SUCEST.lad.dcc.unicamp.br/en>), o Projeto Genoma Humano do Câncer (<http://www.ludwig.org.br/>), O Projeto Genoma de *Xanthomonas citri* (<http://genoma4.iq.usp.br/xanthomonas>; (DA SILVA *et al.*, 2002) e o estabelecimento da rede de seqüenciamento AEG (*Agricultural and Environmental Genomes*), a qual, em conjunto com o Departamento da Agricultura dos Estados Unidos, vêm estudando outras variedades de *Xylella*, assim como também *Leifsonia xyli* e o café, *Cofee arabica*. Também merece destaque o estabelecimento de oito Genoma Regionais Brasileiros, com o apoio do MCT e do CNPq, que envolvem 48 instituições e mais de 240 pesquisadores do país. Quatro destas redes são voltadas para a área da saúde: a Rede Centro-Oeste para o Transcriptoma de *Paracoccidioides brasiliensis* (<https://www.biomol.unb.br/Pb/>), a Rede do Nordeste para o Genoma de *Leishmania chagasi* (<http://biolab.cin.ufpe.br/leishmania/leishmania.html>), a Rede de Minas Gerais para o Genoma de *Schistosoma mansoni* (<http://verjo18.iq.usp.br/schisto>) e a Rede Estrutural de *Trypanosoma cruzi* ([www.dbbm.fiocruz.br/genome/tcruzi/tcruzi.html](http://www.dbbm.fiocruz.br/genome/tcruzi/tcruzi.html)), e quatro redes estão relacionadas a área de agricultura: a Rede Genolyptus para o Genoma do *Eucalyptus spp.* (<http://genolyptus.ucb.br/Index.jsp>), a Rede Riogene de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (<http://www.riogene.lncc.br/project.htm>), a Rede Genopar de *Herbaspirillum seropedicae* e, finalmente a Rede Bahia/UNICAMP para o Projeto Genoma de *Crinipellis pernicioso* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>), dentro do qual se inserem os objetivos do presente trabalho.

O fungo *Crinipellis pernicioso* é um alvo ideal para estudos de genética molecular no país, já que é um organismo cuja biologia tem sido pouco estudada e causa uma doença de grande impacto econômico para a cacauicultura brasileira. Desta maneira, o Projeto Genoma da Vassoura-de-Bruca visa analisar a interação entre o fungo e o cacauero baseando-se em dados provenientes da identificação de genes envolvidos nos mecanismos de patogenicidade e o estudo da variabilidade genética do fungo. A partir destes conhecimentos, pretendem-se desenvolver mecanismos de melhoramento genético para o cacauero, ou ainda, estratégias que amenizem e até mesmo impossibilitem o desenvolvimento da doença, como a síntese de drogas inibitórias e a manipulação genética do patógeno. Este Projeto foi lançado oficialmente em Setembro de 2000 com o apóio inicial do Governo do Estado da Bahia e posteriormente do CNPq. O Projeto é coordenado pelo Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira desde a Universidade Estadual de Campinas, no Estado de São Paulo (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>).

As bibliotecas genômicas foram confeccionadas seguindo uma estratégia tipo *shotgun*, consistindo na sonicação do DNA genômico em fragmentos com tamanhos variando de 0.5 a 4 Kb. Estes fragmentos foram clonados e seqüenciados, sendo que, atualmente, o seqüenciamento genômico atingiu aproximadamente 65 Mb de boa qualidade, o que representa duas coberturas do genoma estimado por cariótipo Molecular (RINCONES *et al.*, 2003). É esperado que nestes 65 Mb de seqüências genômicas estejam representados, ao menos parcialmente, o 80% dos genes deste importante fitopatógeno (Marcos Renato Araújo, resultados não publicados). Além do seqüenciamento genômico, o projeto também visa à compreensão global do processo de fitopatogenicidade e prevê a aplicação de diversas técnicas de biologia molecular, incluindo a análise de bibliotecas de cDNA e a análise global do transcriptoma por microarranjos de DNA.

### 3. CAPÍTULO 1:

#### **ANÁLISE DO CARIÓTIPO MOLECULAR DE *CRINPELLIS PERNICIOSA*, O AGENTE ETIOLÓGICO DA VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO (*THEOBROMA CACAO*)**

RINCONES, J., MEINHARDT, L.W., VIDAL, B.C., PEREIRA, G.A.G. *Mycological Research*, v. 107, n. 4., p.452-458, 2003

## **ELECTROPHORETIC KARYOTYPE ANALYSIS OF *CRINIPELLIS PERNICIOSA*, THE CAUSAL AGENT OF WITCHES' BROOM DISEASE OF *THEOBROMA CACAO***

Pulse-field gel electrophoresis (PFGE) was used to determine genome size and characterize karyotypic differences in isolates of the cacao biotype of *Crinipellis pernicioso* (C-biotype). The karyotype analysis of 4 different isolates revealed that this biotype could be divided into two genotypes: one presenting six chromosomal bands and the other presenting eight. The size of the chromosomes ranged from 2.7 Mb to 5.3 Mb. The different genotypes correlate with telomere-based PCR analysis. The isolates with 6 chromosomal bands had two that appeared to be doublets, as shown by densitometric analysis, indicating that the haploid chromosome number for this biotype is 8. The size of the haploid genomes was estimated at approximately 30 Mb by both PFGE and Feulgen-image analysis. DNA hybridization revealed that the rDNA sequences are clustered on a single chromosome and these sequences were located on different chromosomes in an isolate dependent manner.

### **3.1. INTRODUCTION**

*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer (Agaricales: Tricholomataceae) is the causal agent of Witches' broom disease of cocoa (*Theobroma cacao* L.). First described in 1895 (STAHEL, 1915; VOGLMAYR e GREILHUBER, 1998), the disease has gained considerable attention as one of the main phytopathological problems of cocoa-producing countries in the Americas (PEREIRA *et al.*, 1996). *C. pernicioso* is presumed to be the only major pathogen of cocoa that developed concomitantly with *T. cacao* in the Amazon basin (PURDY e SCHMIDT, 1996). The fungus exhibits a hemibiotrophic life cycle: a parasitic biotrophic mycelium is formed after spore germination, it infects vegetative flushes, flower buds, and developing fruits, causing swelling and abnormal growth of the affected tissue (brooms); during the second stage, the infected plant tissue turns necrotic and the fungus displays a dikaryotic saprophytic mycelium that develops into basidiocarps (EVANS, 1980).

Although widely known for its pathogenicity of cocoa, *C. pernicioso* also infects other groups of plants. GRIFFITH e HEDGER (1994a) found that evidence

from morphological, cultural and plant inoculation studies indicate that this species can be subdivided into three discrete biotypes: the C-biotype infects species of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae); the S-biotype affects several members of the Solanaceae (Bastos & Evans 1985); and the L-biotype can be found on liana vines (especially the species *Arrabidaea verrucosa* – Bignoniaceae) and associated plant debris (EVANS, 1978; HEDGER *et al.*, 1987; GRIFFITH e HEDGER, 1994b). The C-, and S-biotypes cause the characteristic symptoms of Witches' broom disease on their respective hosts; however, no symptoms have been associated with the infection of the L-biotype (HEDGER *et al.*, 1987).

The disease was first detected in the cocoa-producing region of southeastern Bahia, Brazil, a region of approximately 700.000 hectares, in 1989 (PEREIRA *et al.*, 1989). In a decade, Brazil passed from being one of the main exporters of cocoa into a major importer. Despite the numerous control strategies that have been used against this disease (for reviews see: PEREIRA *et al.*, 1996; PURDY e SCHMIDT, 1996), losses in cocoa production due to *C. pernicioso* continue, causing the abandonment of croplands or their substitution for other cultures, such as coffee or pastures, which generally result in the destruction of the Atlantic rainforest.

Despite the economic importance of this fungus, little is known about its genetics. As a consequence, a genome-sequencing consortium has been established for *C. pernicioso* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>). Information concerning genome size and chromosomal number is an essential part of this project.

The development of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has allowed the separation and resolution of large DNA molecules, in the range from 50 Kb to 13 Mb in size (LAI *et al.*, 1989). The study of fungal chromosomes by the conventional technique of light microscopy has been hampered by their small size and the advent of PFGE has been particularly useful in the establishment of the karyotype of these organisms. This technique has also allowed the assignment of sequences of interest to the separated chromosome bands (MILLS e MCCLUSKEY, 1990).



This study presents the electrophoretic karyotype analysis of 4 different isolates of *C. pernicioso*, including the reference isolate CP02, selected for the Genome Project.

## 3.2. MATERIALS AND METHODS

### 3.2.1. Fungal strains

**Table 3.1.** C-Biotype isolates of *C. pernicioso* examined by CHEF gel electrophoresis.

Isolate No.	Collection No.	Origin†	Responsible Institution‡
1	CP02	SEB- Itabuna	UESC
2	CP09	SEB-Ilhéus	CEPLAC
3	Ilhéus	SEB-Ilhéus	UFB
4	FA42	SEB-Itajuípe	FAC

† Origin of isolates: SEB: All isolates were collected within a region of approximately 90 Km<sup>2</sup> in Southeastern Bahia (Brazil).

‡ Responsible Institution for the collection of isolates: UESC (*Universidade Estadual de Santa Cruz*) in Ilhéus, Bahia, collected by Prof. Júlio Cascardo; CEPLAC (*Comissão Executiva do Plano de Lavoura do Cacau*) in Ilhéus, Bahia, collected by Dr. Karina Gramacho; UFB (*Universidade Federal de Brasília*) in Brasília, collected by M. Sc. Maricília Arruda; FAC (*Fazenda Almirante Cacau*) in Ilhéus, Bahia, collected by Dr. Alan Pomella

Field isolates of *C. pernicioso* were collected at different times and locations of southeastern Bahia. The four isolates examined are listed in Table 3.1. These isolates were independently tested for pathogenicity on cocoa. For chromosomal DNA standards, *Saccharomyces cerevisiae* strain YNN295 (Bio-Rad) and *Schizosaccharomyces pombe* strain 972h (Bio-Rad) were used.

### 3.2.2. *Crinipellis pernicioso* chromosomal DNA preparation

Dikaryotic mycelia of *C. pernicioso* grown on Malt extract agar plates (Difco, 0113-17) were subcultured in 500 mL flasks containing 200 ml of low sugar media: 0.17% Malt Extract Broth (Merck), 0.5% Yeast Extract (Merck), 5% Glycerol (analytical grade), and incubated at 27 °C with agitation at 400 rpm for 10-12 days. Mycelial blocks were separated from the media through a single layer of sterile cheesecloth and washed in sterile distilled water. About 2 g of wet weight mycelia

were individually transferred to 125 mL flasks. The protoplasting reactions and protoplast recovery were performed according to SANTOS (2001). Briefly, an enzyme suspension containing 15 mg/ml Glucanex (Novo Nordisk) and 10 mg/ml of BSA (Sigma) was prepared in Buffer A (0.8 M KCl, 10 mM phosphate buffer, pH 5.8), 10 mL of this enzyme suspension was filtered through a 22 µm filter (Millipore) and added to each flask. The reaction was incubated at 30 °C with gentle shaking (80 rpm). Protoplast release was checked hourly under a light microscope (400X) and generally 3-4 hours was sufficient for complete digestion of mycelia. The reaction was filtered through a double layer of sterile cheesecloth and the remaining mycelia were washed with 5 mL of Buffer A. The suspension was transferred to a 15 mL Falcon tube and the protoplasts were pelleted by centrifugation at 800 xg for 15 min in a refrigerated (4 °C) swinging-bucket centrifuge (Beckmann).

The sample plugs were prepared according to ORBACH *et al.* (1988): the collected protoplasts were resuspended in Buffer B (0.8 M Sorbitol, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) at a concentration of  $5-8 \times 10^9$  cells/mL. This suspension was mixed with an equal volume of molten (45 °C) embedding solution (1 M Sorbitol, 50 mM EDTA pH 8.0, 1.2% Low-Melting Point Agarose -Invitrogen) and pipetted into 2 mm x 1 cm x 2 cm plug molds. The plugs were solidified at 4 °C for 15 minutes and placed in NDS buffer (10 mM Tris-HCl, 0.5 M EDTA, 1% N-Lauroylsarcosine, pH 9.5) containing 2 mg/mL Proteinase K (Invitrogen). The plugs were incubated in this solution at 55 °C for 48 h. The NDS was then removed; the plugs were washed twice in 0.5 M EDTA pH 8.0, and stored in this solution at 4 °C until used.

### **3.2.3. Pulsed-field gel electrophoresis**

Chromosomal separations were carried out in a Contour-Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) system (DR-II, Bio-Rad). Agarose gels were formed by pouring a molten solution of 0.8% pulse-field grade Seakem Gold agarose (BMC) in 0.5 X TBE Buffer (45 mM Tris-Borate, 5 mM EDTA) into a 14 cm x 13 cm x 1 cm mold. The agarose plugs containing the chromosomal DNA of *C. perniciosus* and the size standards were cut to the appropriate size, placed inside the gel wells, and sealed with 0.8% agarose. Gels were run at 10-12 °C in 0.5 X

TBE buffer at 1.4 V/cm (constant current) for 264 hours with pulse intervals progressively increasing from 20 minutes to 115 minutes. The gels were stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml) for 60 minutes, destained for 60-90 minutes, and then viewed with a UV transilluminator and photographed (Image Master<sup>®</sup> VDS). Densitometric analysis of the ethidium bromide-stained pattern of the chromosomal bands was performed using the software Image Master<sup>®</sup> VDS (Amersham Bioscience).

#### **3.2.4. Transfer and hybridization conditions**

CHEF gels were first soaked in two changes of 0.25 M HCl for 15 minutes each in order to nick the DNA before transfer. The DNA was transferred to Hybond-N<sup>+</sup> nylon membrane (Amersham Bioscience) by alkaline capillary transfer (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Filters were neutralized in a solution containing 0.5 M Tris-HCl (pH 7.2), 1 M NaCl, and the DNA was UV cross-linked to the membranes with 1200 J/cm (ULTRALUM transilluminator). A DNA probe consisting of the PCR-amplified ITS regions (WHITE *et al.*, 1990) of the ribosomal DNA (rDNA) of *C. perniciosus* was labeled by the random hexamer priming method (FEINBERG e VOGELSTEIN, 1983) using [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dATP (>3000 Ci/mmol, Amersham Bioscience). Prehybridization, hybridization, and washing of the membranes were done according to the manufacturer's instructions. Autoradiography was performed at -70 °C using Kodak X-ODAT film with two intensifying screens.

#### **3.2.5. Genome size determination by Feulgen staining of nuclei and image analysis**

A protoplast suspension (10<sup>9</sup> cells/mL) obtained from isolate 1 (Table 3.1) was fixed in methanol:acetic acid (3:1) at 4 °C for 24 hours and post-fixed in 96% ethanol at -20 °C for an additional 24 hours (VOGLMAYR e GREILHUBER, 1998). The suspension of fixed protoplasts was smeared onto a glass microscope slide and air-dried. The protoplasts were hydrolyzed in 4 N HCl at 25 °C for 60 minutes. Sixty minutes of hydrolysis time was chosen because Feulgen staining was found to be optimal after this period from a hydrolysis curve (from 45 to 65 min. at 5 min. intervals). After this period, the hydrolysis process was stopped by submerging the slides in cold 0.1 N HCl. The protoplasts were then stained with Schiff reagent

(0.5% w/v basic fuchsin, 0.5% w/v sodium metabisulfite) for 45 minutes at 25 °C in the dark and washed three times in sulfur dioxide water (0.05 N HCl, 0.5% w/v sodium metabisulfite). Afterwards, the slides were air-dried and mounted in natural Canada balsam (Merck,  $n_D = 1.54$ ). The fungus *Aspergillus nidulans* (strain FGSC A4) was chosen as the internal standard for the Feulgen reaction in order to convert the arbitrary units of Feulgen-DNA into absolute values of DNA content. The nuclear DNA content of *A. nidulans* has been established by both PFGE and Feulgen staining, obtaining very similar results (BRODY e CARBON, 1989; VOGLMAYR e GREILHUBER, 1998). Mycelial fragments of *A. nidulans* were grown, fixed, hydrolyzed and Feulgen stained according to VOGLMAYR e GREILHUBER (1998).

Feulgen absorbance cytophotometry was performed with the Kontron Elektronik Imaging System KS400 (Kontron Elektronik, Munich, Germany). The system consists of an IBM 486- compatible personal computer, two color monitors, a Zeiss Axiophot light microscope, and a Sony 3 CCD color video camera with an adapter. A 100X immersion oil objective (Neofluar, with a numerical aperture of 1.30) was used with Zeiss immersion oil ( $n_D = 1.518$ , free of halogens). The video camera allows a 2X magnification, which resulted in a 200X total magnification of the image captured on the color monitor. The incident light was filtered through a green monochromatic filter, from which the stained nuclei exhibited maximal absorbance (VIDAL, 1997). Only nuclei in areas with low background noise were measured. 123 nuclei from protoplasts of *C. perniciosus* and 102 nuclei of *Aspergillus nidulans* were measured. For each nucleus, the values of Grey Average (GA) and Area (A) were obtained. These values were converted into Optical Density (OD) and Integrated Optical Density (IOD) with the following formulas:  $OD = 2 - \log_{10}(GA/2.55)$  and  $IOD = A \times OD$ . Raw data of nucleus IOD had to be converted into picogram values using the internal standard. The calculation of DNA picogram values was based on calibration of the sample against the corresponding standard nuclei, using a 1C value of 0.029 pg as equivalent to the average IOD obtained for *A. nidulans* (VOGLMAYR e GREILHUBER, 1998). Picogram values were converted into Mb with the formula 1

pg =  $0.98 \times 10^3$  Mb. Descriptive statistics and a frequency histogram were obtained for each set of data with the software MINITAB™ (State College, PA).

### **3.2.6. Genotypic analysis of isolates by PCR amplification**

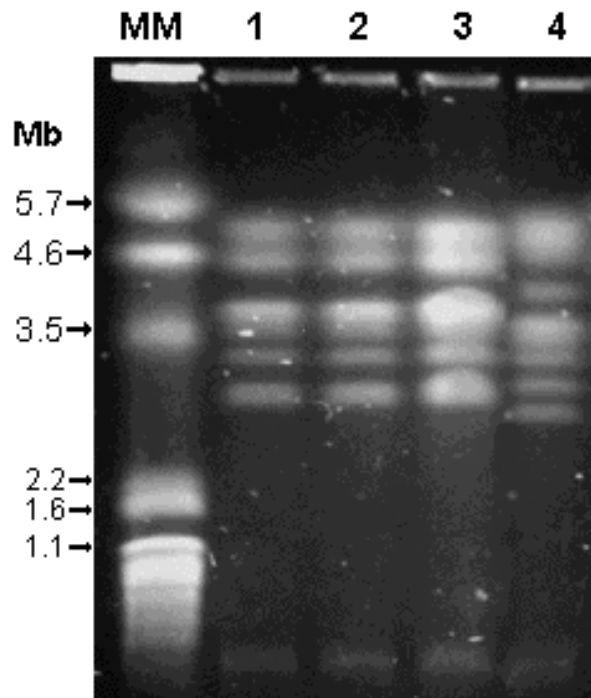
PCR analyses were conducted to investigate whether or not the chromosomal variation observed via CHEF gel analysis could be correlated with genotypic differences. Isolates were analyzed with the telomere-sequence-based PCR primers, TeloA1 (TTAGGG)<sup>3</sup> and TeloA1R (CCCTAA)<sup>3</sup> according to MEINHARDT *et al.* (2002a; 2002b). Briefly, all reactions were conducted with 100-150 ng of DNA and 0.7 to 1.0 unit of Platinum Taq (Invitrogen). The final concentration of the other reactions components were: magnesium chloride (2.5 mM); total dNTPs (400 μM); and primers (200pM). PCR included an initial denaturation step of 92 °C for 10 min, followed by 35 cycles of 1 min (94 °C), 1 min (42 °C) and 2 min (72 °C). PCR primers were not paired when used for this analysis.

## **3.3. RESULTS**

### **3.3.1. Electrophoretic karyotype of *C. pernicios***

Figure 3.1 shows the electrophoretic karyotype obtained for the 4 different isolates of *C. pernicios* (Table 3.1). Two different chromosomal patterns were observed. Isolates 1, 2, and 3 presented six individual chromosomal bands with sizes ranging from 2.9 Mb to 5.2 Mb, while for isolate 4, eight chromosomal bands were resolved with sizes varying from 2.7 to 5.3 Mb (Table 3.2).

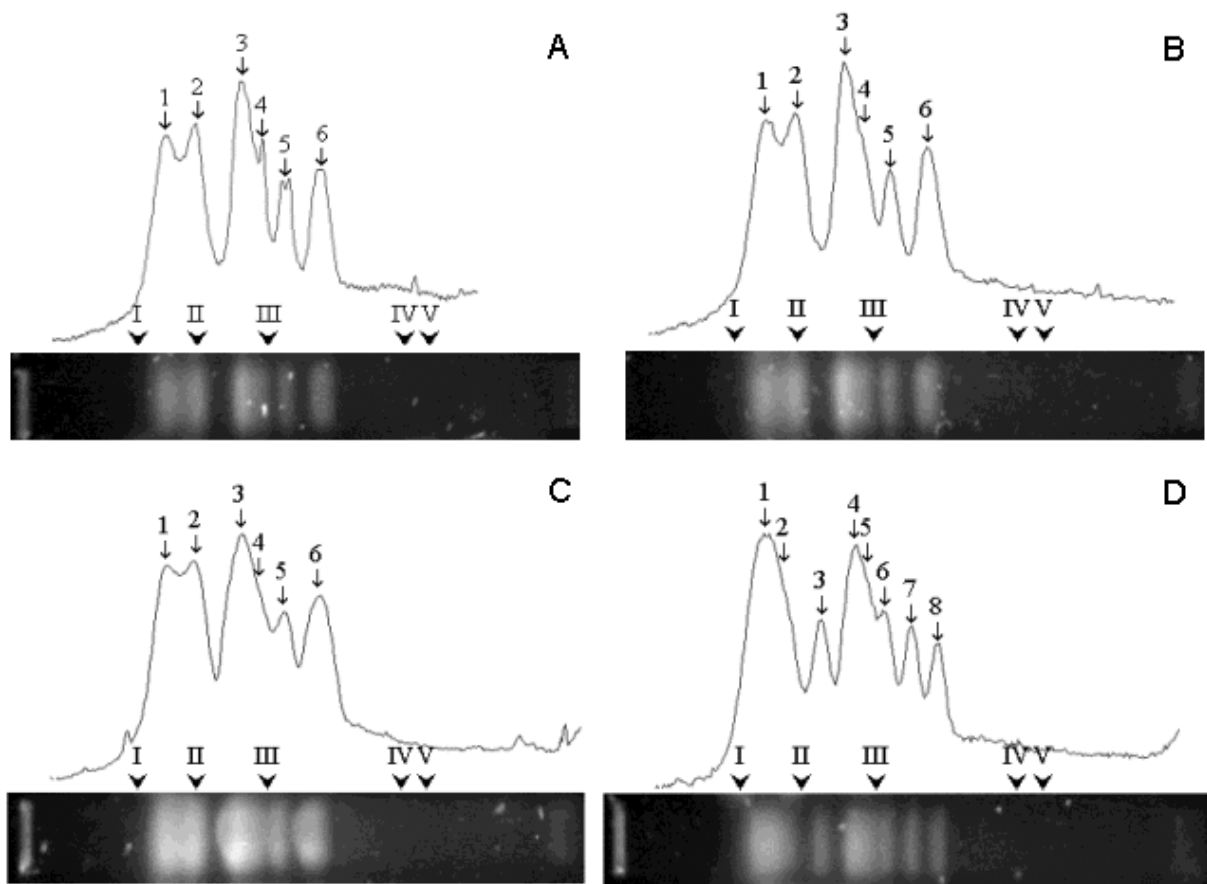
A densitometric analysis of the ethidium bromide-stained pattern was performed (Fig. 3.2). This analysis showed that for isolates 1, 2, and 3 the relative intensity of the ultraviolet fluorescence is higher for bands 3 and 6. This result suggests that each of these bands represent at least two chromosomes (doublets), which could be homologous chromosomes or heterologous chromosomes of similar sizes. For isolate 4, the densitometric analysis revealed that all eight chromosomal bands presented similar relative intensities, suggesting that all the chromosomal bands are single for this isolate.



**Fig. 3.1.** Electrophoretic karyotype of *C. pernicioso*. The electrophoresis was carried out as described in the text and the gel was stained with ethidium bromide. The chromosomal bands were numbered arbitrarily in decreasing order according to size. Molecular markers (MM) include the three chromosomes of *Schizosaccharomyces pombe* (5.7, 4.6, and 3.5 Mb) and the chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae*, of which only the three largest chromosomes were resolved (2.2, 1.6, and 1.1 Mb). Numbers represent isolate designations as found in Table 3.1

The hybridization experiment shows that the rDNA repetitions are clustered in chromosome 2 of isolates 1, 2, and 3; while they hybridized to chromosome 1 of isolate 4 (Fig. 3.3).

The results of nuclear DNA content determination of isolate 1 of *C. pernicioso* through Feulgen-image analysis are shown in Table 3.3. The frequency histogram for the raw IOD data revealed that 34% of the nuclei measured were in G2 (data not shown), as these nuclei had double the amount of DNA as the other 66% of the nuclei measured. Only measurements of nuclei in G1 were considered for the establishment of the haploid DNA content and are summarized in Table 3.3. We obtained an average IOD of  $0.1469 \pm 0.0071$  (mean  $\pm$  SE) arbitrary units of Feulgen-DNA for *A. nidulans*; this value was used to convert the raw IOD data obtained for *C. pernicioso* into picograms.



**Fig. 3.2.** Densitometric analysis of the ethidium bromide-stained pattern of the chromosomal bands of *C. perniciosus*. Only the two different chromosomal patterns observed are shown. After staining the gel, photographs were taken and analyzed with the software Image Master<sup>®</sup> VDS (Amersham Bioscience). A) isolate 2; B) isolate 4. Roman numerals represent the position of marker DNA: I, 5.7 Mb; II, 4.6 Mb; III, 3.5 Mb; IV, 2.2 Mb; V, 1.6 Mb

**Table 3.2.** Estimated sizes and number of chromosomes of the four isolates examined of *C. perniciosus*. The chromosomal bands were numbered arbitrarily according to size, in decreasing order. S, approximate size of the chromosomes expressed in Mb; n, relative copy number of chromosomes as detected by the densitometric analysis. The rDNA genes are located on double underlined chromosomal bands.

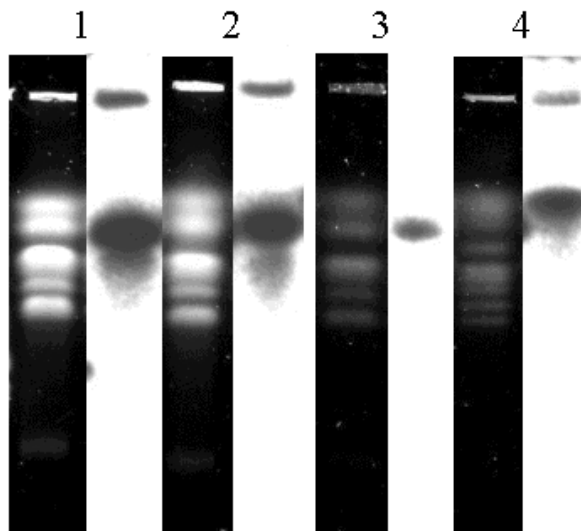
Band	Isolates			
	1	2	3	4
	S (n)	S (n)	S (n)	S (n)
1	5.2 (1)	5.2 (1)	5.2 (1)	<u>5.3 (1)</u>
2	<u>4.6 (1)</u>	<u>4.6 (1)</u>	<u>4.6 (1)</u>	4.7 (1)
3	3.9 (2)	3.9 (2)	3.9 (2)	4.2 (1)
4	3.6 (1)	3.6 (1)	3.6 (1)	3.6 (1)
5	3.3 (1)	3.3 (1)	3.3 (1)	3.5 (1)
6	2.9 (2)	2.9 (2)	2.9 (2)	3.3 (1)
7	-	-	-	3.1 (1)
8	-	-	-	2.7 (1)
<b>Minimal Size</b>	23.5 (6)	23.5 (6)	23.5 (6)	30.4 (8)
<b>Total size</b>	<b>30.3 (8)</b>	<b>30.3 (8)</b>	<b>30.3 (8)</b>	<b>30.4 (8)</b>

**Table 3.3.** Basic statistics of the DNA content of G1 nuclei of isolate 1 of *Crinipellis perniciosus* estimated by Feulgen-image analysis (n= 81).

	IOD (a.u.)	Picograms	Mb
Mean	0.1706	0.0337	32.9803
Median	0.1660	0.0327	32.0891
SD	0.0411	0.0081	7.9497
Max.	0.2589	0.0511	50.0515
Min.	0.0931	0.0184	17.9974

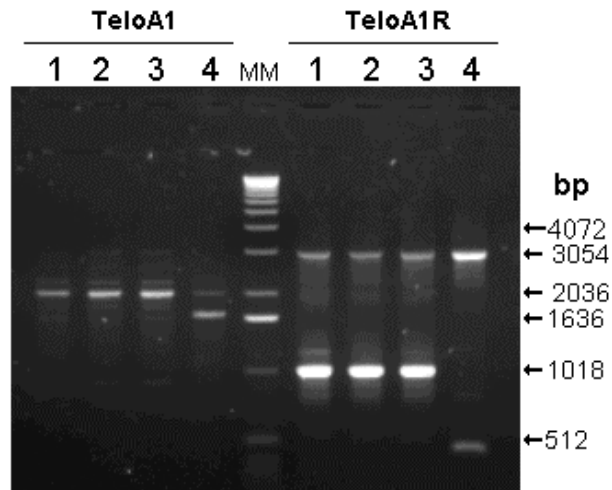
Note: a.u., arbitrary units of Feulgen-DNA; SD, standard deviation





**Fig. 3.3.** Hybridization of the internal transcribed spacer region of the rDNA to the chromosomal bands of *C. pernicioso*. The probe was obtained by PCR amplification of the genomic DNA of isolate 1 of *C. pernicioso* using specific primers for the ITS1-5.8S-ITS2 region.

### 3.3.2. Telomere-sequence-based PCR analysis



**Fig. 3.4.** Telomere-sequence-based PCR analysis of *C. pernicioso*. PCR amplifications were done as described in the Materials and Methods. Amplicons were separated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel in 0.5X TBE, and stained with ethidium bromide. MM - 1 Kb molecular marker (Invitrogen). Bands to the right of the marker were amplified with the primer TeloA1, while bands to the left were amplified with the primer TeloA1R. Numbers represent isolate designations as found in Table 3.1.

Telomere-sequence-based PCR analysis of *C. pernicioso* isolates revealed that isolates having similar chromosomal variations had comparable amplicon

banding patterns (Fig. 3.4). These observations appear to suggest that there are genotypic differences, within the *C. perniciosus* population, that are somehow associated with chromosomal variation and/or rearrangements.

### 3.4. DISCUSSION

In the present work we analyzed the molecular karyotype of different isolates of *C. perniciosus*. Table 3.2 shows the calculated sizes of the chromosomal bands. The number of the DNA bands observed is considered as the minimal number of chromosomes. Since the intensity of the bands reflect DNA content, i.e. the size and number of DNA molecules included in the band, the total number of chromosomes should be estimated from the number of bands with an additional consideration for the relative intensity of each band (SAGAWA e NAGATA, 1992). Our results suggest that bands 3 and 6 of the isolates with six chromosomal bands represent two chromosomes. Thus, it was concluded that all the isolates of *C. perniciosus* examined possess 8 chromosomes. This result agrees with the observations made by DELGADO e COOK (1976), who reported the presence of eight chromosomes while studying metaphase cells of this fungus under the light microscope.

The total genome size estimated by PFGE for all the isolates studied was approximately 30 Mb (Table 3.2). As an independent confirmation of the results obtained by PFGE, we used the technique of Feulgen-image analysis. Through this technique we obtained an haploid nuclear DNA content of  $32.98 \pm 7.95$  Mb for isolate 1, which generally agrees with the results obtained by PFGE. In addition, this estimate is also consistent with the haploid genome size of other filamentous fungi, which range from 20 to 50 Mb (KAYSER e WÖSTEMEYER, 1991; LODDER *et al.*, 1993; SKINNER *et al.*, 1993; FRAISSINET-TACHET *et al.*, 1996; GEISER *et al.*, 1996; ZHONG *et al.*, 2002).

The two different chromosomal patterns observed reveal the existence of chromosome-length polymorphism for *C. perniciosus*. Additional examinations of other C-biotype isolates have revealed only the two chromosomal variations/polymorphisms reported here (data not shown). Many species of fungi exhibit chromosome-length polymorphism. Polymorphism has been observed in

both sexual and asexual fungal species and might be the product of both mitotic and meiotic processes (for reviews see: KISTLER e MIAO, 1992; ZOLAN, 1995). KISTLER e MIAO (1992) proposed a meiotic maintenance hypothesis, suggesting that the amount and extent of the polymorphism in a certain species would be inversely correlated to the frequency of meiosis due to a reduction in fertility among isolates presenting different translocations. For *C. pernicioso*, there are no known mechanisms of asexual reproduction (GRIFFITH e HEDGER, 1994a), indicating that this fungus must undergo meiosis in order to complete its life cycle. Therefore, according to the hypothesis of KISTLER e MIAO ao (1992), the extent of chromosomal length polymorphism should be minimal for this species. However, the C-biotype of *C. pernicioso* exhibits primary homothallism as its reproductive strategy (DELGADO e COOK, 1976) and if individuals with a different karyotype should arise through meiotic recombination in a certain population, these might perpetuate themselves by means of autofertilization. This might explain the polymorphisms observed in isolate 4, which possesses a different karyotype even though it was found in the same region as the other isolates examined (Table 3.1). Nevertheless, the chromosome-length polymorphisms observed between the 4 C-biotype isolates examined appear limited when compared to other phytopathogenic fungi, with the total genome size being very similar for both genotypes. Consequently, it is possible that the extent of these polymorphisms do not hamper the reproduction among individuals of the different genotypes, as has been observed in *Septoria tritici* (MCDONALD e MARTINEZ, 1991) and *Leptosphaeria maculans* (PLUMMER e HOWLETT, 1993). Further studies would be needed in order to confirm either hypothesis

Furthermore, ANDEBRHAN *et al.* (1999) concluded that the outbreaks of Witches' broom disease of cocoa in Bahia were the result of two independent introductions based on RAPD analysis. The two electrophoretic karyotypes and telomere-sequence based analysis observed in this study could correlate with the hypothesis of two independent introductions.

In fungi, the rDNA genes are clustered in long tandem repeats and always map to a single chromosome (DEBETS *et al.*, 1990; MASEL *et al.*, 1990; FRAISSINET-TACHET *et al.*, 1996). Our results agree with this observation since

the hybridization experiment showed that the isolates presenting six chromosomal bands have the rDNA repetitions clustered on chromosome 2, while in the isolate with 8 chromosomal bands, these sequences hybridized to chromosome 1. This result suggests that at least one of the translocations and/or recombination responsible for the chromosome-length polymorphism seen in *C. pernicioso* involves the rDNA chromosome.

In conclusion, *C. pernicioso* isolates analyzed in this study revealed a genome containing 8 chromosomes, which showed isolate dependent polymorphisms that correlates with telomere-based PCR genotypic variations. The total genome size for all of the isolates evaluated in this study was approximately 30 Mb. Therefore, based upon this study, the isolate 1 chosen for the *C. pernicioso* genome initiative appears to be a representative isolate since the chromosomal structure and genome size is maintained.

The results obtained in this study are important and will be utilized to estimate the sequencing needs for the genome project, to localize genes and develop a physical map, and will form the basis for evaluations of population dynamics including the correlation of karyotype with pathogenicity.

Further studies are needed to see if these polymorphic variations are uniform among the fungal populations throughout Brazil and determine if additional variations are present.

### **3.4. ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank M. Sc. Maricília Arruda, Prof. Júlio Cascardo, Dr. Karina Gramacho and Dr. Alan Pomella for the collection of the isolates of *C. pernicioso*, as well as Prof. Cláudio Luiz Messias for providing the *Aspergillus nidulans* strain. We also thank Dr. Pedro Henrique P. A. Schildknecht and Mário Bianchi for their technical support during the Feulgen staining procedure. This work was supported by the *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP, No. 00/10545-4) and by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq).

### 3.5. REFERENCES

- ANDEBRHAN, T., FIGUEIRA, A., YAMADA, M. M., CASCARDO, J., FURTEK, D. B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v.105, n.2, p.167-175, 1999.
- BRODY, H., CARBON, J. Electrophoretic karyotype of *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, v.86, p.6260-6263, 1989.
- DEBETS, A. J. M., HOLUB, E. F., SWART, H. W. J., VAN DEN BROEK, W. J., BOS, C. J. An electrophoretic karyotype of the elm-tree pathogen *Ophiostoma ulmi* (*sensu lato*). *Molecular and General Genetics*, v.238, n.1, p.43-48, 1990.
- DELGADO, J. C., COOK, A. A. Nuclear condition of basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius perniciosus*. *Canadian Journal of Botany*, v.54, n.1, p.66-72, 1976.
- EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' broom disease of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*, v.74, n.6, p.515-526, 1980.
- EVANS, H. C. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador. I. The fungus. *Annals of Applied Biology*, v.89, n.1, p.186-192, 1978.
- FEINBERG, A. P., VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, v.132, n.1, p.6-13, 1983.
- FRAISSINET-TACHET, L., REYMOND-COTTON, P., FÈVRE, M. Molecular karyotype of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Genetics*, v.29, n.5, p.496-501, 1996.
- GEISER, D. M., ARNOLD, M. L., TIMBERLAKE, W. E. Wild chromosomal variants in *Aspergillus nidulans*. *Current Genetics*, v.29, p.293-300, 1996.

- GRIFFITH, G. W., HEDGER, J. N. Spatial distribution of mycelia of the liana (L-) biotype of the agaric *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer in tropical forest. *New Phytologist*, v.127, p.243-259, 1994b.
- GRIFFITH, G. W., HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. *Heredity*, v.72, p.278-289, 1994a.
- HEDGER, J. N., PICKERING, V., ARAGUNDI, J. A. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*). *Transactions of the British Mycological Society*, v.88, p.533-546, 1987.
- KAYSER, T., WÖSTEMEYER, J. Electrophoretic karyotype of the zygomycete *Absidia glauca*: evidence for differences between mating types. *Current Genetics*, v.19, p.279-284, 1991.
- KISTLER, H. C., MIAO, V. P. W. New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*, v.30, n.1, p.131-152, 1992.
- LAI, E., BIRREN, E. W., CLARK, S. M., SIMON, M. I., HOOD, L. Pulsed-field gel electrophoresis. *Biotechniques*, v.7, n.1, p.34-39, 1989.
- LODDER, S., GULL, K., WOOD, D. An electrophoretic karyotype of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Current Genetics*, v.24, n.6, p.496-499, 1993.
- MASEL, A., BRAITHWAITE, K. S., IRWIN, J. A. G., MANNERS, J. M. Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporoides*. *Current Genetics*, v.18, n.1, p.81-86, 1990.
- MCDONALD, B. A., MARTINEZ, J. P. Chromosome length polymorphisms in a *Septoria tritici* population. *Current Genetics*, v.19, n.3, p.265-271, 1991.
- MEINHARDT, L. W., WULF, N. A., BELLATO, C. M., TSAI, S. M. Genetic analyses of *Rhizoctonia solani* isolates from *Phaseolus vulgaris* grown in the Atlantic Rainforest region of São Paulo, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, n.3, p.259-267, 2002a.

- MEINHARDT, L. W., WULF, N. A., BELLATO, C. M., TSAI, S. M. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, n.3, p.211-215, 2002b.
- MILLS, D., MCCLUSKEY, K. Electrophoretic karyotypes of fungi: the new cytology. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.3, n.3, p.351-357, 1990.
- ORBACH, M. J., VOLLRATH, D., DAVIS, R. W., YANOFSKY, C. An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, v.8, n.4, p.1469-1473, 1988.
- PEREIRA, J. L., DE ALMEIDA, L. C., SANTOS, S. M. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. *Crop Protection*, v.15, p.743-752, 1996.
- PEREIRA, J. L., RAM, A., FIGUEREIDO, J. M., DE ALMEIDA, L. C. La primera aparición de la "escoba de bruja" en la principal área productora de cacao del Brasil. *Turrialba*, v.39, n.7, p.459-461, 1989.
- PLUMMER, K. L., HOWLETT, B. J. Major chromosomal length polymorphisms are evident after meiosis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics*, v.24, n.1-2, p.107-113, 1993.
- PURDY, L. H., SCHMIDT, R. A. Status of cacao Witches' broom: biology, epidemiology and management. *Annual Review of Phytopathology*, v.34, n.1, p.573-594, 1996.
- SAGAWA, I., NAGATA, Y. Analysis of chromosomal DNA of mushrooms in genus *Pleurotus* by pulse-field gel electrophoresis. *Journal of General and Applied Microbiology*, v.38, n.1, p.47-52, 1992.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001,
- SANTOS, JILDETE *Obtenção e regeneração de protoplastos de Crinipellis perniciosa (Stahel) Singer, agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacauero (Theobroma cacao L.)*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 30 p. Tese (M. Sc.).

- SKINNER, D. Z., BUDDE, A. D., FARMAN, M. L., SMITH, J. R., LEUNG, H., LEONG, S. A. Genome organization of *Magnaporthe grisea*: genetic map, electrophoretic karyotype, and occurrence of repeated DNAs. *Theoretical and Applied Genetics*, v.87, p.545-557, 1993.
- STAHEL, G. *Marasmius perniciosus* Nov. Spec. *Bulletin Department Van den Landbouw in Suriname*, v.33, n.1, p.25-25, 1915.
- VIDAL, B. C. Image analysis and definition of nuclear phenotypes. *Brazilian Journal of Genetics*, v.20, p.749-754, 1997.
- VOGLMAYR, H., GREILHUBER, J. Genome size determination in Peronosporales (Oomycota) by Feulgen image analysis. *Fungal Genetics and Biology*, v.25, p.181-195, 1998.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 1st.ed., San Diego: Academic Press. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p.315-322.
- ZHONG, S., STEFFENSON, B. J., MARTINEZ, P., CLUFFETTI, L. M. A molecular genetic map and electrophoretic karyotype of the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.15, n.5, p.481-492, 2002.
- ZOLAN, M. E. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiological Reviews*, v.59, n.4, p.686-698, 1995.



#### 4. CAPÍTULO 2:

### **VARIABILIDADE GENÉTICA E POLIMORFISMOS CROMOSSÔMICOS DO AGENTE ETIOLÓGICO DA VASSOURA-DE-BRUXA, *CRINPELLIS PERNICIOSA*, ISOLADO DE DIVERSOS HOSPEDEIROS NA AMÉRICA DO SUL**

RINCONES, J., MAZOTTI, G.D., GRIFFITH, G.W., POMELA, A., FIGUEIRA, A., LEAL JR, G.A., QUEIROZ, M.V., PEREIRA, J.F., AZEVEDO, R.A., PEREIRA, G.A.G., MEINHARDT, L.W. *Mycological Research*, 2006, no prelo.

## GENETIC VARIABILITY AND CHROMOSOME-LENGTH POLYMORPHISMS IN THE WITCHES' BROOM PATHOGEN *CRINIPELLIS PERNICIOSA* FROM VARIOUS PLANT HOSTS IN SOUTH AMERICA

*Crinipellis pernicioso* has been classified into at least four known biotypes associated with members of unrelated plant families. In this study, genetic variability is shown for 27 C- (cacao), 4 S- (Solanum) and 7 L-biotype (Liana) isolates of *C. pernicioso* collected from different regions of Brazil and South America. The objective was to investigate the genetic variability of the pathogen in the cacao-producing region of Bahia, Brazil, and elsewhere, through microsatellite analysis and attempt to identify possible correlations between host-specificity and electrophoretic karyotypes. The PCR-banding patterns were found to vary both within and between the different biotypes, and a correlation was established between the PCR-banding patterns and the chromosomal-banding patterns of each isolate. Microsatellite and chromosomal patterns among all of the L- and S-biotype isolates were distinctly different from the C-biotypes analyzed. A higher degree of genetic and chromosomal variability was found among C-biotype isolates from the Amazon in comparison to C-biotype isolates from Bahia, which seems to be comprised of only two main genotypes. This finding has important implications to the current cacao-breeding program in Brazil.

### 4.1. INTRODUCTION

*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer (*Agaricales, Tricholomataceae*) is the causal agent of witches' broom disease (WBD) of cacao (*Theobroma cacao*). This fungal pathogen is believed to have originated in the Amazon basin and it infects plant species within the families *Malvaceae*, *Solanaceae*, *Bignoniaceae*, *Bixaceae*, and *Malpighiaceae* (EVANS, 1980; GRIFFITH e HEDGER, 1994a; GRIFFITH e HEDGER, 1994b; PURDY e SCHMIDT, 1996; RESENDE *et al.*, 2000; GRIFFITH *et al.*, 2003). Since its first reported occurrence in coastal Ecuador in 1894, the disease has spread to cacao plantations throughout the Americas and Caribbean

islands, causing severe economic losses (PEREIRA *et al.*, 1996; PURDY e SCHMIDT, 1996; GRIFFITH *et al.*, 2003). At this time this disease is limited to the Americas, but is a potential threat to all tropical cacao-growing regions of the world, where the cultivation of cacao is typically done by small landholders with limited technological inputs that make them particularly susceptible to this fungal disease.

An example of the devastating impact of the introduction of this fungus into disease free regions can be found in the cacao-producing region of southeastern Bahia, Brazil, where plantations were abandoned or substituted for other crops (PEREIRA *et al.*, 1996). This has increased the rate of destruction of the Atlantic Rainforest ("Mata Atlântica") and has caused serious socioeconomic problems in the region. Currently the only control mechanism is the selection of resistant plants, which are cloned and distributed to the producers. However, this selection is based on limited information about the genetic variability of both the plant and the fungal pathogen.

The broad host-range of *Crinipellis pernicioso* has prompted several authors to propose the following classification system based on host specificity: 1) the C-biotype infects species of *Theobroma* and *Herrania* (*Malvaceae*); 2) the S-biotype affects several members of the *Solanaceae* [4]; 3) the L-biotype is found on liana vines (especially the species *Arrabidaea verrucosa* – *Bignoniaceae*) and associated plant debris (EVANS, 1978; HEDGER *et al.*, 1987; GRIFFITH e HEDGER, 1994a; GRIFFITH e HEDGER, 1994b).

The C- and S-biotypes cause the characteristic symptoms of WBD on their respective hosts, while the L-biotype generally causes no symptoms (HEDGER *et al.*, 1987). Another important distinction among the biotypes is that while the C- and S-biotypes exhibit primary homothallism (DELGADO e COOK, 1976; EVANS, 1980; GRIFFITH e HEDGER, 1994a; GRIFFITH *et al.*, 2003), the L-biotype has an outcrossing breeding strategy (bifactorial heterothallism), which is widespread among the agaric fungi (GRIFFITH e HEDGER, 1994b; GRIFFITH e HEDGER, 1994c).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analyses of the mitochondrial DNA, ITS and IGS regions of the rRNA locus has allowed the separation of the C-and S-biotypes and has revealed a clonal population structure for these biotypes that correlates with their non-outcrossing breeding strategy (GRIFFITH e HEDGER, 1994b; ARRUDA *et al.*, 2003). In contrast, the L- biotypes show a non-clonal population structure due to outcrossing and a high degree of genetic variability (GRIFFITH, 1989; GRIFFITH e HEDGER, 1994a; GRIFFITH e HEDGER, 1994b). Moreover, while the genetic variability between isolates from the different biotypes of *C. pernicioso* have been examined with random amplified polymorphic DNA (RAPD) (ANDEBRHAN e FURTEK, 1994; ANDEBRHAN *et al.*, 1999), ERIC repetitive element sequence-based PCR (ARRUDA *et al.*, 2003) and AFLP (PLOETZ *et al.*, 2005), there has been no attempts to correlate the results. In general, diversity is higher among C-biotype isolates from the Amazon region than between isolates from Bahia and some isolates from the Amazon clustered together with those from Bahia. These data indicate that the original introductions into Bahia were probably from Amazonian C-biotype strains (ANDEBRHAN *et al.*, 1999; ARRUDA *et al.*, 2003).

In the present study we analyzed the genetic and chromosomal variation of 38 isolates of *C. pernicioso* comprising three different biotypes (C-, S-, and L-) collected from different geographical locations in Brazil and from both coastal and Amazonian Ecuador. The objectives were to evaluate the genetic variability of the C-biotype in Bahia in comparison to isolates from the Amazonian region and to establish whether the genetic differences in the biotypes could be correlated with other factors such as chromosomal variations or possibly host range.

## **4.2. EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **4.2.1 Fungal strains**

Field isolates of *C. pernicioso* were collected at different times, geographic locations, and from different hosts. The 38 isolates examined are listed in Table 4.1; 27 isolates correspond to the C-biotype and each of these constitutes a single-

spore culture obtained from different basidiomes collected in the field; four correspond to the S-biotype and were obtained as described for the C-biotype; and seven correspond to the L-biotype and were obtained by isolation from stipe tissues of basidiocarps collected in the field (including one unmated [monokaryotic] single spore isolate, L7, lacking clamp connections, the progeny of L1). C-biotypes from other countries were not evaluated due to phytosanitary concerns and regulations. S-biotypes were taken only from one region of Brazil since they are only found in this region. All isolates were independently tested for pathogenicity on their respective hosts (data not shown). The collection sites are shown schematically in Figure 4.1. All isolates used in this study can be obtained from the *Laboratório de Genômica e Expressão* at UNICAMP.

Table 4.1. Isolates of *C. pernicioso* used in the present study

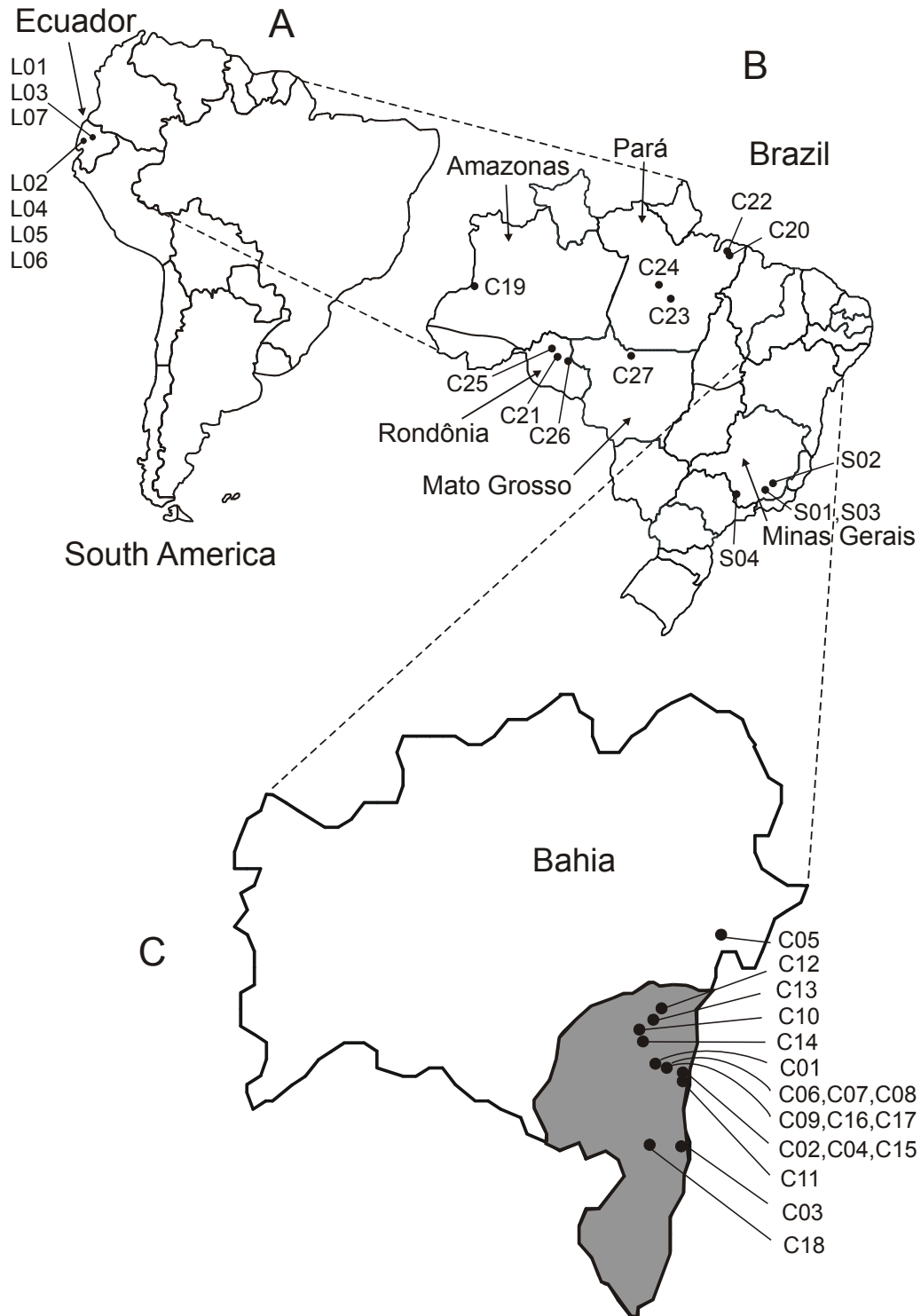
<b>Isolate Designation</b>	<b>Collection No.</b>	<b>Host</b>	<b>Location†</b>	<b>Responsible Institution‡</b>
<b>C01*</b>	CP02	<b>T. cacao</b>	SEBa- Itajuípe	UESC
<b>C02</b>	CP09	<i>T. cacao</i>	SEBa-Ilhéus	CEPLAC
<b>C03</b>	Belmonte	<i>T. cacao</i>	SEBa- Belmonte	UFB
<b>C04</b>	Ilhéus	<i>T. cacao</i>	SEBa-Ilhéus	UFB
<b>C05</b>	Santo Amaro	<i>T. cacao</i>	SEBa- Santo Amaro	UFB
<b>C06</b>	FA42	<i>T. cacao</i>	SEBa-Itabuna	FAC
<b>C07</b>	FA276	<i>T. cacao</i>	SEBa- Itabuna	FAC
<b>C08</b>	FA277	<i>T. cacao</i>	SEBa-Itabuna	FAC
<b>C09</b>	FA278	<i>T. cacao</i>	SEBa- Itabuna	FAC
<b>C10</b>	FA281	<i>T. cacao</i>	SEBa- Aiquara	FAC
<b>C11</b>	FA287	<i>T. cacao</i>	SEBa- Inema	FAC
<b>C12</b>	FA293	<i>T. cacao</i>	SEBa- Gandu	FAC
<b>C13</b>	FA300	<i>T. cacao</i>	SEBa- Ibirataia	FAC
<b>C14</b>	FA311	<i>T. cacao</i>	SEBa- Itagiba	FAC
<b>C15</b>	FA317	<i>T. cacao</i>	SEBa-Ilhéus	FAC
<b>C16</b>	FA562	<i>T. cacao</i>	SEBa- Itabuna	FAC
<b>C17</b>	FA563	<i>T. cacao</i>	SEBa- Itabuna	FAC
<b>C18</b>	BP10	<i>T. cacao</i>	SEBa- Itapebi	FAC
<b>C19</b>	FA551	<i>T. cacao</i>	BA- Tabatinga, AM	FAC
<b>C20</b>	ESJOH1	<i>T. cacao</i>	BA- Marituba, PA	CENA

<b>C21</b>	ESJOH2	<i>T. cacao</i>	BA- Ouro Preto, RO	CENA
<b>C22</b>	ESJOH3	<i>T. cacao</i>	BA- Belem, PA	CENA
<b>C23</b>	ESJOH4	<i>T. cacao</i>	BA- Altamira, PA	CENA
<b>C24</b>	ESJOH5	<i>T. cacao</i>	BA- Medicilândia, PA	CENA
<b>C25</b>	ESJOH6	<i>T. cacao</i>	BA- Ariquemes, RO	CENA
<b>C26</b>	ESJOH8	<i>T. cacao</i>	BA- Ji-parana, RO	CENA
<b>C27</b>	ESJOH9	<i>T. cacao</i>	BA- Alta Floresta, MT	CENA
<b>S1</b>	FA104	<i>Solanum cernum</i>	SEBr- Rio Pomba, MG	FAC
<b>S2</b>	FA607	<i>Solanum lycocarpum</i>	SEBr- Coimbra, MG	FAC
<b>S3</b>	FA608	<i>Solanum cernum</i>	SEBr- Rio Pomba, MG	FAC
<b>S4</b>	FA609	<i>Solanum</i> sp.	SEBr- Poços de Caldas, MG	FAC
<b>L1</b>	SCFT	<i>Arrabidea verrucosa</i>	AE- San Carlos, Napo Prov	UW
<b>L2</b>	LEP1	<i>Arrabidea verrucosa</i>	CE- Pichilingue, Los Rios Pr.	UW
<b>L3</b>	SCL4	<i>Arrabidea verrucosa</i>	AE- San Carlos, Napo Pr.	UW
<b>L4</b>	LA10	<i>Arrabidea verrucosa</i>	CE- Pichilingue, Los Rios Pr.	UW
<b>L5</b>	LA17	<i>Arrabidea verrucosa</i>	CE- Pichilingue, Los Rios Pr.	UW
<b>L6</b>	LC3	<i>Arrabidea verrucosa</i>	CE- Pichilingue, Los Rios Pr.	UW
<b>L7</b>	SCFT48	<i>Arrabidea verrucosa</i>	AE- San Carlos, Napo Pr	UW

† Origin of isolates: SEBa: except for Santo Amaro, isolates were collected within a region of approximately 90 Km<sup>2</sup> in Southeastern Bahia (Brazil); BA: isolates collected in the Brazilian Amazon, states of Amazonas (AM), Mato Grosso (MT), Rondônia (RO), and Pará (PA); SEBr: isolates collected in Southeastern Brazil, state of Minas Gerais (MG); AE: isolates collected in Amazonian Ecuador; CE: isolates collected in Coastal Ecuador.

‡ Responsible Institution for the collection of isolates: UESC (*Universidade Estadual de Santa Cruz*) in Ilhéus, Bahia-Brazil, collected by Júlio Cascardo; CEPLAC (*Comissão Executiva do Plano de Lavoura do Cacau*) in Ilhéus, Bahia-Brazil, collected by Karina Gramacho; UFB (*Universidade Federal de Brasília*) in Brasília-Brazil, collected by Maricília Arruda; FAC (*Fazenda Almirante Cacau*) in Ilhéus, Bahia-Brazil, collected by Alan Pomella; CENA (*Centro de Energia Nuclear na Agricultura*) in Piracicaba, São Paulo-Brazil, collected by Paulo Albuquerque (*ERJOH – CEPLAC*); UW (University of Wales), in Aberystwyth-U.K., collected by Gareth Griffith. Isolates FA 104, FA 607, FA 608 e FA 609 were kindly provided by Dr. Robert Weigart Barreto (*Universidade Federal de Viçosa*).

\*Reference isolate used for the genome project ([www.lqe.ibi.unicamp.br/vassoura](http://www.lqe.ibi.unicamp.br/vassoura))



**Fig. 4.1.** Maps detailing the sites for the collection of the isolates of *Crinipellis perniciososa* listed in Table 4.1. **4.1A.** Map of South America detailing the sites for the collection of isolates of *C. perniciososa* in Ecuador. **4.1B.** Map of Brazil shows the sites of isolate collection in the Brazilian Amazon and Southeastern Brazil. **4.1C.** Map of Bahia shows sites of isolate collection in the southeastern cacao-growing region of this state. The shaded area represents the cacao-growing region in the state of Bahia.

#### 4.2.2. Genotypic analysis of isolates by PCR amplification

Isolates were analyzed with the microsatellite primers, TeloA1R (CCCTAA)<sup>3</sup> according to Meinhardt *et al.* (MEINHARDT *et al.*, 2002a; MEINHARDT *et al.*, 2002b) and TeloC1 (TTTACGG)<sup>3</sup>, a repeat sequence derived from the *C. pernicioso* sequencing data. A total of eight microsatellite primers were initially tested but only these two are shown in this study because of their specific results. Reactions were conducted as described by Meinhardt *et al.* (MEINHARDT *et al.*, 2002a; MEINHARDT *et al.*, 2002b).

#### 4.2.3. *Crinipellis pernicioso* chromosomal analysis

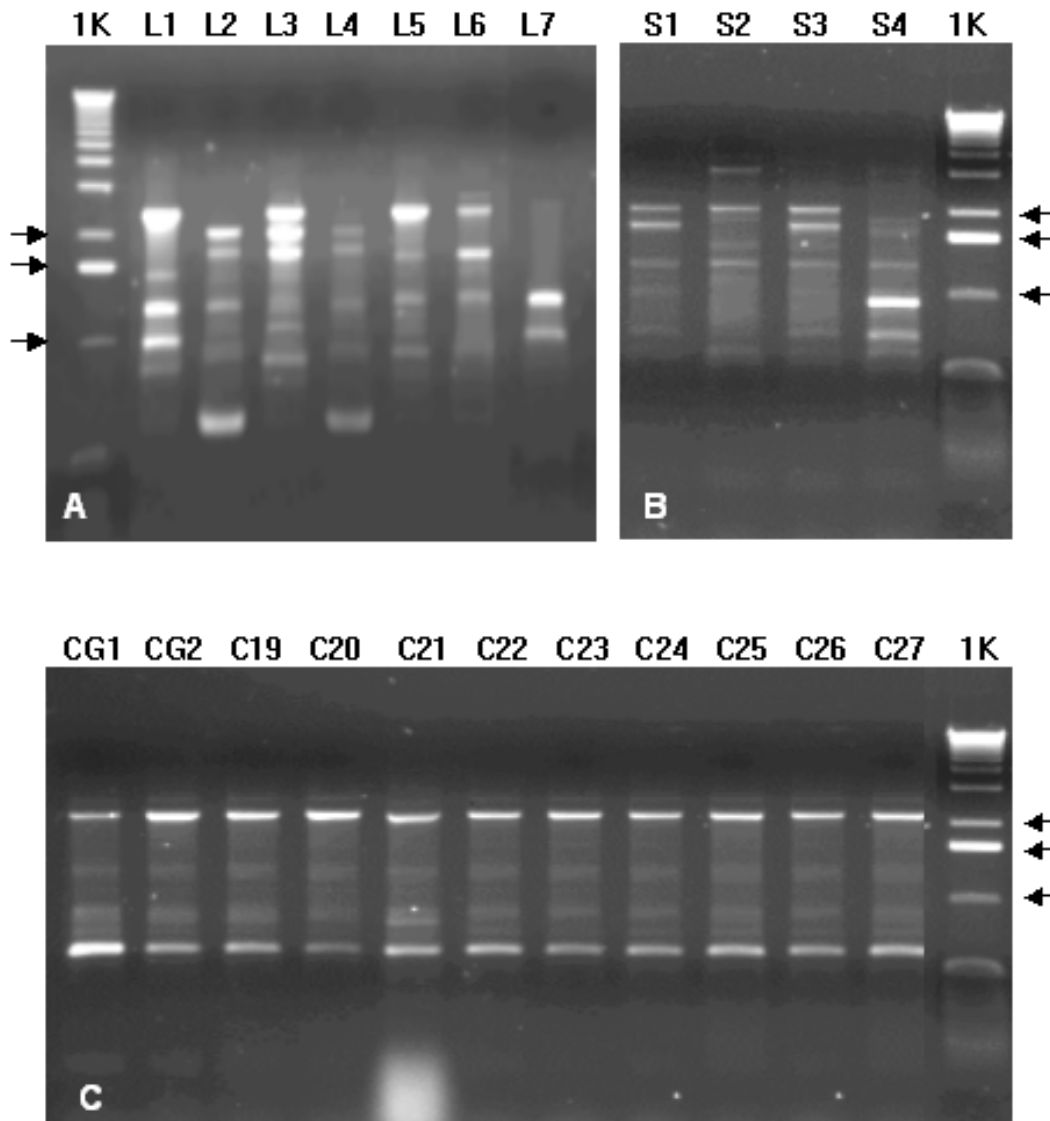
Chromosomal DNA preparation from the saprotrophic mycelia of different isolates of *Crinipellis pernicioso*, protoplasting and sample plug preparations were done as described previously (RINCONES *et al.*, 2003). Chromosomal separations were carried out in a Contour–Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) system (DR-II, Bio-Rad, Herts) under the conditions described previously (RINCONES *et al.*, 2003), with minor modifications. Gels were run at 10-12 °C in 0.5 X TBE buffer at a constant current of 1.4 V/cm for a total 354 hours divided into three blocks. Block 1 consisted of pulse intervals progressively increasing from 2700 seconds to 5000 seconds for 172 hours; Block 2 progressively increasing from 2500 seconds to 3000 seconds for 80 hours; and Block 3 had a constant pulse time of 2200 seconds for 102 hours. Approximate band sizes were calculated from the relative migration of the chromosomes of the *S. pombe* size standard and the reference isolate C01, whose chromosome sizes had been reported previously (RINCONES *et al.*, 2003). Densitometric analysis of the ethidium bromide-stained pattern of the chromosomal bands was performed using the software Image Master<sup>®</sup> VDS (Amersham Bioscience, Little Chalfont). CHEF gels were transferred to membranes (Hybond N+, Amersham Biosciences) and probed with PCR labeled-amplified fragments of: (1) ITS regions (WHITE *et al.*, 1990) of the ribosomal DNA (rDNA) of *C. pernicioso*; and (2) the insert of a genomic clone from isolate C01 showing significant sequence similarity (BLASTx, E value of 9E-13) to a Reverse Transcriptase- RNase H integrase of *Tricholoma matsutake* (GenBank



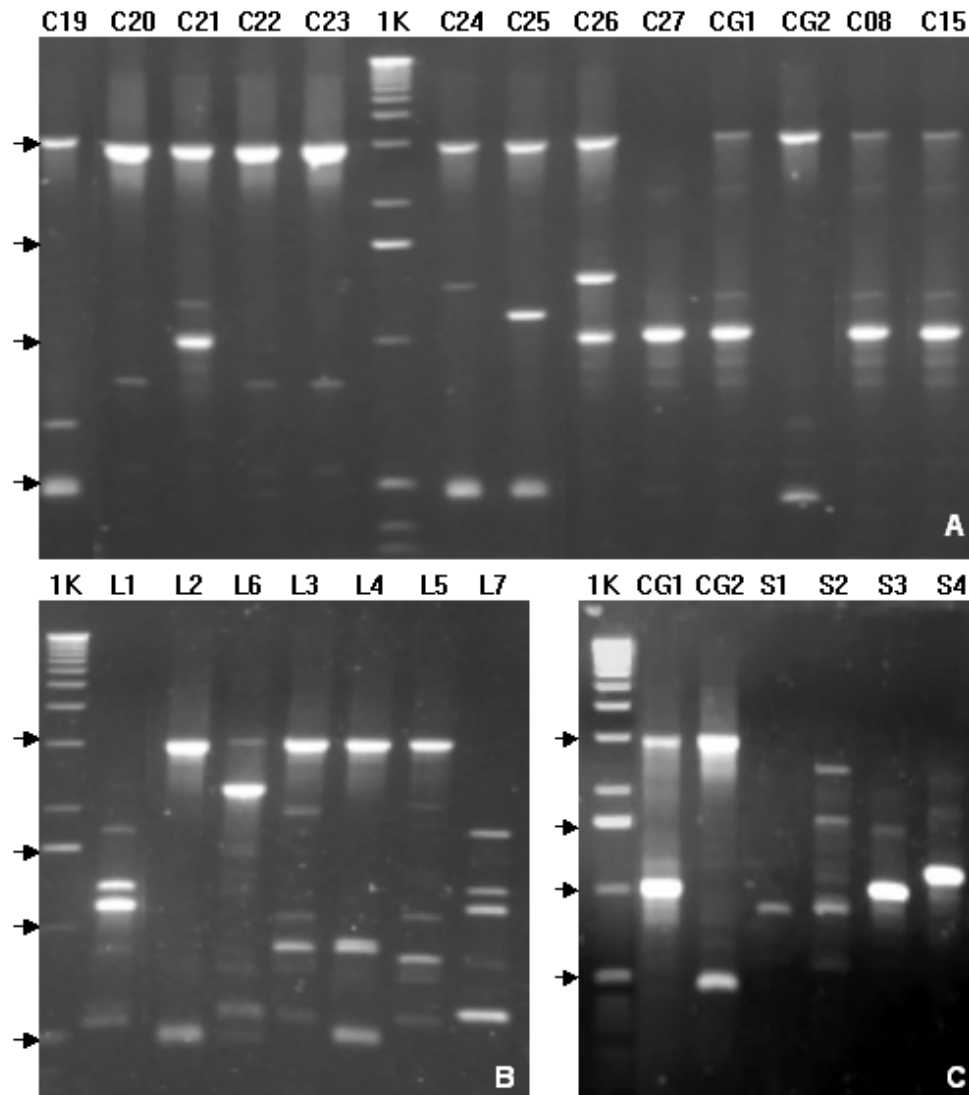
accession no. **AY661428**) (RINCONES *et al.*, 2003). Prehybridization, hybridization, and washing of the membranes were conducted according to the manufacturer's instructions.

### 4.3. RESULTS

#### 4.3.1. Microsatellite-based PCR analysis



**Fig. 4.2.** Microsatellite primer based analysis with the primer TeloC1. Figure 4.2A shows the banding profile for the seven L-biotype isolates amplified with the TeloC1 primer. Figure 4.2B illustrates the PCR banding pattern of the four S-biotype isolates amplified with primer TeloC1. Figure 4.2C shows a comparison of 9 out of the 11 C-biotype groups, CG1 and CG2 correspond to the two chromosomal groups from Bahia and the other isolate codes are as stated in Table 4.1. The isolate codes are as stated in Table 4.1. 1K indicates the 1Kb DNA standard from Invitrogen. Arrows indicate the migration of the 2036, 1636, and 1018bp size markers



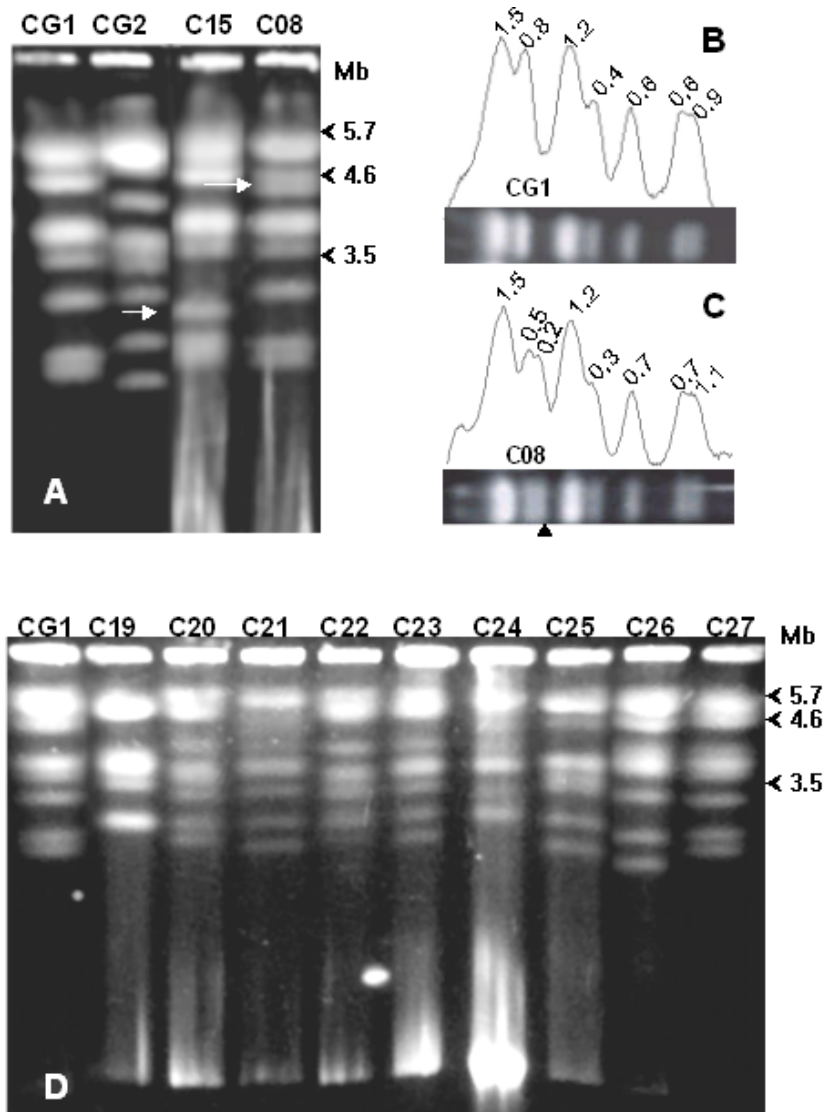
**Fig. 4.3.** Microsatellite primer based analysis with the primer TeloA1R. Figure 4.3A shows a comparison of the banding patterns for C-biotype isolates from the Amazon C19 to C27 and the representative chromosomal groups from Bahia CG1 and CG2 and the two CG1 subgroups, C08 and C15 amplified with the microsatellite primer TeloA1R. Figure 4.3B shows the PCR banding profiles for the seven L-biotype isolates. Figure 4.3C illustrates a comparison of the banding profile for CG1 and CG2 from Bahia and the four S-biotype isolates from Minas Gerais. The isolate codes are as stated in Table 4.1. 1K, indicates the 1Kb DNA standard from Invitrogen. Arrows indicate the migration of the 3054, 1636, 1018, and 506/517bp size markers.

The microsatellite PCR primer TeloC1 revealed genotypic differences between the various isolates of the L- and S- biotypes, but failed to show any difference for C-biotype isolates used in this study (Figures 4.2A, 4.2B and 4.2C).

This was particularly interesting since it gave the same specific banding pattern for all of the C-biotype isolates, regardless of their origin, allowing its differentiation from the other biotypes, therefore suggesting that this primer could be used as a C-biotype indicator (Figure 4.2C). The primer TeloA1R (CCCTAA)<sup>3</sup> (MEINHARDT *et al.*, 2002a; MEINHARDT *et al.*, 2002b) was able to separate most of the biotype C-, L- and S- isolates into specific groups (Figures 4.3A, 4.3B and 4.3C). The C-biotype isolates from Bahia were separated into two groups with the TeloA1R primer, CG1 (comprising isolates C01, C02, C03, C04, C08, C09, C11, C14, C15 and C17) and CG2 (comprising isolates C05, C06, C07, C10, C12, C13, C16, and C18). The nine Amazon isolates were separated into 7 groups with the three isolates from Para C20, C22 and C23 representing a single group (Fig 3A). All of the L- and S- biotype isolates showed genetic variations with the TeloA1R primer (Figures 4.3B and 4.3C). In the case of the L-biotype isolates, this primer revealed a somewhat similar banding patterns for L1 and its progeny L7 indicating that alterations in a given population could possibly be monitored with this primer. All PCR amplicons for the different primers ranged from 3000 bp to 500 bp in size.

#### **4.3.2. Electrophoretic karyotype**

Figure 4.4A shows the four different karyotypes obtained for the 18 C-biotype isolates (C01-C18) collected in various regions of Southeastern Bahia in Brazil: C01-C18 (Table 4.1). Most of the isolates from this region could be grouped into two different karyotypes that were designated as CG1 (comprising isolates C01, C02, C03, C04, C09, C11, C14, and C17) and CG2 (comprising isolates C05, C06, C07, C10, C12, C13, C16, and C18). The other two karyotypes were exhibited by isolates C08 and C15 and they are both very similar to karyotype CG1: in the case of isolate C08, its karyotype showed an extra band of approximately 4.5 Mb in size (arrow on Fig. 4.4A) while the karyotype of isolate C15 presented a slightly smaller 5<sup>th</sup> band (arrow on Fig. 4.4A). In contrast, all nine isolates collected in the Brazilian Amazon (C19-C27, Table 4.1) exhibited different karyotypes, varying in band number and sizes, as shown in Figure 4.4D.



**Fig. 4.4.** Chromosome-length polymorphisms between isolates of the C-Biotype of *Crinipellis pernicioso* from Brazil. Figure 4.4A shows the four different karyotypes obtained for the 18 C-biotype isolates collected in Southeastern Bahia (C01-C18, Table 4.1). Figure 4.4B depicts the densitometric analysis of the ethidium bromide-stained pattern of karyotype CG1, numbers represent the integrated optical density (IOD) for the respective peaks. Figure 4.4C shows the densitometric analysis of the ethidium bromide-stained pattern of the karyotype of isolate C08, numbers represent the IOD of the respective peaks. Figure 4.4D shows the karyotypes of the nine C-Biotype isolates obtained from the Brazilian Amazon (C19 through C27) and reference isolate CG1, for comparison. CG1: Karyotype of the C-biotype Group 1 consisting of isolates C01, C02, C03, C04, C09, C11, C14, and C17. CG2: Karyotype of the C-biotype Group 2 consisting of isolates C05, C06, C07, C10, C12, C13, C16, and C18. Sizes correspond to the relative migration of the three large chromosomes of *Schizosaccharomyces pombe* (strain 972h, Bio-Rad)

Figure 4.5A shows the karyotypes obtained for all isolates of the S- and L-biotypes. The CG1 karyotype is shown for comparison purposes. All isolates

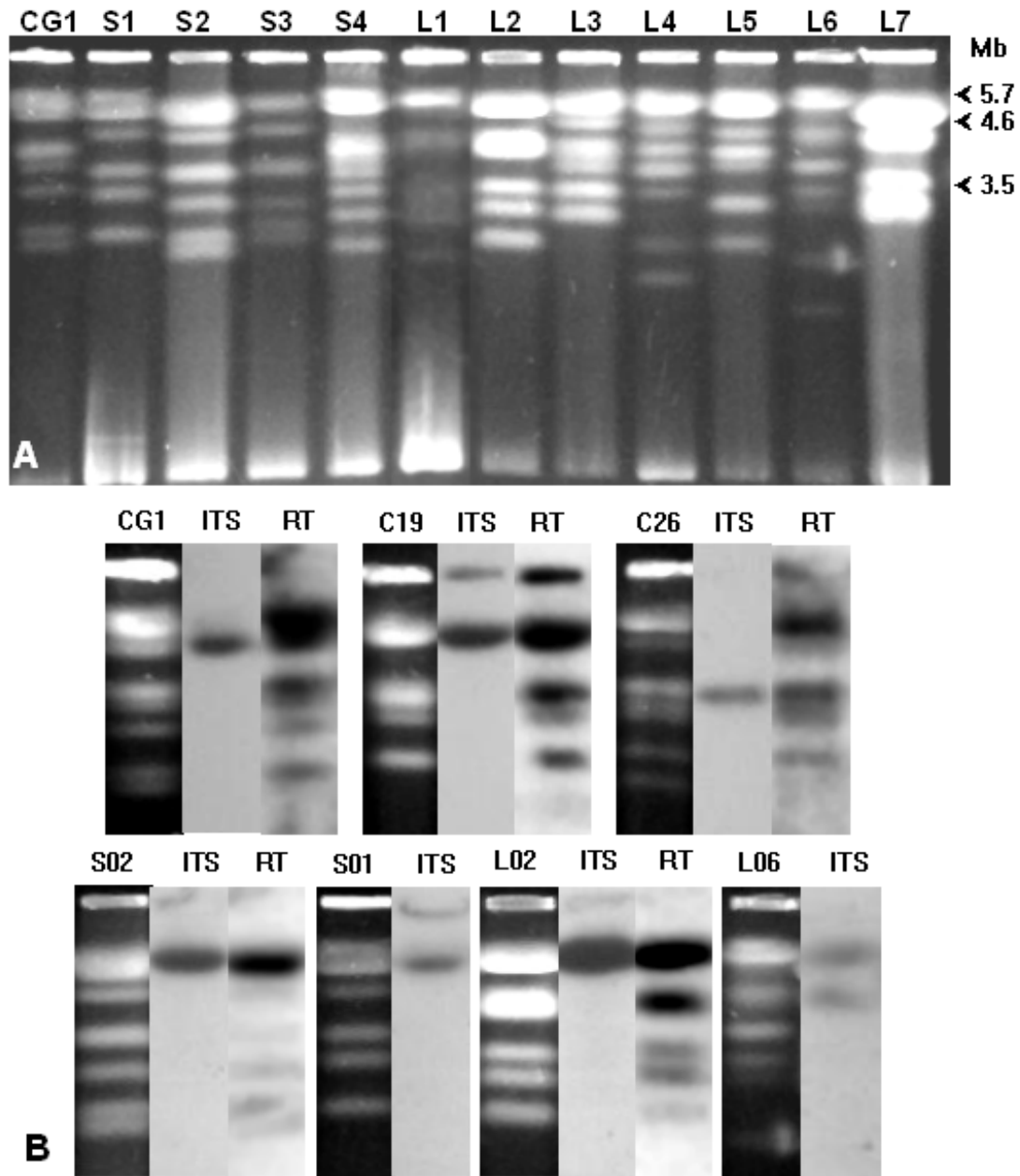
examined for these two biotypes exhibited different karyotypes, varying in band number and sizes.

A densitometric analysis of the ethidium bromide-stained banding pattern was performed for all karyotypes. Two of these analyses are shown as examples (Figs. 4B and 4C) to illustrate that the relative intensity of the ultraviolet fluorescence was higher for some bands. This result suggests that each of these bands represent at least two chromosomes, which could be homologous or heterologous chromosomes of similar sizes. Results from the densitometric analysis were taken into consideration when calculating total genome sizes for each isolate (Table 4.2).

Table 4.2 shows the approximate sizes of the bands and summarizes the electrophoretic karyotypes for each isolate, grouped by biotypes and geographic origin.

#### **4.3.3. Southern hybridization**

Southern hybridization of blots from the gels presented in Figure 4.5B with the ITS probe shows that the rDNA repetitions were usually clustered to a single chromosome, independent of the biotype. Isolate L6 was the only exception with the ITS probe hybridizing to two chromosomal bands (Figure 4.5B). The rDNA repetitions were usually found on one of the two largest chromosomes, except in isolate C25, where the ITS probe hybridized to the third chromosomal band (Figure 4.5B, Table 4.2).



**Fig. 4.5.** Analysis of the chromosome-length polymorphisms between isolates of the S- and L- biotypes of *Crinipellis pernicioso* from South America. Figure 4.5A shows the chromosome-length polymorphisms between isolates of the S- and L-Biotypes of the *Crinipellis pernicioso* species complex together with reference karyotype CG1. Sizes correspond to the relative migration of the three large chromosomes of *Schizosaccharomyces pombe* (strain 972h, Bio-Rad). Figure 4.5B shows examples of the Southern hybridization of the gels shown in Figures 4.4A, 4.4D and 4.5A with the two probes tested. ITS: probe consisting of the ITS-amplified region of the rRNA locus of reference isolates C01. RT: probe consisting of a PCR-amplified insert of a genomic clone from isolate C01 showing high sequence similarity (BLASTx, E value 9E-13) to a Reverse Transcriptase- RNase H Integrase of *Tricholoma matsutake* (GenBank accession no. [AY661428](#)). Isolate designations are as in Table 4.1. Results of all hybridization experiments are summarized in Table 4.2.

**Table 4.2.** Estimated sizes and number of chromosomes of the 38 isolates examined of the *Crinipellis perniciosus* species complex. The chromosomal bands were numbered arbitrarily according to size in decreasing order.

<b>Chromosomal Bands: S (n)</b>													
Biotype	Isolate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	M. size	T.N.C.	T. size
C Bahia	CG1†	5.2 (1)* <u>4.6 (1)</u> *3.9 (2)*3.6 (1)*3.3 (1)*3.0 (1)* 2.8 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	26.4	8	30.3
	CG2‡	<u>5.3 (1)</u> *4.7 (1)*4.2 (1)*3.6 (1)*3.5 (1)*3.3 (1)*3.1 (1)* 2.7 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	30.4	8	30.4
	C08	5.2 (1)* <u>4.6 (1)</u> * <b>4.5 (1)</b> *3.9 (2)*3.6 (1)*3.3 (1)*3.0 (1)* 2.8 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	30.9	9	34.8
	C15	5.2 (1)* <u>4.6 (1)</u> *3.9 (2)*3.6 (1)* <b>3.2 (1)</b> *3.0 (1)* 2.8 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	26.3	8	30.2
C Amazon	C19	<u>5.0 (2)</u> *4.1 (1)*3.8 (2)*3.4 (1)*3.0 (2)*	-	-	-	-	-	-	-	-	19.3	8	31.1
	C20	5.5 (1)* <u>4.9 (1)</u> *4.1 (1)*3.6 (2)*3.3 (1)*3.0 (1)* 2.8 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	27.2	8	30.8
	C21	5.4 (2)* <u>4.5 (1)</u> *4.1 (1)*3.7 (2)*3.4 (1)*3.1 (1)* 2.9 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	27.1	9	36.2
	C22	5.5 (1)* <u>4.9 (2)</u> *4.0 (1)*3.6 (2)*3.4 (1)*3.1 (1)* 2.9 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	27.4	9	35.9
	C23	5.5 (1)* <u>5.0 (2)</u> *4.1 (1)*3.8 (2)*3.5 (1)*3.1 (1)* 2.9 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	27.9	9	36.7
	C24	5.3 (2)* <u>4.6 (1)</u> *4.1 (1)*3.8 (2)*3.4 (1)*3.1 (2)*	-	-	-	-	-	-	-	-	24.3	9	36.5
	C25	5.2 (2)*4.6 (1)* <u>3.8 (2)</u> *3.5 (1)*3.0 (1)*2.9 (1)* 2.7 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	25.7	9	34.7
	C26	5.2 (2)* <u>4.6 (1)</u> *3.9 (1)*3.7 (2)*3.3 (1)*2.8 (1)*2.6 (1)*	-	-	-	-	-	-	-	-	26.1	9	35.0
C27	5.2 (2)* <u>4.6 (1)</u> *3.9 (1)*3.8 (2)*3.6 (1)*3.3 (1)*2.9 (1)* 2.7 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	30.0	10	39.0	
S	S01	5.3 (1)* <u>4.8 (2)</u> *4.2 (1)*3.6 (2)*3.2 (2)*2.8 (2)*	-	-	-	-	-	-	-	-	23.9	10	38.8
	S02	<u>4.9 (2)</u> *4.6 (1)*4.1 (2)*3.5 (1)*3.2 (1)*2.8 (1)*2.7 (1)*	-	-	-	-	-	-	-	-	25.8	9	34.8
	S03	<u>5.0 (2)</u> *4.3 (1)*3.6 (2)*3.2 (1)*2.9 (1)*2.8 (1)*	-	-	-	-	-	-	-	-	21.8	8	30.4
	S04	5.3 (1)* <u>4.9 (2)</u> *4.1 (1)*3.9 (2)*3.7 (1)*3.5 (1)*3.3 (1)*3.0 (1)*2.8 (2)*	-	-	-	-	-	-	-	-	34.5	12	46.1
L	L01	<u>5.1 (1)</u> *4.8 (2)*4.1 (1)*3.5 (1)*3.3 (1)*3.1 (1)*3.0 (1)*2.6 (1)*	-	-	-	-	-	-	-	-	29.5	9	34.3
	L02	<u>4.9 (2)</u> *4.1 (1)*3.5 (2)*3.3 (1)*3.1 (1)*2.8 (1)*	-	-	-	-	-	-	-	-	21.7	8	30.1
	L03	<u>4.9 (2)</u> *4.5 (1)*4.0 (2)*3.7 (1)*3.3 (2)*3.0 (2)*	-	-	-	-	-	-	-	-	23.4	10	38.6
	L04	<u>5.2 (1)</u> *4.8 (2)*4.4 (1)*4.0 (1)*3.8 (2)*3.6 (1)*3.3 (1)*3.0 (1)*	-	-	-	-	-	-	-	-	32.1	10	40.7
	L05	5.2 (1)* <u>4.8 (2)</u> *4.4 (1)*3.9 (2)*3.6 (1)*3.3 (1)*2.7 (1)*2.4 (1)*	-	-	-	-	-	-	-	-	30.1	10	39.0
	L06	<u>5.3 (1)</u> *4.8 (2)* <u>4.3 (1)</u> *3.9 (2)*3.6 (1)* 3.1 (1) 2.7 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	27.7	9	36.4
	L07	5.2 (1)* <u>4.8 (2)</u> *4.1 (2)*3.5 (1)*3.2 (1)*3.0 (1)*	-	-	-	-	-	-	-	-	23.8	8	32.7

† CG1 refers to all C-biotype isolates from Bahia that exhibit the karyotype CG1: C01, C02, C03, C04, C09, C11, C14, and C17. ‡CG2 refers to all C-biotype isolates from Bahia that exhibit the karyotype CG2: C05, C06, C07, C10, C12, C13, C16, and C18. **S**, approximate size of the band expressed in Mb; **(n)**, relative number of chromosomes per band as detected by the densitometric analysis. **M. Size**, minimal genome size. **T.N.C.**, total number of chromosomes. **T. Size**, total genome size. The rDNA genes are located on double-underlined chromosomal bands. \*Chromosomes marked by the RT probe. Chromosomes in bold indicate differences between the C08 and C15 karyotypes in relation to the CG1 karyotype.

The probe containing a sequence similar to a Reverse Transcriptase-RNase H integrase (RT) hybridized to most bands of every isolate examined with the exception of the smaller bands in some isolates (Figure 4.5B, Table 4.2). This result suggests that retrotransposons are widespread throughout the genome of all isolates examined.

#### 4.4. DISCUSSION

In this study, we report genetic and chromosomal-level variability of isolates within and among three different biotypes of the *Crinipellis pernicioso* species complex, collected from different geographic locations. This constitutes one of the most comprehensive studies reported to date for this species with regards to the number of isolates from different basidiomes, geographic distance between collection points for the various isolates, and number of different biotypes examined. We also present for the first time the electrophoretic karyotypes of S- and L-biotypes of *C. pernicioso*. This study is the first in a series of reports that will attempt to form a cohesive understanding of genetic variability found in the various biotypes of this fungal pathogen, which will be used to formulate how the variability affects the pathogen-host interaction as well as disease development.

RAPD fingerprinting by Andebrhan *et al.* (ANDEBRHAN *et al.*, 1999) of isolates collected at the beginning of the WBD outbreak in Bahia, suggested that there had been two discrete introductions of the pathogen (i.e. two independent genotypes), a hypothesis that correlates with the presence of only two different karyotypes among more recently collected samples (RINCONES *et al.*, 2003) and only two populations detected in Bahia through AFLP analysis (PLOETZ *et al.*, 2005). This evidence clearly shows the stability of the C- genotypes in Bahia, which have remained almost unchanged from the time of their introduction. Due to this natural genetic stability of the clonal populations of the C- and S- biotypes and their non-outcrossing reproductive strategy, it is possible to supplement the genetic variability analysis with chromosomal analysis via electrophoretic karyotyping.



With a single exception, all C-biotype isolates collected in Southeastern Bahia-Brazil (C01 to C18) possessed 8 chromosomes and a total genome size of approximately 30 Mb; only one isolate (C08) possessed 9 chromosomes with an estimated total genome size of 34.8 Mb. In fact, C-biotype isolates collected in this region were very homogeneous in their karyotypes, with eight isolates presenting karyotype CG1 and another eight isolates presenting karyotype CG2 (Table 4.2). These two karyotypes are identical to those previously reported in Bahia, comprising only four isolates that were included in this work (RINCONES *et al.*, 2003) and these two chromosomal groups (CG1 and CG2) are supported by the microsatellite primer, TeloA1R, which separated all of the C-biotype isolates from Bahia into two groups that were identical to the chromosomal groups. The two additional karyotypes for this region represented by isolates C08 and C15 are remarkably similar to karyotype CG1. C15 differs from CG1 in the size of the fifth band, which appears slightly smaller, while isolate C08 differs from CG1 with an additional band of approximately 4.5 Mb. Furthermore, polymorphisms associated with the hybridization of the rDNA between these four karyotypes from Bahia lends support to the CG1 origin of C08 and C15. The data showed that this marker hybridized to the second largest chromosome (4.6 Mb) in karyotypes CG1, C08 and C15 and the largest chromosomal band (5.3 Mb) in the CG2 karyotype (Figure 4.5B, Table 4.2). These apparent subgroups of CG1 could not be detected by any of the microsatellite markers tested, which shows the limitation of PCR based analysis, especially in the detection of chromosomal rearrangements that can only be revealed by pulsed-field gel electrophoresis.

These subgroups of CG1 are possibly the result of very recent differentiation events and the chromosomal differences between isolates C08 and C15 in comparison to CG1 are subtle and could have arisen from the CG1 karyotype in a single event: either a deletion or a translocation of a portion of the fifth chromosome in the case of isolate C15; and a duplication in the case of isolate C08. It is also probable that band 2 of the CG1 karyotype represents two chromosomes, and a small portion of one of these chromosomes was translocated, thus generating two different sized chromosomes in isolate C08. The

densitometric analysis of isolate C08, which shows bands 2 and 3 are less intense than bands 1 and 4 (Figure 4.4C), supports this latter hypothesis and suggests that the CG1 karyotype could have doublets at chromosomes 1, 2, and 3. This would increase the total genome size of the CG1 isolates to 40.1 and the total number of chromosomes to 10. Although this is a large increase in relation to the size reported previously, the total genome size determined by the Feulgen staining technique would support such an increase ( $32.98 \pm 7.94$  Mb) (RINCONES *et al.*, 2003). Furthermore, bioinformatic analyses of the shotgun assemblies have generated a 37 Mb estimation of the total genome size (unpublished data), which also supports the hypothesis of a larger genome.

The microsatellite analysis of the nine C-biotype isolates collected in the Brazilian Amazon region (C19 to C27, Table 4.2) with the PCR primer TeloA1R separated all of them into discrete groups which corresponds to chromosomal variability except for isolates C20, C22 and C23 (Figure 4.3A and Figure 4.4D).

Karyotypes for the C-biotype Amazon isolates differed among each other with respect to the number of chromosomes, sizes, and total genome size. These isolates presented from 8 to 10 chromosomes and their total genome sizes varied from 30.8 to 39 Mb (Table 4.2). The ITS probe hybridized in most cases to band 2, with the exceptions of isolate C19, in which the ITS probe hybridized to the largest chromosome, and isolate C25, in which the rDNA chromosome was located on band 3 (Figure 4.5B, Table 4.2). The size of the rDNA chromosome for the Amazonian C-biotype isolates varied considerably more, from 3.8 and 5.0 Mb, in comparison to the Bahia isolates in which the size of the rDNA chromosome was either 4.6 or 5.3 Mb. This variation in the size of the rDNA chromosome may be involved with unequal crossing over events that would accumulate over time and would result in alterations that persist in new clonal populations. The isolates C20, C22 and C23, which were grouped together by the TeloA1R primer, are from the same state and two of the isolates are from locations in close proximity, suggesting that the similarity observed could have been derived from a common ancestor. This situation agrees with the findings of PLOETZ *et al.* (2005), who identified genetic homogeneity in the isolates of specific geographic regions. In agreement

with this possibility, we detected only slight chromosome variations (Figure 4.4D) among these isolates, and this could be a situation analogous to the subgroups of CG1 found in Bahia. If so, this could suggest that chromosomal rearrangements are the first step in population differentiation. Reproduction of the *C. perniciosus* species complex is strictly sexual via meiosis within basidia (DELGADO e COOK, 1976; GRIFFITH e HEDGER, 1994a) and in agreement with the meiotic maintenance hypothesis proposed by Kistler and Miao (KISTLER e MIAO, 1992), in Bahia, where the fungus has been established for at least 15 years, only a very low chromosomal variation (chromosomal length polymorphisms – CPL) could be detected. Although the meiotic maintenance hypothesis is supported by observations in several fungal species (KISTLER e MIAO, 1992; ZOLAN, 1995; PÖGGELER *et al.*, 2000) there are reports of sexually reproducing fungi, such as *Coprinus cinereus* (ZOLAN *et al.*, 1994), *Septoria tritici* (MCDONALD e MARTINEZ, 1991), *Leptosphaeria maculans* (PLUMMER e HOWLETT, 1993), *Ophiostoma ulmi* (DEWAR e BERNIER, 1995), and *Pythium sylvaticum* (MARTIN, 1995), with extensive CLPs that are generated and maintained through meiotic processes without apparent reduction in fertility. The C- and S-biotypes exhibit primary homothallism (non-outcrossing) and any polymorphisms that arise could in principle be perpetuated by autofertilization, which could explain the origin of C08 and C15. If so, further analysis of isolates from Bahia may reveal additional subgroups that have originated from this process.

In addition to the TeloA1R microsatellite primer that correlates with chromosomal variation, a C-biotype specific PCR primer (TeloC1) was found (Figure 4.3C). Data derived from this primer shows that the C- S- and L- biotypes appear to be distinct groups within the species complex, thus reinforcing the differentiation into the various biotypes.

All four of the S-biotype isolates and the seven L-biotype isolates examined revealed distinctly different microsatellite groups and karyotypes. (Figures 4.3B, 4.3C and 4.5A, Table 4.2). The S-biotype showed the most variations, with karyotypes that exhibited between 8 and 12 chromosomes and their total genome sizes varied from 30.4 to 46.1 Mb. In the case of the L-biotype,

the karyotypes were between 8 and 10 chromosomes and genome sizes ranged from 30.1 and 40.7 Mb. Except for the presence of bands smaller than 2.7 Mb in some isolates of the L-biotype, no significant differences were observed between the karyotypes of the three biotypes that would allow a general correlation of karyotype with host specificity. However, the limited chromosomal-level genetic variability observed in the C-biotype isolates from Bahia in comparison to C-biotype isolates from the Amazon and to the S-biotype isolates found in the neighboring state of Minas Gerais, Brazil support the hypothesis that C-biotypes were introduced into Bahia from the Amazon region (ANDEBRHAN *et al.*, 1999).

Southern hybridization of the CHEF gels blots for the S-biotype revealed that the ITS probe hybridized to the first or second largest band, but the size of this band varied only from 4.8 to 5.0 Mb among the four isolates (Figure 4.5B, Table 4.2). The situation was very similar in the L-biotype, with the rDNA chromosomes varying only from 4.8 to 5.2 Mb in size, with a single remarkable exception, isolate L6, in which the ITS probe hybridized to bands 1 and 3 (5.3 and 4.3 Mb, respectively). Isolate L6 was the only one of the 38 isolates examined that exhibited two rDNA chromosomes (Figure 4.5B, Table 4.2). This situation could have arisen from a duplication of part of the rDNA chromosome; however, our data is too limited to allow any conclusions on this matter. Polymorphism in the rDNA chromosome has been reported in numerous species of fungi and may be produced by a number of mechanisms (ZOLAN, 1995). CLPs among L-biotype isolates were detected even between isolates collected only a few meters apart. These isolates belonged to different somatic compatibility groups but may have been related as evidenced by shared mating type factors, as was the case with isolates L6 and L7 collected from the same vine in Bosque Viejo, Pichilingue Province, Ecuador, which shared two mating type factors (A9 and B10) and thus may have been sib-related (GRIFFITH e HEDGER, 1994b). A comparison of the karyotypes of the parental isolate L1 and its monokaryotic progeny L7 shows that some of the bands from the parental isolate (L1) are conserved but different-sized bands arise in the progeny (L7: Bands 1, 3 and 5; Figure 4.5A, Table 4.2).

The Southern hybridization of the CHEF gel blots to a genomic probe showing high sequence similarity to a reverse transcriptase from C01 marked most of the chromosomal bands of all the isolates analyzed (Figure 4.5B, Table 4.2). In addition, preliminary gene expression analysis of this same clone through DNA microarray technology suggests that the presence of cocoa extracts activate these genes (Maricene Sabha, pers. com.), and this could be a mechanism for introducing genetic variation, given the fact that this fungus must undergo meiosis in order to produce basidiospores (DELGADO e COOK, 1976; EVANS, 1980). The role of transposable elements in the reorganization of a fungal genome through ectopic recombination or simply by their activation has already been reported in several fungal species, such as *Fusarium oxysporum* (DAVIÈRE *et al.*, 2001), *Magnaporthe grisea* (DOBINSON *et al.*, 1993), *Schizosaccharomyces pombe* (LEVIN *et al.*, 1990), *Saccharomyces cerevisiae* (BOEKE, 1989), and *Neurospora crassa* (KINSEY e HELBER, 1989). A similar mechanism might be at work in *C. pernicioso* and several families of transposable elements have already been detected in the genome of this phytopathogen (PEREIRA *et al.*, 2003; ARAUJO *et al.*, 2004).

This study shows that genetic variation between isolates within a given biotype and between biotypes can be determined with microsatellite based PCR combined with chromosomal analysis. Further studies of additional isolates of this pathogen, along with detailed mapping of locations and hosts from Bahia and from the entire Amazon region would allow for a more complete genetic variability evaluation of the fungus. Future studies are now needed to utilize this information along with pathogenicity data to develop an overall picture of how genetic variability within this species complex affects the pathogen-host interaction.

Furthermore, our results suggest that the chromosomal rearrangements observed in *C. pernicioso* are generated through meiotic processes, which may involve the presence of multiple copies of retrotransposons. Therefore, it is important that isolates comprising as many C-biotype genetic variability groups/karyotypes as possible should be taken into consideration when assessing resistance of cacao clones. Our results indicate the fragility of the current breeding

program being conducted in Brazil. All cacao clones selected have been challenged against only the two main genotypes of *C. pernicioso* present in Bahia, which may be a very limited strategy that would render the culture very susceptible to new introductions from the Amazon. Therefore, it is imperative that a new concept for this program be considered and that phytosanitary measures are strengthened in order to prevent the entrance of new C-biotype isolates into Bahia, thus possibly extending the time for resistance break down (BARTLEY, 1986) of the newly-planted resistant cacao clones.

#### 4.5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Maricília Arruda and Karina Gramacho for providing isolates used in this study, to Maricene Sabha for the use of unpublished data, to Eduardo Formighieri for bioinformatics support, and for the ongoing corporate support given by Fazenda Almirante Cacao (Mars Inc.) and Cargill. This work was supported by FAPESP (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*, No. 00/10545-4) CNPq (*Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento*, No. 68.0032/01-0; 47.1609/03-0) and SEAGRI (*Secretaria de Agricultura do Estado da Bahia*).

#### 4.6. LITERATURE CITED

- ANDEBRHAN, T., FIGUEIRA, A., YAMADA, M. M., CASCARDO, J., FURTEK, D. B. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, v.105, n.2, p.167-175, 1999.
- ANDEBRHAN, T., FURTEK, D. B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* isolates from different hosts. *Plant Pathology*, v.43, n.6, p.1020-1027, 1994.
- ARAUJO, E. F., CASCARDO, J., CARAZZOLLE, M., PEREIRA, G. A. G., QUEIROZ, M. V. Boto, um elemento transponível putativo da classe II em *Crinipellis pernicioso*. Análise e distribuição em diferentes biótipos e

- regiões geográficas. In: *XXIV Reunião de Genética de Microrganismos, 2004, Gramado, Rio Grande do Sul*. In: Anais da XXIV Reunião de Genética de Microrganismos, 2004, Porto Alegre: Universidade Federal de Rio Grande do Sul, 2004, 2004. p.125-125.
- ARRUDA, M. C. C., MILLER, R. N. G., FERREIRA, M. A. S. V., FELIPE, M. S. S. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. *Plant Pathology*, v.52, n.2, p.236-244, 2003.
- BARTLEY, B. G. D. *Breeding for durable resistance in perennial crops*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1986. Cacao, *Theobroma cacao*, p.25-42.
- BOEKE, J. D. *Mobile DNA*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. Transposable elements in *Saccharomyces cerevisiae*, p.335-374.
- DAVIÈRE, J. M., LANGIN, T., DABOUSSI, M. J. Potential role of transposable elements in the rapid reorganization of the *Fusarium oxysporum* genome. *Fungal Genetics and Biology*, v.34, n.3, p.177-192, 2001.
- DELGADO, J. C., COOK, A. A. Nuclear condition of basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius perniciosus*. *Canadian Journal of Botany*, v.54, n.1, p.66-72, 1976.
- DEWAR, K., BERNIER, L. Inheritance of chromosomes-length polymorphisms in *Ophiostoma ulmi (sensu lato)*. *Current Genetics*, v.27, n.6, p.541-549, 1995.
- DOBINSON, K. F., HARRIS, R. E., HAMER, J. E. Grasshopper, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.6, n.1, p.114-126, 1993.
- EVANS, H. C. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador. I. The fungus. *Annals of Applied Biology*, v.89, n.1, p.186-192, 1978.

- EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' broom disease of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*, v.74, n.6, p.515-526, 1980.
- GRIFFITH, G. W. *Population structure of the cocoa pathogen Crinipellis pernicioso (Stahel) Sing. Unpublished PhD Thesis*. Aberystwyth, Wales: University of Wales, Aberystwyth, UK., 1989.
- GRIFFITH, G. W., HEDGER, J. N. Dual culture of *Crinipellis pernicioso* and potato callus. *European Journal of Plant Pathology*, v.100, n.6, p.371-379, 1994c.
- GRIFFITH, G. W., HEDGER, J. N. Spatial distribution of mycelia of the liana (L-) biotype of the agaric *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer in tropical forest. *New Phytologist*, v.127, p.243-259, 1994b.
- GRIFFITH, G. W., HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicioso*. *Heredity*, v.72, p.278-289, 1994a.
- GRIFFITH, G. W., NICHOLSON, J. N., NENNINGER, A., BIRCH, R. N., HEDGER, J. N. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany*, v.41, p.423-435, 2003.
- HEDGER, J. N., PICKERING, V., ARAGUNDI, J. A. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*). *Transactions of the British Mycological Society*, v.88, p.533-546, 1987.
- KINSEY, J. A., HELBER, J. Isolation of a transposable element from *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, v.86, n.6, p.1929-1933, 1989.
- KISTLER, H. C., MIAO, V. P. W. New modes of genetic change in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*, v.30, n.1, p.131-152, 1992.
- LEVIN, H. L., WEAVER, D. C., BOEKE, J. D. Two related families of retrotransposons from *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, v.10, n.12, p.6791-6798, 1990.



- MARTIN, F. Meiotic instability of *Pythium sylvaticum* as demonstrated by inheritance of nuclear markers and karyotype analysis. *Genetics*, v.139, n.3, p.1233-1246, 1995.
- MCDONALD, B. A., MARTINEZ, J. P. Chromosome length polymorphisms in a *Septoria tritici* population. *Current Genetics*, v.19, n.3, p.265-271, 1991.
- MEINHARDT, L. W., WULF, N. A., BELLATO, C. M., TSAI, S. M. Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, n.3, p.211-215, 2002b.
- MEINHARDT, L. W., WULF, N. A., BELLATO, C. M., TSAI, S. M. Genetic analyses of *Rhizoctonia solani* isolates from *Phaseolus vulgaris* grown in the Atlantic Rainforest region of São Paulo, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.27, n.3, p.259-267, 2002a.
- PEREIRA, J. F. I., ARAUJO, E. F., CASCARDO, J., CARAZZOLE, M., PEREIRA, G. A. G., QUEIROZ, M. V. Análise de sequências putativas de transcriptase reversa em *Crinipellis pernicioso*. In: 49º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 2003, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2003. p.1156-1156.
- PEREIRA, J. L., DE ALMEIDA, L. C., SANTOS, S. M. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. *Crop Protection*, v.15, p.743-752, 1996.
- PLOETZ, R. C., SCHNELL, R. J., YING, Z., ZHENG, Q., OLANO, C. T., MOTAMAYOR, J. C., JOHNSON, E. S. Analysis of molecular diversity in *Crinipellis pernicioso* with AFLP markers. *European Journal of Plant Pathology*, v.111, n.4, p.317-326, 2005.
- PLUMMER, K. L., HOWLETT, B. J. Major chromosomal length polymorphisms are evident after meiosis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics*, v.24, n.1-2, p.107-113, 1993.

- PÖGGELER, S., MASLOFF, S., KÜCK, U. Karyotype polymorphism correlates with intraspecific infertility in the homothallic ascomycete *Sordaria macrospora*. *Journal of Evolutionary Biology*, v.13, p.281-289, 2000.
- PURDY, L. H., SCHMIDT, R. A. Status of cacao Witches' broom: biology, epidemiology and management. *Annual Review of Phytopathology*, v.34, n.1, p.573-594, 1996.
- RESENDE, M. L. V., GUTEMBERG, B. A. N., SILVA, L. H. C. P., NIELLA, G. R., CARVALHO, G. A., SANTIAGO, D. V. R., BEZERRA, J. L. *Crinipellis pernicios*a proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patogênico a *T. cacao*. *Fitopatologia Brasileira*, v.25, n.1, p.88-91, 2000.
- RINCONES, J., MEINHARDT, L. W., VIDAL, B. C., PEREIRA, G. A. G. Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicios*a, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycological Research*, v.107, n.4, p.452-458, 2003.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 1st.ed., San Diego: Academic Press. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p.315-322.
- ZOLAN, M. E. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiological Reviews*, v.59, n.4, p.686-698, 1995.
- ZOLAN, M. E., HEYLER, N. K., YEAGER-STASSEN, N. Inheritance of chromosome-length polymorphisms in *Coprinus cinereus*. *Genetics*, v.137, n.1, p.87-94, 1994.

## **5. CAPÍTULO 3:**

### **IDENTIFICAÇÃO DE GENES EXPRESSOS NOS MICÉLIOS BIOTRÓFICO E SAPROTRÓFICO DO FUNGO CAUSADOR DA VASSOURA-DE-BRUXA, *CRINIPPELLIS PERNICIOSA***

Johana Rincones, Marcelo F. Carazzolle, Bruno V. Oliveira, Eduardo Formighieri,  
Jorge Mondego, Ricardo A. Azevedo, Robson Dias, Julio Cascardo, Lyndel W.  
Meinhardt, and Gonçalo A.G. Pereira

(Manuscrito em Preparação)

## **IDENTIFICAÇÃO DE GENES EXPRESSOS NOS MICÉLIOS BIOTRÓFICO E SAPROTRÓFICO DO FUNGO CAUSADOR DA VASSOURA-DE-BRUXA, *CRINIPELLIS PERNICIOSA***

Como o intuito de obter um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade de *C. pernicioso* durante sua interação com o cacau, realizamos uma análise de ESTs a partir de bibliotecas de cDNA obtidas dos micélios biotrófico e saprotrófico do fungo. Foram obtidas três bibliotecas não normalizadas e enriquecidas com transcritos completos: micélio saprotrófico crescido em glicose e em extrato de cacau e micélio biotrófico induzido com extrato de cacau. Adicionalmente, aplicamos a estratégia de hibridação subtrativa por supressão para obter uma biblioteca subtrativa enriquecida com genes induzidos pela presença de extratos do hospedeiro no micélio saprotrófico. 3650 reads de boa qualidade provenientes das quatro bibliotecas foram clusterizados produzindo 1427 unigenes. 534 destes unigenes (36%) mostraram similaridade significativa ( $E\text{-value} \leq 1E-05$ ) com seqüências de proteínas nas bases de dados públicas. Os genes do micélio saprotrófico induzidos pelo hospedeiro estavam principalmente envolvidos em processos como a fosforilação oxidativa e produção/degradação de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de toxinas com propriedades antifúngicas e enzimas envolvidas na degradação de lignina. A análise dos genes expressos no micélio biotrófico também revelou a presença de vários relacionados à produção de EROs, genes indicativos de uma condição de baixa concentração de aminoácidos no meio de cultura (numerosas tRNA ligases e sintetases) e genes com similaridade a proteínas envolvidas na resposta hipersensitiva em plantas (RH), tais como proibitinas e estomatinas. Adicionalmente, numerosas proteases e peptidases foram expressas no micélio biotrófico, as quais poderiam estar envolvidas na defesa do patógeno contra o sistema de defesa da planta. A expressão diferencial de genes selecionados foi confirmada por ensaios tipo northern blot e northern reverso. Estes resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos moleculares que governam a interação planta-patógeno na VB e têm auxiliado na identificação de possíveis alvos para o desenho de drogas.

## 5.1. INTRODUÇÃO

*Crinipellis pernicioso* (*Agaricales, Tricholomataceae*) é o agente etiológico da VB do cacau (*Theobroma cacao*). Desde a primeira ocorrência registrada no Equador em 1894, a doença tem se espalhado a todas as plantações de cacau da América e das ilhas do Caribe causando severas perdas econômicas (PEREIRA *et al.*, 1996; PURDY e SCHMIDT, 1996; GRIFFITH *et al.*, 2003). Os efeitos da doença têm sido especialmente severos na região produtora do sudeste da Bahia, Brasil, onde as plantações foram abandonadas ou substituídas por outras culturas, como pastagens e café. Esta substituição trouxe como consequência a destruição dos resquícios de Mata Atlântica que conviviam com as culturas de cacau, além de constituir o mais grave problema socioeconômico da região. A doença VB foi detectada pela primeira vez no sudeste da Bahia em 1989 (PEREIRA *et al.*, 1989). Em apenas uma década, o Brasil passou do segundo maior produtor mundial de cacau para o quinto, sua produção anual caiu para a metade e atualmente deve recorrer à importação de cacau para suprir sua demanda interna (BRAZILIAN MINISTRY OF AGRICULTURE, 2002).

Diversas estratégias de controle para a doença (químicas, fitossanitárias e biológicas) têm sido aplicadas no Estado da Bahia, mas a maioria têm se mostrado inviáveis nas atuais condições de baixa produtividade e baixo valor do produto (PEREIRA *et al.*, 1996; PURDY e SCHMIDT, 1996). Atualmente, muitos esforços estão sendo dirigidos a programas de melhoramento genético do cacau, evidenciado pela existência de um programa de enriquecimento de germoplasma de cacau que agrupa diversos atores a nível mundial (ESKES *et al.*, 2000). Na Bahia, diversos clones resistentes à VB têm sido selecionados por inspeção visual em plantações infectadas e estão sendo clonados e distribuídos para os produtores locais (PIRES e LUZ, 1995). Desafortunadamente, a resistência destes clones parece ser determinada por um número limitado de genes dominantes (SILVA *et al.*, 2001). Esta situação é bastante precária tendo em vista que a quebra de resistência pelo patógeno já foi demonstrada no Equador, onde clones resistentes de cacau viraram susceptíveis após algumas gerações do fungo (BARTLEY, 1986). Assim, desenvolvimento de estratégias de

controle alternativas para esta doença constitui uma prioridade para a cacauicultura Bahiana.

A biologia da interação *Crinipellis*-Cacao é extremamente complexa e tem sido pouco estudada do ponto de vista molecular. O fungo *C. perniciosa* exibe um ciclo de vida hemibiotrófico que acompanha os sintomas na planta: os esporos germinam e formam um micélio monocariótico e biotrófico que infecta os tecidos meristemáticos do cacauzeiro, como brotos, frutos em desenvolvimento e almofadas florais, causando inchaço e crescimento anormal do tecido afetado que forma as vassouras verdes características. Durante o segundo estágio, o fungo apresenta um micélio dicariótico e saprotrófico que causa a necrose do tecido infectado, formando assim as vassouras secas. Sobre as vassouras secas são formados os basidiomas que dispersam cada vez mais a doença (EVANS, 1980). Desconhece-se o evento molecular que causa a mudança da fase biotrófica para a necrotrófica e se a morte do tecido infectado é causa ou consequência desta mudança na fisiologia do micélio.

Um estudo a nível bioquímico da interação Cacao-*C. perniciosa* foi recentemente publicado por nosso grupo e teve o intuito de realizar uma análise sistemática das mudanças que ocorrem no cacauzeiro ao nível de diversos parâmetros bioquímicos durante a progressão da doença. O objetivo final do trabalho foi correlacionar estas mudanças com os sintomas da doença e possivelmente também com as mudanças fisiológicas do fungo (SCARPARI *et al.*, 2005). Assim, os autores analisaram o conteúdo de açúcares solúveis, aminoácidos, alcaloides, etileno, compostos fenólicos, taninos, flavonoides, pigmentos, malondialdeído (MDA), glicerol e ácidos graxos em brotos de cacau durante o desenvolvimentos da doença. Entre os numerosos resultados os autores estabeleceram que o tecido infectado mostra alterações bioquímicas coordenadas que indicam uma forte resposta a estresse que parece estar modulada pela produção de etileno, indicando assim que os níveis de etileno podem ter um papel essencial no desenvolvimento das vassouras. Adicionalmente, eles mostraram que as vassouras verdes possuem quantidades significativamente maiores de glicerol quando comparadas aos tecidos saudáveis, indicando assim que este composto pode ter um papel essencial na manutenção da fase biotrófica do fungo.

De fato, recentemente foi estabelecido por nosso grupo que o uso de glicerol como única fonte de carbono em meio definido é capaz de manter o crescimento de um micélio com características de biotrófico sob condições de laboratório; este micélio muda rapidamente à fase saprotrófica quando qualquer outra fonte de carbono é utilizada no meio de crescimento (MEINHARDT *et al.*, 2006). Estes estudos têm mostrado a grande complexidade das interações bioquímicas que ocorrem entre a planta e o patógeno durante o desenvolvimento da VB, mas ainda permanece sem resposta a pergunta sobre como o fungo causa o modula as respostas observadas na planta.

Análises em larga escala da expressão gênica durante a interação planta-fungo constitui a próxima etapa a ser abordada na obtenção de novos conhecimentos sobre os eventos moleculares que governam o estabelecimento da VB no cacauero. A hibridação subtrativa por supressão (SSH) (DIATCHENKO *et al.*, 1996) constitui uma técnica poderosa que permite a construção de bibliotecas de cDNA normalizadas e enriquecidas com genes que são expressos preferencialmente durante a interação planta-patógeno (BIRCH *et al.*, 1999; DELLAGI *et al.*, 2000; BIRCH e KAMOUN, 2000; XIONG *et al.*, 2001; GUILLEROUX e OSBOURN, 2004). Uma limitação desta metodologia é que gera fragmentos de cDNA pequenos que podem difíceis de analisar; assim, a análise de clones de cDNA de transcritos completos gerados diretamente a partir do RNA do tecido do fungo, sem normalizar, pode ser utilizado como uma estratégia complementar (QUTOB *et al.*, 2000; RAUYAREE *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2001a; SUGUI e DEISING, 2002; KRUGER *et al.*, 2002; KARLSSON *et al.*, 2003; GUILLEROUX e OSBOURN, 2004). No presente trabalho utilizamos uma combinação destas duas estratégias para investigar a expressão de genes do fungo durante os dois estágios principais do seu ciclo de vida: os micélios biotrófico e saprotrófico de *C. pernicioso* induzidos com extratos do hospedeiro, *Theobroma cacao*.

## 5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1. Isolados do Fungo e Condições de Crescimento

Foram utilizadas duas linhagens diferentes. Para o estudo inicial sobre o efeito do extrato de cacau sobre a expressão gênica do micélio saprotrófico de *C. pernicioso* e para manter consistência entre o projeto genoma e o estudo de ESTs, foi utilizada a linhagem do fungo CP02. Esta linhagem é um isolado da região cacauzeira de Barro Preto – Bahia, originado a partir de uma cultura monospórica. A segunda linhagem, BP10, foi utilizada para o estudo da fase biotrófica de *C. pernicioso*, já que não foi possível encontrar esporos da linhagem CP02, os quais resultam essenciais na obtenção do micélio biotrófico. Ambos os isolados apresentam patogenicidade a plantas suscetíveis de cacau, tendo sua patogenicidade confirmada a cada seis meses de manutenção em cultura sob condições de laboratório. Resultados de eletroforese em gel de campo pulsado (RINCONES *et al.*, 2003) revelaram que o tamanho do genoma do isolado CP02 é de aproximadamente 30 Mb com oito cromossomos que variam de 2,9 a 5,2 Mb em tamanho. O isolado BP10 é oriundo de Itapebi na região cacauzeira da Bahia e apresenta um cariótipo com 8 bandas cromossômicas variando de 2,8 a 5,2 Mb (RINCONES *et al.*, 2006). Cultivos destes dois isolados são mantidos constantemente no nosso laboratório em placas de meio Malte-Extrato de Levedura a 27° C.

Para a extração do RNA do micélio saprotrófico foram iniciadas 10 culturas do isolado CP02 de *C. pernicioso* (micélio saprotrófico) em meio sintético contendo 1% de glicose (0,6% KNO<sub>3</sub>, 0,052% KCl, 0,052% MgSO<sub>4</sub>, 0,152% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, traços de FeSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub>, 1% Dextrose e NaOH para ajustar o pH a 6,8) em incubadora a 27 °C e agitação a 250 rpm durante um período inicial de sete dias. Após os sete dias de crescimento, o meio de cultura foi trocado em cinco das culturas por mais meio sintético contendo 1% de glicose para gerar a população de RNA *driver* e nas restantes cinco culturas foi substituído por meio sintético contendo 1% extrato de cacau (fruto de cacau liofilizado e moído) em lugar da glicose para gerar a população de RNA *tester*. O extrato de cacau foi mantido dentro de uma membrana de diálise para evitar extrair RNA de cacau junto com o RNA do fungo. As culturas do fungo foram crescidas nos dois meios



durante cinco períodos de crescimento: 24 h, 48 h, 72 h, 6 dias e 8 dias mantendo as mesmas condições de temperatura e agitação. A extração de RNA total após vários períodos de crescimento garante a obtenção da maioria dos transcritos de curta duração (NEWMAN *et al.*, 1994; RINCONES *et al.*, 2006).

Para a construção da biblioteca de EST contendo transcritos de micélio biotrófico foi utilizada a linhagem BP10. Para a obtenção do micélio biotrófico, os esporos desta linhagem foram germinados sobre agar água e as colônias resultantes foram transferidas individualmente para meio de cultura líquido como descrito por MEINHARDT *et al.* (2006). As colônias cresceram durante 14 dias neste meio e foi verificada a ausência de grampos de conexão (característicos do micélio dicariótico da fase saprotrófica) durante todo o período. Após este período, foi adicionado mais meio de cultura suplementado com extrato de cacau proveniente de meristemas jovens (os quais são suscetíveis à infecção por *C. pernicioso*). O fungo assim induzido foi crescido durante 14 dias adicionais. O longo período de crescimento foi necessário para obter uma quantidade suficiente de micélio para a extração de RNA total. Como um controle, o micélio saprotrófico do isolado BP10 de *C. pernicioso* foi crescido nas mesmas condições descritas para o micélio biotrófico; o RNA total obtido a partir deste micélio saprotrófico foi utilizado nas confirmações por northern blot e northern reverso.

### **5.2.2. Extração de RNA e Construção de Bibliotecas de cDNA**

No caso do micélio saprotrófico do isolado CP02, após cada um dos períodos de crescimento, uma amostra de cada tipo (Glicose e Extrato de Cacau do micélio saprotrófico) foi processada lado a lado para extração de RNA total utilizando o kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) segundo as instruções do fabricante. A quantidade e qualidade do RNA foi constatada por espectrofotometria e em gel denaturante de 1,2% agarose na presença de formaldeído segundo protocolo padrão (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Após, foram misturadas em proporções equivalentes as amostras correspondentes aos diferentes tempos de crescimento para obter assim uma única amostra *driver* (micélio crescido na presença de glicose) e uma única amostra *tester* (micélio crescido na presença de cacau).

No caso dos micélios biotrófico e saprotrófico do isolado BP10, foi extraída uma única amostra de RNA total correspondente ao final do crescimento para cada tipo de micélio. Esta extração também seguiu o protocolo do kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Devido a que a extração de RNA total a partir deste kit produz quantidades limitadas de RNA, as populações correspondentes de cDNA foram sintetizadas utilizando o sistema BD SMART™ cDNA Synthesis Kit (BD Biosciences-Clontech™, USA, Palo Alto, CA). A técnica SMART é um sistema de amplificação da segunda fita do cDNA por PCR que permite a síntese de cDNA a partir de pequenas quantidades de RNA total utilizando PCR de Longa Distância (LD-PCR), evitando assim a extração prévia do mRNA. Para gerar as três populações diferentes de cDNA utilizamos apenas 1 µg de RNA total de cada população.

Para a obtenção da biblioteca subtrativa geramos duas populações de cDNA: micélio saprotrófico induzido com extrato de cacau (tester) e glicose (driver) utilizando o kit Super SMART™ cDNA synthesis kit (BD Biosciences). Os primers providos neste kit, os quais são utilizados para gerar as populações de cDNA, possuem o sítio de restrição para a enzima *RsaI* que é utilizada para remover os primers após a síntese de cDNA e, por reconhecer um sítio com apenas quatro pares de base, também pode cortar os transcritos maiores gerando assim seqüências menores com bordas abruptas que são capazes de ligar aos dois adaptadores diferentes utilizados nos passos subseqüentes do processo de hibridação subtrativa por supressão, segundo as instruções do kit BD Clontech™ PCR-Select™ Subtraction kit (BD Biosciences). Uma vez finalizado o protocolo de subtração, os produtos da PCR secundária foram inseridos no vetor plasmidial pGEM® T Easy (Promega Corporation, USA, Madison, WI), segundo instruções do fabricante, e transformados em bactérias competentes One-shot® *E. coli* DH10B™ (Invitrogen Corporation, USA, Carlsbad, CA) por eletroporação. Esta biblioteca subtrativa foi denominada **SAP-SUB**.

Para a construção das três bibliotecas de transcritos completos: 1) micélio saprotrófico (isolado CP02) induzido por extratos de cacau (**SAP-CAC**); micélio saprotrófico (isolado CP02) crescido em glicose (**SAP-GLI**); e 3) micélio biotrófico (isolado BP10) induzido com extratos de cacau (**BIO**), seguimos o protocolo do kit

BD Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit (BD Biosciences), no qual os primers utilizados para gerar as moléculas de cDNA por LD-PCR contêm sítios de restrição específicos para a enzima *Sfi*I, mas que são diferentes para as bordas 3' e 5' do cDNA, permitindo assim a clonagem direcionada dos transcritos no vetor plasmidial pDNR-LIB provido no kit. Uma vez clonados, os plasmídios foram transformados em bactérias competentes One-Shot® *E. coli* DH10B™ (Invitrogen) por eletroporação.

Colônias brancas resultantes das quatro bibliotecas construídas foram transferidas individualmente a microplacas de 96 poços e crescidas em meio de cultura permanente (Meio LB 0.5% NaCl contendo 10% Glicerol) e estocadas a -80° C. Os clones foram denominados utilizando o sistema ideado para o Projeto Genoma (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/servies/protocolos>), no qual são consideradas as seguintes informações: isolado do fungo, estratégia de geração da biblioteca, número da biblioteca e número da placa.

### 5.2.3. Seqüenciamento e Análise das seqüências

A extração do DNA plasmidial foi realizada em placas de 96 poços seguindo a técnica de lise alcalina (ENGBRECHT *et al.*, 1998). O seqüenciamento dos insertos contidos nos plasmídios seguiu o protocolo do kit DYEnamic ET Dye Terminator (Amersham Biosciences) baseado na técnica de Sanger (SANGER *et al.*, 1977). Foram utilizados 300 a 500 ng de DNA e 1 pmol/mL do *primer* universal M13 *Forward* para seqüenciar as bibliotecas **SAP-CAC**, **SAP-GLI** e **BIO** e o *primer* universal T7 para a biblioteca **SAP-SUB**. A temperatura de anelamento foi de 50 °C e foram utilizados 40 ciclos de PCR para completar a reação. Os produtos da reação de seqüenciamento foram fracionados e visualizados gerando cromatogramas em um seqüenciador capilar MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences). O seqüenciamento foi feito em colaboração com o Laboratório de Genômica e Expressão Gênica (UESC-DCB) com a ajuda de Robson Dias e sob a coordenação do Prof. Dr. Júlio Cascardo. O laboratório responsável pelo seqüenciamento fez a submissão *on-line* dos cromatogramas correspondentes as placas seqüenciadas ao servidor do laboratório de Bioinformática do LGE (UNICAMP) através do link presente na página do projeto (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>).

Uma vez feita a submissão de uma placa qualquer, os programas PHRED e PHRED2FASTA (EWING *et al.*, 1998) foram utilizados para extrair as seqüências e sua qualidade em formato fasta a partir dos cromatogramas. O programa CROSSMATCH (<http://www.phrap.org>) foi utilizado para mascarar as seqüências correspondentes a vetor, ribossomais e mitocondriais nos reads. Todos os ESTs submetidos foram comparados contra diferentes bases de dados utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997). A ferramenta BLASTn foi utilizada para procurar alinhamentos de nucleotídeos entre os ESTs e a base de dados do Projeto Genoma de *Crinipellis pernicioso*. Os resultados desta análise foram utilizados para validar as bibliotecas de ESTs por identidade com os dados do genoma de *C. pernicioso*. A ferramenta BLASTx foi utilizada para procurar similaridade entre a tradução a proteína (em seis possíveis quadros de leitura) dos ESTs contra os dados armazenados nas bases de dados públicas (NR em NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e contra uma base criada no Laboratório de Bioinformática do LGE (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>) contendo exclusivamente seqüências de fungos obtidas de diversas bases de dados, incluindo a base de dados COGEME consistindo de ESTs de organismos fitopatogênicos (<http://cogeme.ex.ac.uk>).

Três critérios foram utilizados para selecionar os reads a ser considerados para clusterização e anotação: 1) mais de 200 bp com qualidade acima de 20 designada pelo programa PHRED; 2) Similaridade com proteínas de outros organismos presentes nas bases de dados públicas utilizando a ferramenta BLASTx com um E-value  $\leq 1E-05$ ; e 3) Identidade na seqüência nucleotídica com o banco de dados do Projeto Genoma de *C. pernicioso* utilizando a ferramenta BLASTn com um E-value  $\leq 1E-10$ . A verificação de ao menos um critério significou na aceitação dos reads.

Uma vez selecionados os reads, foi realizada a trimagem e clusterização, a qual é importante para diminuir a quantidade de seqüências que foram analisadas e para organizar os reads num grupo menos redundante. Os reads foram primeiramente trimados, mascarando as seqüências de vetor com o programa CROSSMATCH, e seguidamente foram removidas as seqüências poli-A, poli-T, de vetor e ribossomais. Esta trimagem também eliminou artefatos de

montagem, seqüências de baixa qualidade e seqüências curtas (<100 bp) (TELLES e SILVA, 2001). Os reads selecionados após o processo de trimagem foram clusterizados, o que consiste em agrupar reads similares e produzir seqüências de consenso utilizando o programa de montagem CAP3 (HUANG e MADAN, 1999). Tanto os contigs (clusters com mais de um read) como os singlets (clusters de um único read) são considerados como clusters ou unigenes. Uma única clusterização foi feita considerando os reads das quatro bibliotecas. Todos os clusters gerados desta forma foram novamente comparados contra as bases de dados descritas anteriormente utilizando as ferramentas BLASTx e BLASTn. Adicionalmente, a ferramenta BLASTx também foi utilizada para comparar os clusters contra a base de dados do Gene Ontology Consortium (<http://www.geneontology.org>) com o intuito de obter uma categorização automática dos clusters. Os resultados da clusterização e as diversas comparações foram organizados numa tabela disponível *on-line* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/anotação>) como sementes a ser anotadas manualmente. Cada uma das sementes possui um link para a página de anotação.

O Processo Biológico foi selecionado de acordo com a categorização proposta pelo Gene Ontology (<http://www.geneontology.org>). Para àqueles unigenes nos quais não foi colocada automaticamente uma categorização pela comparação utilizando a ferramenta BLAST contra a base dados do Gene Ontology, foi selecionado um Processo Biológico manualmente se o unigene cumpria ao menos um dos seguintes critérios: 1) identidade de seqüência nucleotídica contra a base de dados do Projeto Genoma de *C. pernicioso* com E-value  $\leq 1E-10$ ; ou 2) similaridade na seqüência de aminoácidos resultante da tradução contra a base de dados de seqüências de fungos com E-value  $\leq 1E-05$ . Os clusters cumprindo ambos os critérios ou unicamente o critério 2 foram categorizados de acordo com o resultado de BLASTx. Os clusters cumprindo unicamente o critério 1 foram categorizados a partir da procura de ORFs (*Open Reading Frames*) com o programa ORF Finder e posterior comparação das ORFs encontradas com a base de dados NR utilizando a ferramenta BLASTp para identificação de domínios conservados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>). Caso não fosse encontrado nenhum domínio conservado, estes clusters foram

categorizados como “Processo Biológico Desconhecido”. Os clusters que não cumpriram nenhum dos critérios foram anotados como “No Hits” e permanecerão na base de dados de ESTs até que se comprove se pertencem a *C. pernicioso* mediante seqüenciamento ou sejam descartados como contaminantes.

Os resultados da clusterização e anotação foram organizados por biblioteca através do programa “Northern Eletrônico” criado por Marcelo Carazzolle do Laboratório de Bioinformática do LGE (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>). Este programa é um algoritmo que permite obter um perfil de transcrição *in silico* que contabiliza o número de ESTs seqüenciados de um mesmo unigene em relação ao número total de ESTs. Este tipo de estratégia tem sido empregada para outros organismos (AUDIC e CLAVERIC, 1997; OHLROGGE e BENNING, 2000; CLEGG *et al.*, 2002; RIBICHICH *et al.*, 2005). Este programa foi utilizado para identificar genes possivelmente induzidos pela presença de extratos de cacau baseado na freqüência relativa com a que aparecem nas bibliotecas não normalizadas. Assim, unigenes constituídos em sua maioria por reads provenientes da biblioteca SAP-CAC e confirmados por sua presença na biblioteca subtrativa Cacau menos Glicose (SAP-SUB) foram selecionados como fortes candidatos a apresentar expressão diferencial.

#### **5.2.4. Validação do Processo de Subtração**

Para a validação do processo de hibridação subtrativa realizado, no qual foi utilizado o RNA do micélio saprotrófico crescido em presença de extratos de cacau como *tester* e o RNA do mesmo micélio crescido em glicose como *driver*, foram utilizados dois tipos de ensaio: o northern reverso e a PCR semiquantitativa. O ensaio tipo northern reverso foi realizado como uma validação geral do processo de subtração, utilizando os clones selecionados como candidatos a apresentar expressão diferencial a partir da análise bioinformática. A PCR semiquantitativa foi utilizada para avaliar a diminuição de dois transcritos expressos de maneira constitutiva após a subtração.

A PCR semiquantitativa permite comparar as quantidades iniciais de um determinado gene em duas populações de cDNA: antes e depois da subtração.

Para isso, devem ser utilizados *primers* específicos para a amplificação de um gene que não mostre expressão diferencial (genes com expressão constitutiva), já que este deve ser subtraído durante o processo, e que não seja cortado pela enzima *Rsa* I. Como molde devem ser utilizadas as populações de cDNA subtrativa e controle (aquela população de cDNA *tester* ligada a ambos os adaptadores que não foi submetida a hibridação subtrativa mas sim à PCR supressiva) (GUILLEROUX e OSBOURN, 2004). Para este ensaio foram utilizados primers específicos para amplificação de dois genes constitutivos, Actina (ACT) e Fator de Necrose (NEP1). Os primers utilizados para a amplificação do gene ACT foram Act-F (5'-CCACAATGGAGGACGAAGTCG-3') e Act-R (5'-CCCGACATAGGAGTCCTTCTG-3') e para NEP1 utilizamos NF-F (5'-CATATGATGGCGAGGCTCTC-3') e NF-R (5'-GGATCCCCAAGTAATGCTATTATG-3'). Para as reações de PCR foram utilizados 50 ng de cada população de cDNA (subtrativa ou controle), 0.45  $\mu$ M de cada primer (Forward e Reverse), 3 mM Cloreto de Magnésio, 2mM dNTPs, 1X Tampão de Reação, e 2 unidades de Platinum<sup>®</sup> *Taq* polimerase (Invitrogen).

Para o ensaio tipo northern reverso (KANG *et al.*, 2002; ROS *et al.*, 2004; ANDREWS *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2004; CRAMER e LAWRENCE, 2004) foram selecionados clones de interesse em virtude do resultado do seqüenciamento (Tabela 8.1, seção 8. Anexos). Estes clones foram selecionados em base a frequência que apareceram nas bibliotecas subtrativa e de transcritos completos e foram classificados em quatro categorias diferentes: **1)** clones que representam genes constitutivos (aparecem em SAP-CAC e SAP-GLI, mas não em SAP-SUB); **2)** clones diferencialmente expressos (aparecem em SAP-CAC e SAP-SUB e não em SAP-GLI); **3)** possíveis falsos positivos (aparecem em SAP-SUB, SAP-CAC e SAP-GLI); **4)** clones que representam genes de interesse (aqueles com possível função na patogenicidade e que queremos confirmar se possuem expressão diferencial). Para a realização deste ensaio, primeiramente foi feito um rearranjo dos clones selecionados a uma placa de 96 poços de acordo com as categorias descritas na Tabela 8.1 (Fig. 8.1).

Uma vez crescidas as colônias na placa rearranjada e no antibiótico apropriado, os insertos destes clones foram amplificados por PCR de colônia

utilizando o par de primers adequado ao vetor de clonagem: no caso do plasmídeo pDNR-LIB (Clontech, bibliotecas **SAP-CAC** e **SAP-GLI**), os primers utilizados foram o Clontech-Forward (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') e o Clontech-Reverse (5'-AAACAGCTATGACCATGTTCA-3'); já para o plasmídeo pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, biblioteca **SAP-SUB**) os primers para amplificação do inserto foram o M13 Forward (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') e o M13 Reverse (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'). Os componentes da reação de PCR de colônia são descritos a seguir: 1X tampão para PCR (Invitrogen), 1,3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,13 mM dNTPs, 0,13 μM primer Forward, 0,13 μM primer Reverse, 1 unidade de Platinum<sup>®</sup> Taq (Invitrogen) e 2 μL da cultura de *E. coli* DH10B contendo o vetor num volume final de 50 μL. As reações foram realizadas em placa de 96 poços e transferidas ao termociclador com o seguinte programa: desnaturação a 94° C do anticorpo anti-Taq por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 45 segundos a 55° C e 45 segundos a 72° C; para finalizar, a reação foi incubada a 72° C por 7 minutos para polimerização final.

Os insertos amplificados por PCR foram quantificados em gel de 1% agarose contendo 0,5 μg/ml de brometo de etídio, utilizando como padrão de concentração o DNA do fago lambda ( $\lambda$ , Tamanho= 48 Kb) nas concentrações de: A) 55,2 ng/μL; B) 27,6 ng/μL; e C) 13,8 ng/μL e tomando em consideração o tamanho de cada inserto. Uma vez quantificados, os insertos amplificados foram diluídos a uma concentração final de 10 ng/μL. A partir desta diluição 200 ng de cada inserto foram fixados em membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Biosciences) utilizando um *manifold* a vácuo de 96 poços (Promega) e seguindo um protocolo padrão de transferência em solução salina tipo dot blot (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). O DNA foi ligado covalentemente à membrana por calor a 80° C por 2 horas. Foram realizadas três réplicas desta membrana.

As membranas contendo os insertos amplificados foram hibridadas contra três sondas de cDNA diferentes: 1) cDNA sintetizado a partir do RNA de micélio de *C. perniciosus* crescido em extratos de cacau segundo a metodologia SMART (Clontech); 2) cDNA sintetizado a partir do RNA de micélio do fungo crescido em glicose segundo a metodologia SMART (Clontech); e 3) cDNA da biblioteca subtrativa (Cacau menos Glicose) obtido segundo a metodologia do kit PCR



Select (Clontech) e digerido com *Rsa* I para remoção dos adaptadores. 400 ng de cada sonda (quantificadas por espectrofotometria) foram marcadas isotopicamente com  $\alpha$ -ATP<sup>32</sup> (> 3000 ci, Amersham Bioscience) a partir de hexaoligonucleotídeo aleatório (Amersham Bioscience) e a enzima Klenow (Amersham Biosciences), segundo a metodologia de FEINBERG e VOGELSTEIN (1983). As sondas marcadas foram purificadas em coluna de sephacryl HR-300 (Amersham Biosciences) para remoção de primers e nucleotídeos não incorporados. Para a hibridação foi utilizado um tampão contendo sulfato de dextran como intensificador do sinal radioativo: 10% sulfato de dextran (Calbiochem), 2X SSPE, 1% SDS, 0,5% leite em pó desnatado e 0,1 mg/mL DNA de esperma de salmão. As membranas foram pré-hibridadas nesta solução a 65° C por 6 horas. A hibridação foi conduzida a 65° C *overnight*, após, as membranas foram lavadas segundo instruções do fabricante e expostas a filme radiográfico X-OMAT (Kodak) a -70° C durante 24 horas e 4 dias. A presença ou ausência de sinal, assim como sua intensidade, foi registrados para cada spot com cada uma das sondas. Estes resultados são resumidos na Tabela 8.2 (seção 8. Anexos) e foram interpretados em base às categorias expostas na Tabela 8.1.

#### **5.2.5. Validação por Northern Blot de Clones Selecionados**

Uma vez validado o processo de subtração a partir do qual foi possível selecionar clones de interesse, em vista de seu possível envolvimento com a patogenicidade de *C. perniciosus*, foi padronizado o ensaio tipo Northern blot para confirmar assim a expressão diferencial destes clones na presença de extratos de cacau.

Para a realização deste ensaio foi feita uma nova extração de RNA total nas mesmas condições de crescimento utilizadas anteriormente (meio mínimo contendo extratos de cacau ou glicose e cinco períodos de crescimento: 24h, 48h, 72h, 6 dias e 8 dias). Esta extração fez-se necessária devido à degradação do RNA extraído originalmente, mas também para verificar a repetibilidade do experimento.

O RNA extraído nos cinco tempos de crescimento para cada tratamento (cacau ou glicose) foi misturado de maneira equivalente para cada tempo de

crescimento, estimado por espectrofotometria. As duas populações resultantes foram então fracionadas por tamanho em gel denaturante de agarose-formaldeído (1,2% agarose, 7% formaldeído) até que o corante azul de bromofenol mostrasse uma migração de aproximadamente 6 cm. Foram carregados 12 µg de cada amostra de RNA por poço, quantificado por espectrofotometria. O gel contendo o RNA fracionado foi fotografado e em seguida transferido a membrana de nylon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Biosciences) segundo protocolo padrão de northern blot por transferência em solução alcalina, após a qual o RNA já se encontra covalentemente fixado na membrana (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

A normalização da quantidade de RNA carregado por poço foi realizada por visualização das bandas de RNA ribossomal no gel e por hibridação com o gene de Actina de *C. pernicioso*. Este transcrito de Actina foi obtido a partir da amplificação do cDNA do fungo na fase saprotrófica utilizando um jogo de primers desenhados a partir da análise do genoma: ACT-Forward e ACT-Reverse. A reação de PCR continha os seguintes componentes: 800 ng de cDNA de micélio saprotrófico, 1X tampão para PCR (Invitrogen), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM primer ACT-Forward, 0,2 µM primer ACT-Reverse e 5 unidades de Platinum Taq (Invitrogen) num volume final de 50 µL. O programa no termociclador consistiu em um passo para desnaturação do anticorpo anti-Taq a 94° C por 5 minutos seguido de 33 ciclos de 50 segundos a 94° C, 50 segundos a 58° C e 1 minuto e 20 segundos a 72° C; para finalizar foi adicionado um passo de polimerização final a 72° C por 5 minutos. A amplificação por PCR utilizando estes primers a partir de cDNA do fungo obtido tanto das fases saprotrófica como biotrófica resulta numa única banda de aproximadamente 200 bp e a análise da expressão por dot blot revelou a expressão constitutiva deste gene em ambas as fases (Odalys García, resultados não publicados). Esta banda foi purificada utilizando o kit Wizard<sup>®</sup> PCR Clean-up (Promega) para ser marcada isotópicamente como sonda.

A marcação isotópica da sonda com  $\alpha$ -ATP<sup>32</sup> (> 3000 ci, Amersham Bioscience) foi realizada a partir de hexaoligonucleotídeo aleatório (Amersham Bioscience) e a enzima Klenow (Amersham Biosciences); a sonda foi depois purificada para remoção dos nucleotídeos não incorporados utilizando uma coluna de microspin HR-300 (Amersham). A pré-hibridação e hibridação foram realizadas

num tampão contendo 50% formamida, 10% PEG 8000 (Polietilenoglicol de 8000 KDa), 7% SDS, 120 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,2), 250 mM NaCl, 1 mM EDTA e 0,1 mg/mL DNA de esperma de salmão à temperatura de 42° C (6 horas de pré-hibridação e hibridação *overnight*). As lavagens e exposição seguiram protocolo padrão (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

Após a padronização do ensaio tipo northern blot utilizando a sonda de actina, foram feitas outras hibridações utilizando clones contendo insertos de interesse como sondas. Vários clones foram selecionados em vista de sua possível função no processo de patogenicidade, a qual foi inferida a partir dos alinhamentos utilizando a ferramenta BLASTX. Para ser utilizados como sondas, estes clones tiveram seus insertos amplificados por PCR utilizando primers que flanqueiam o inserto, como explicado no item 5.2.4. para o ensaio tipo northern reverso. Após a amplificação, os insertos foram purificados segundo o protocolo do kit Wizard® PCR Clean up (Promega) para remoção das enzimas, primers e nucleotídeos não incorporados. Sua marcação radioativa foi realizada utilizando hexanucleotídeo aleatório como explicado acima. Até o momento só obtivemos hibridação tipo northern blot de apenas dois dos insertos selecionados: o inserto do clone CP02-EC-001-011-A04-UE.F mostrando similaridade significativa com uma formato desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup> de *Aspergillus nidulans* (E-value 3,0E-48) e o inserto do clone CP02-EC-001-005-C02-UE.F mostrando similaridade significativa com uma NADPH oxidase de *Emericella nidulans* (E-value 1,0E-15).

### **5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.3.1. Seqüenciamento e Análise das Seqüências**

Foram seqüenciadas um total de 82 placas de cDNA do micélio de *C. perniciosus* sob diferentes condições. Estas 82 placas produziram um total de 7406 reads (1605 de SAP-CAC, 1077 de SAP-GLI, 2608 de SAP-SUB e 2116 de BIO). Porém, durante o processo de seleção e trimagem foram selecionados apenas 3650 reads, representando o 49% do total de reads. Apesar de a porcentagem de reads aceitos ser desanimadora, o processo de seleção e trimagem resulta

essencial para a obtenção de clusters confiáveis. Estes 3650 reads formaram um total de 1487 clusters ou unigenes.

O tamanho médio dos reads aceitos foi de 819,6 bp. A biblioteca que produz reads maiores foi SAP-SUB, com uma média de 955,8 bp, seguida de SAP-GLI (785,8 bp), SAP-CAC (770 bp), e finalmente BIO (703,9). Estas médias de tamanho são aceitáveis já que após a tradução produzem seqüências de aproximadamente 250 aminoácidos a serem comparadas com as bases de dados públicas.

Todos os reads aceitos foram clusterizados gerando um total de 1487 clusters, dos quais 344 são contigs formados por mais de um read (23%) e 1143 são singlets (77%) consistindo de um único read. A distribuição dos reads por cluster é apresentada na Tabela 4.1. Dos 1487 clusters, 998 (67%) mostraram identidade de seqüência nucleotídica com os dados do Projeto Genoma de *C. pernicioso* (BLASTn, e-value de corte 1E-10). Os clusters que não mostraram similaridade com as seqüências genômicas de *C. pernicioso* incluíram 61 dos contigs e 428 dos singlets (100 de SAP-CAC, 43 de SAP-GLI, 80 de SAP-SUB e 205 de BIO), totalizando o 33% dos clusters gerados. Estes dados validam as bibliotecas de ESTs geradas neste projeto em relação a conter seqüências expressas de *Crinipellis pernicioso*.

**Tabela 5.1.** Distribuição dos reads por clusters. A maioria dos contigs possuem de 2 a 4 reads.

Singlets	1143
<b>Contigs de 2-4 reads</b>	<b>258</b>
Contigs de 5-10 reads	45
Contigs de 11-20 reads	23
Contigs de 21-40 reads	8
Contigs de 41-100 reads	8
Contigs > 100 reads	2
<b>TOTAL</b>	<b>1427</b>

Como em outros projetos de ESTs, a redundância das bibliotecas foi relativamente baixa com 23% dos reads formando clusters enquanto o restante 77% permaneceu como singlets. A maioria dos clusters estão compostos por 2 a 4 reads (Tabela 5.1). Porém, encontramos que 10 contigs representam seqüências

altamente redundantes sendo formados por mais de 40 reads. Em vista deste resultado devemos prestar atenção na redundância durante a continuidade do seqüenciamento, já que se este valor continua a aumentar constantemente indicaria que não estão sendo geradas novas informações e o seqüenciamento deverá ser descontinuado.

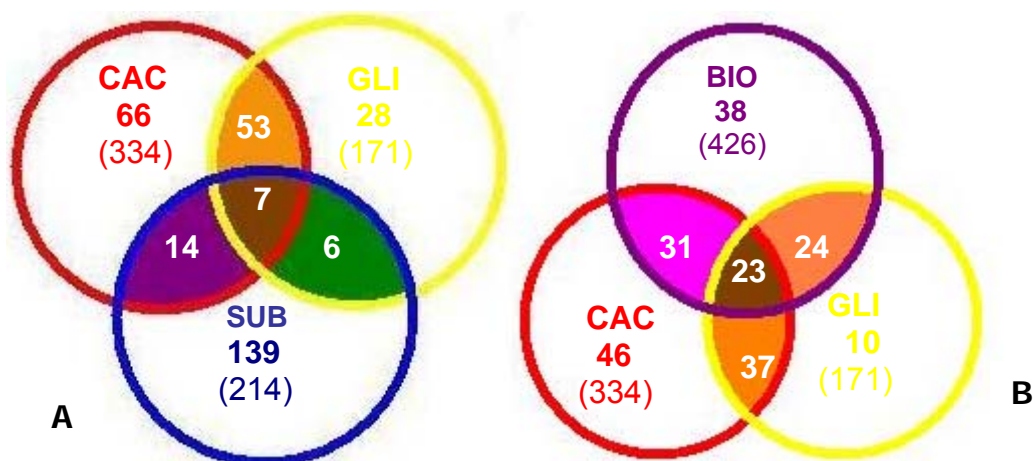
Dentro dos contigs mais redundantes temos: 1) contig\_202 com 492 reads das quatro bibliotecas (SAP-CAC, SAP-GLI, SAP-SUB e BIO), mas com ampla maioria de BIO; 2) contig\_105 com 186 reads de SAP-CAC e SAP-GLI, com maioria de SAP-GLI; 3) contig\_278 com 87 reads de SAP-SUB unicamente; 4) contig\_215 com 57 reads de SAP-SUB unicamente; 5) contig\_147 com 53 reads de SAP-SUB e SAP-CAC, com maioria de SAP-SUB; 6) contig\_114 com 51 reads de SAP-CAC e BIO; 7) contig\_216 com 49 reads de SAP-GLI, BIO e SAP-SUB, com maioria de SAP-SUB; 8) contig\_1 com 42 reads de SAP-CAC, BIO e SAP-SUB, com maioria de SAP-SUB; 9) contig\_98 com 47 reads de SAP-CAC e SAP-GLI, em proporções equivalentes; 10) contig\_206 com 42 reads de SAP-SUB unicamente. Nestes resultados é possível observar que a biblioteca com maior redundância é SAP-SUB, mostrando o maior número de contigs redundantes. Ainda, é possível que a redundância dos ESTs esteja subestimada devido ao seqüenciamento num único sentido, o qual permitiria a obtenção de fragmentos diferentes de um único gene os quais não apresentariam suficiente seqüência consenso para alinhar (FERNANDES *et al.*, 2002; TRAIL *et al.*, 2003). Este poderia ser o caso da biblioteca SAP-SUB, na qual encontramos múltiplos contigs com similaridade significativa a *Aminolevulinic Acid Synthase* e a *NAD-Dependent Formate Dehydrogenase*.

A partir do Northern Eletrônico (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>) foi avaliada a distribuição dos clusters entre as bibliotecas SAP-CAC, SAP-GLI e SAP-SUB (Fig. 4.21.A) e entre as bibliotecas SAP-CAC, SAP-GLI e BIO (Fig. 4.21.B), as áreas sombreadas representam clusters compostos por reads de mais de uma biblioteca (Fig. 4.21.). Consideramos que as similaridades entre as bibliotecas SAP-SUB e BIO não são relevantes do ponto de vista biológico, já que SAP-SUB é uma biblioteca subtrativa contendo transcritos expressos preferencialmente na presença de extratos de cacau, os quais também podem ser

encontrados na biblioteca SAP-CAC. De fato, apenas 4 contigs foram formados unicamente por reads das bibliotecas SAP-SUB e BIO: 1) Contig\_177, com 8 reads sendo 7 de SAP-SUB e um de BIO, com similaridade a seqüências genômicas de *C. pernicioso*, mas sem similaridade com proteínas nas bases de dados públicas; 2) Contig\_210, com 22 reads sendo 21 de SAP-SUB e um de BIO, com similaridade a seqüências genômicas e com proteína hipotética de *Cryptococcus neoformans*, de função desconhecida; 3) Contig\_235 com 11 reads sendo 10 de SAP-SUB e um de BIO, com similaridade significativa com dados genômicos, mas sem similaridade com proteínas nas bases de dados públicas; e 4) Contig\_279 com 2 reads, um de SAP-SUB e um de BIO, mostrando similaridade significativa com dados genômicos, mas sem similaridade com proteínas nas bases de dados públicas. O fato destes contigs não terem incluído reads da biblioteca SAP-CAC e sim de SAP-SUB pode indicar que os transcritos representados nestes contigs são expressos no micélio saprotrófico na presença de extratos de cacau, mas constituindo transcritos raros que só puderam ser seqüenciados após o processo de subtração. Estes transcritos estariam mais representados no micélio biotrófico, sendo então diferencialmente expressos nos dois tipos de micélio. Os contigs formados por reads de SAP-SUB e BIO foram contabilizados como unicamente de SAP-SUB ou unicamente de BIO na análise respectiva.

Como pode ser observado na figura 5.1.A, a biblioteca SAP-SUB é a mais redundante com 139 contigs conformados unicamente por reads desta biblioteca. Este resultado reforça a alta redundância desta biblioteca. As bibliotecas que compartilhem o maior número de contigs são SAP-CAC e SAP-GLI, compartilhando um total de 60 contigs (53 contigs formados por reads de SAP-CAC e SAP-GLI mais 7 contigs formados por reads de SAP-CAC, SAP-GLI e SAP-SUB na figura 4.6.A). Este resultado indica que as bibliotecas SAP-CAC e SAP-GLI, ambas de micélio saprotrófico, compartilhem muitos de seus ESTs. O fato destas duas bibliotecas serem similares poderia afetar negativamente a eficiência do processo de subtração após o qual foi gerada a biblioteca SAP-SUB. Porém, as bibliotecas SAP-GLI e SAP-SUB compartilhem apenas 6 contigs mais 7 contigs que são compostos por reads das três bibliotecas, totalizando 13 contigs. Destes contigs, 6

foram testados no ensaio de northern reverso para confirmar se constituíam falsos positivos, mas mostraram expressão diferencial, sendo preferencialmente expressos na presença de extratos de cacau. Assim, o processo de subtração foi validado, e mesmo que alguns contigs sejam formados por reads de SAP-SUB e SAP-GLI, aqueles em SAP-SUB representam, em sua maioria, transcritos expressos preferencialmente na presença de extratos de cacau.



**Fig. 5.1.** Distribuição dos clusters entre as bibliotecas de ESTs. Os números nas áreas sombreadas representam contigs compostos por reads de múltiplas bibliotecas. Os números entre parêntesis representam os singlets obtidos para cada biblioteca, enquanto os números em negrita indicam os contigs compostos por reads de uma única biblioteca.

**A.** Distribuição dos clusters entre as bibliotecas SAP-CAC, SAP-GLI e SAP-SUB. **B.** Distribuição dos clusters entre as bibliotecas SAP-CAC, SAP-GLI e BIO.

A distribuição de clusters entre as bibliotecas SAP-CAC, SAP-GLI, e BIO (Fig. 5.1.B) foi mais equitativa. SAP-CAC e SAP-GLI compartilham o maior número de contigs com 60 (37 de SAP-CAC e SAP-GLI mais 23 de SAP-CAC, SAP-GLI e BIO). As bibliotecas SAP-CAC e BIO compartilham 54 contigs, enquanto que SAP-GLI e BIO compartilham um total de 47 clusters. Assim o micélio biotrófico apresenta um padrão de transcrição mais similar àquele apresentado pelo micélio saprotrófico quando crescido na presença de extratos de cacau. Em vista de que o micélio biotrófico foi crescido em meio suplementado com extrato de meristema de cacau, este resultado poderia indicar que a presença do hospedeiro tem um efeito similar em ambos os tipos de micélio.

O contig\_105 representou a seqüência mais redundante tanto para a biblioteca SAP-CAC (68 reads que representam o 9% de todos os reads desta

biblioteca) como para a biblioteca SAP-GLI (118 reads representando o 25.7% dos reads desta biblioteca). Este contig não mostrou similaridade com proteínas nas bases de dados públicas nem mostrou identidade nucleotídica significativa com os dados do Projeto Genoma de *C. pernicioso* e poderia ser um artefato da técnica ou, em vista de que a qualidade da seqüência consenso é muito alta, também poderia representar uma região não seqüenciada do Genoma de *C. pernicioso*. Outra seqüência redundante para ambas as bibliotecas foi representada pelo contig\_98, contando com 28 reads da biblioteca SAP-CAC (3,71%) e 19 reads da biblioteca SAP-GLI (4,14%); este contig apresentou similaridade com o genoma de *C. pernicioso* (E-value 0.0) e com uma aglutinina de *Streptococcus gordonii* (E-value 3E-10). Esta aglutinina é um tipo de lecitina tóxica com ação antifúngica (DOES *et al.*, 1999). O fungo pode sintetizar esse composto para eliminar outros fungos presentes no tecido vegetal, que competiriam por espaço e nutrientes com o mesmo. Além disso, a aglutinina está envolvida na adesão celular e pode participar na anastomose entre hifas. O fato destas seqüências redundantes nas bibliotecas SAP-CAC e SAP-GLI estarem ausentes na biblioteca SAP-SUB indica que foram subtraídas eficientemente.

Outra seqüência redundante contig\_114, composto por 51 reads, sendo 31 de SAP-CAC (4,11%) e 20 de BIO (1,91%), com alta similaridade com o genoma de *C. pernicioso* (E-value 1E-169) e com a hidrofobina CoH1 de *Coprinopsis cinerea* (E-value 2E-23). Outros nove clusters com similaridade a hidrofobinas foram detectados, principalmente nas bibliotecas SAP-CAC e BIO (totalizando 23 reads adicionais de SAP-CAC e nove de BIO, 6 reads de SAP-GLI e 2 de SAP-SUB); as hidrofobinas estão envolvidas na criação de uma interface ar/água para as hifas e sua expressão pode estar relacionada às condições de intensa agitação durante a cultura, porém sua expressão preferencial no meio contendo extrato de cacau resulta interessante e deve ser investigado, em especial dado que também são expressas no micélio biotrófico.

Em relação à biblioteca SAP-SUB, as seqüências com maior redundância foram: contig\_278 (87 reads, 6,24%) sem similaridade com o genoma de *C. pernicioso*, mas com similaridade significativa a “*NAD-dependent formate dehydrogenase*” de diversos fungos (E-value 7E-14); contig\_215 (57 reads,



4,08%) com similaridade com o genoma de *C. pernicioso* (E-value 1E-45), mas sem similaridade às proteínas nas bases de dados públicas; o contig\_216 (44 reads de SAP-SUB, 3,15%) que não mostrou similaridade com o genoma de *C. pernicioso* nem com as bases de dados públicas; e o contig\_206, com 42 reads de SAP-SUB (3,01%), com similaridade com o genoma de *C. pernicioso* (E-value 1E-14), mas sem similaridade às proteínas nas bases de dados públicas. Além do “*NAD-dependent formate dehydrogenase*” (aparecendo em 9 clusters, totalizando 178 reads de SAP-SUB, 12,8%, 1 read de SAP-CAC e 1 read de SAP-GLI), outro gene que apareceu repetidas vezes na biblioteca SAP-SUB foi o “*Aminolevulinic acid synthase*”, mostrando similaridade com 8 clusters, totalizando 86 reads (6,16%) de SAP-SUB unicamente, não apareceu nas outras bibliotecas. Tanto a formato desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup> como a aminolevulinato sintetase são enzimas envolvidas no transporte de elétrons: a formato desidrogenase reduz o ácido fórmico a CO<sub>2</sub> com a formação concomitante de NADH e H<sup>+</sup> e dois elétrons que entram na cadeia respiratória ao serem transferidos à ubiquinona pela NADH-ubiquinona oxidoreductase, enzima que também aparece em nossas análises nas bibliotecas SAP-CAC e BIO; a aminolevulinato sintetase catalisa a formação de ácido aminolevulínico, o qual é um precursor das porfirinas que constituem o núcleo heme dos citocromos. A presença destas duas enzimas de maneira redundante na biblioteca subtrativa poderia indicar a importância da respiração celular durante a interação da fase saprotrófica do fungo com o cacau.

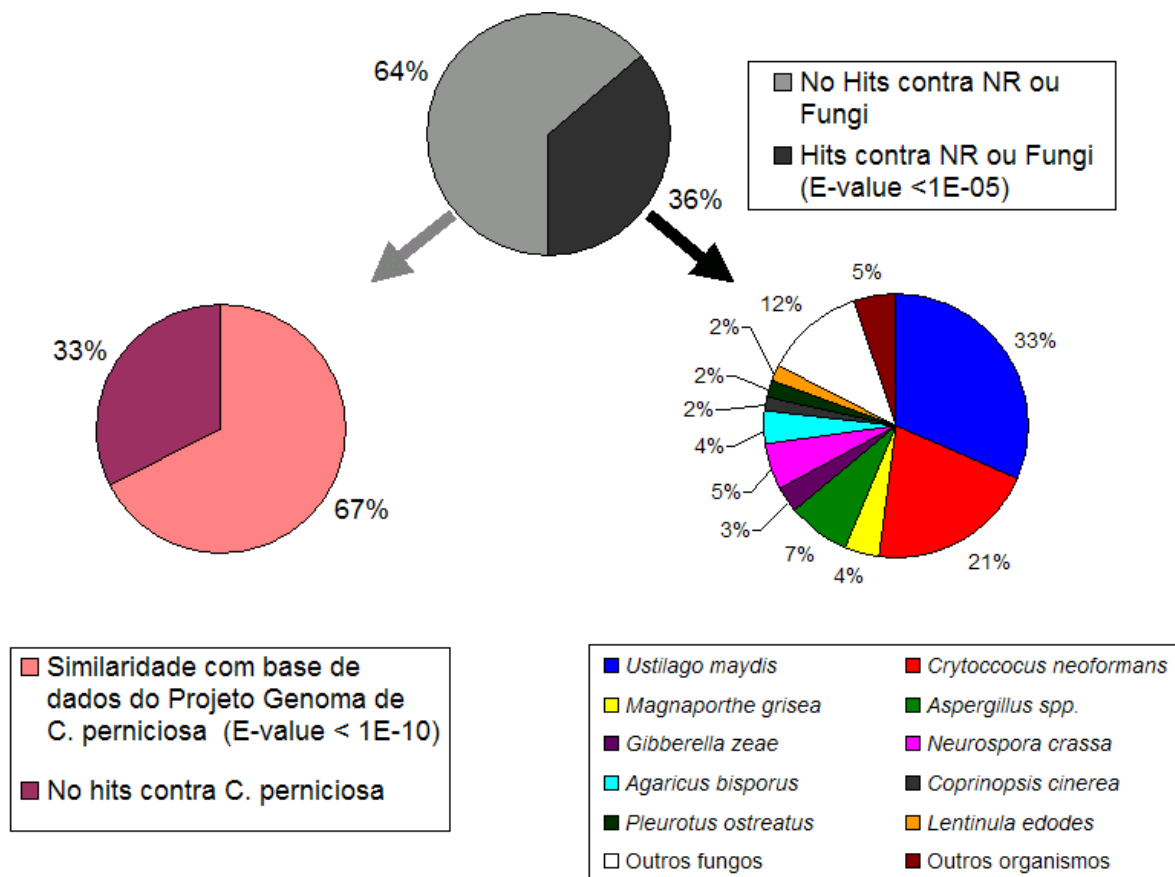
A biblioteca BIO mostrou várias diferenças com as outras bibliotecas. O contig mais redundante de BIO juntou 459 reads de BIO, mais 28 reads de SAP-SUB, 3 reads de SAP-CAC e 2 de SAP-GLI. Este contig\_202 não mostrou similaridades significativas com os dados genômicos nem com proteínas nas bases de dados públicas, indicando que poderia ser um artefato da técnica. Porém, o fato de que neste contig alinham reads das quatro bibliotecas, incluindo SAP-SUB que foi gerada a partir de uma técnica diferente, sugere que o cluster não é artefato, mas representa uma área do genoma não seqüenciada ainda, em vista de que apenas foram atingidas duas coberturas do genoma no seqüenciamento tipo shotgun. Assim, este contig deve ser investigado a fundo em relação à sua expressão com ensaios tipo northern e northern reverso, verificando

assim se representa ou não um transcrito de *C. pernicioso*. Com exceção deste contig altamente redundante e o contig\_114 com similaridade a hidrofobina mencionado anteriormente, não houve nenhum outro contig da biblioteca BIO mostrando alta redundância.

Dos 1487 clusters formados, 534 (36%) apresentaram similaridade significativa com proteínas nas bases de dados públicas (NR em NCBI e Fungi compilada no LGE, BLASTx com E-value  $\leq 1E-05$ ), enquanto os restantes 953 clusters (64%) não apresentaram similaridade com estas bases de dados (Fig. 5.2.A). Porém, dos 953 clusters, 639 (67% dos reads sem similaridade nas bases de dados públicas) mostraram identidade na seqüência nucleotídica com a base de dados do Projeto Genoma de *Crinipellis pernicioso* (BLASTn, E-value  $\leq 1E-10$ ) e poderiam constituir genes novos. Resulta necessário caracterizar estes transcritos e para isso propomos uma análise bioinformática mais profunda que busque possíveis orfs e domínios conservados. Por outro lado, 314 do total de clusters (33%) resultaram órfãos e poderiam ser artefatos da técnica ou contaminantes (Fig. 5.2.B). Contudo, também é possível que estes clusters representem áreas não seqüenciadas do genoma, em vista de que até o momento o seqüenciamento genômico tem alcançado apenas duas coberturas do tamanho estimado do mesmo. Adicionalmente, uma análise de interesse para todos os genes que não apresentaram similaridade com proteínas nas bases de dados públicas seria uma busca por possíveis micro-RNAs. Os micro-RNAs são pequenos RNAs não codificantes que têm sido encontrados em todos os grupos de eucariontes e recentemente foi demonstrado que possuem uma função importante na regulação da expressão gênica (AGRAWAL *et al.*, 2003). Assim, o estudo de micro-RNAs em *C. pernicioso* é de grande relevância e pretendemos abordá-lo primeiramente mediante uma análise computacional, já que recentemente foram disponibilizados algoritmos de busca deste tipo de transcritos em bibliotecas de ESTs (BROWN e SANSEAU, 2005).

Dos 534 clusters que mostraram similaridade significativa (E-value  $\leq 1E-05$ ) com as bases de dados públicas, 507 (95%) resultaram mais similares com proteínas de outros fungos. O fungo fitopatogênico que mostrou maior similaridade aos ESTs de *C. pernicioso* foi o basidiomiceto *Ustilago maydis* mostrando

similaridade com 169 dos clusters (33%), seguido por outro fungo basidiomiceto, *Cryptococcus neoformans*, mostrando similaridade com 109 dos clusters (21%). Outros fungos que também mostraram um alto nível de similaridade com os ESTs de *C. perniciosus* foram os ascomicetos *Aspergillus* spp. (40 clusters, 7%), *Neurospora crassa* (29 clusters, 5%), *Magnaporthe grisea* (22 clusters, 4%), e *Gibberella zeae* (18 clusters, 3%), entre outros (Fig. 5.2.C).



**Fig. 5.2.** Distribuição dos clusters por similaridade com as três bases de dados utilizadas para busca de homólogos. **A)** 534 clusters (36%) mostraram similaridade (BLASTx, E-value  $\leq 1E-05$ ) com proteínas nas bases de dados NR (NCBI) e/ou com a base de dados de proteínas de fungos (Fungi) compilada no LGE; os restantes 953 clusters (64%) não mostraram similaridade com estas bases de dados. **B)** Distribuição dos 953 clusters em relação a similaridade ou não com a base de dados do Projeto Genoma de *C. perniciosus* (BLASTn, E-value  $\leq 1E-10$ ). **C)** Principais organismos que mostraram similaridade com os 534 clusters.

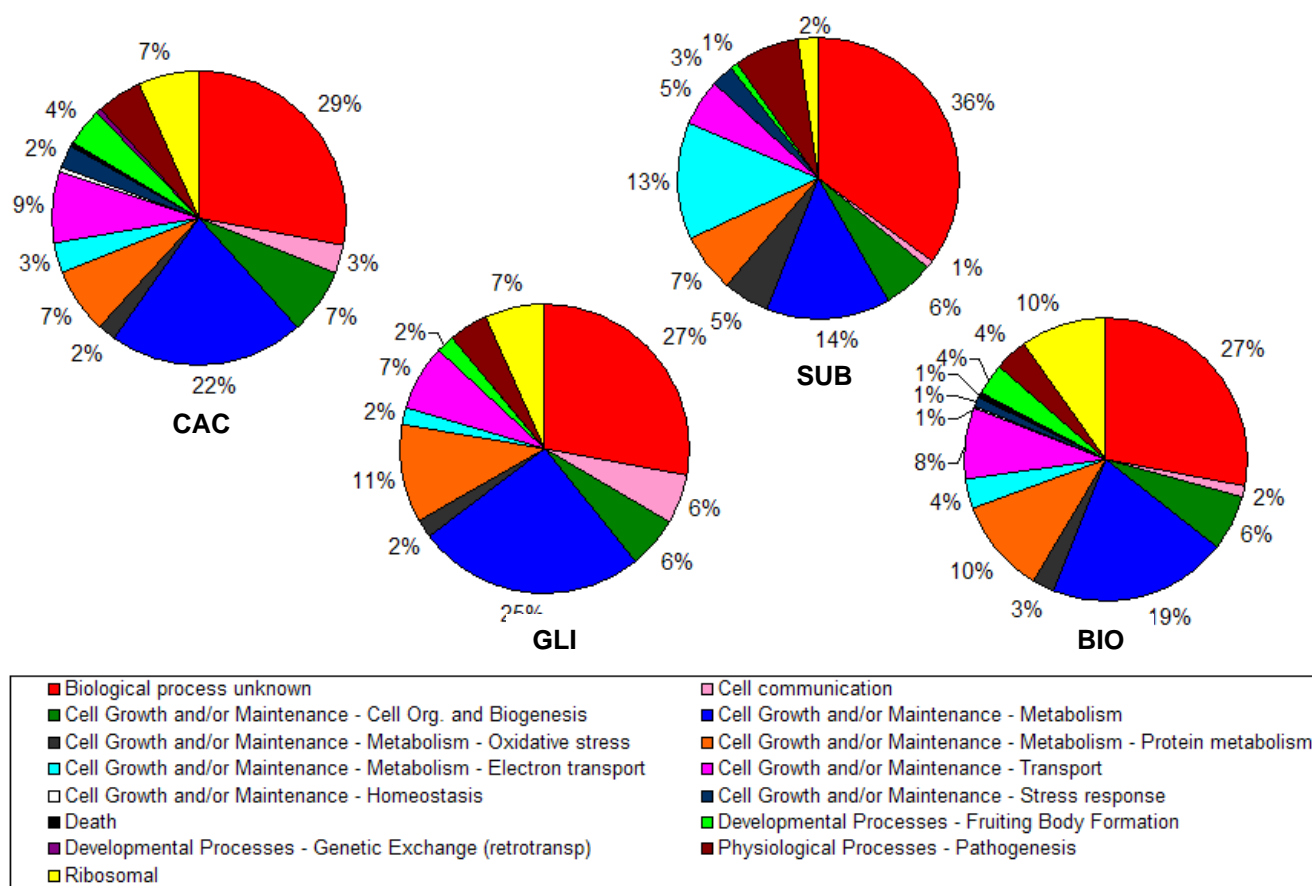
O 36% de clusters com similaridade significativa a proteínas nas bases de dados públicas é relativamente baixo quando comparado a projetos de seqüenciamento de ESTs de ascomicetos como *Gibberella zeae* (TRAIL *et al.*,

2003), *Neurospora crassa* (NELSON *et al.*, 1997), *Blumeria graminis* (THOMAS *et al.*, 2001), *Magnaporthe grisea* (KIM *et al.*, 2001b), *Verticillium dahliae* (NEUMANN e DOBINSON, 2003), *Gaeumannomyces graminis* (GUILLEROUX e OSBOURN, 2004) e *Scerotinia sclerotiorum* (LI *et al.*, 2004), nos quais a porcentagem de genes com similaridade nas bases de dados públicas oscilou entre 55% e 71%. Contudo, esta porcentagem é comparável àquela encontrada em projetos de ESTs de outros basidiomicetos como *Schizophyllum commune* (GUETTLER *et al.*, 2003) e *Ustilago maydis* (SACADURA e SAVILLE, 2003; NUGENT *et al.*, 2004), nos quais a porcentagem de genes que puderam ser identificados por comparação às bases de dados públicas oscilou entre 44% e 58%. Esta diferença indica a grande distância genética que separa estas duas classes de fungos. De fato, os fungos que mostraram maior similaridade com os ESTs de *C. perniciosus* foram *Ustilago maydis* e *Cryptococcus neoformans* (Fig. 5.2.C), os quais são os únicos basidiomicetos totalmente seqüenciados cuja seqüência encontra-se disponível nas bases de dados públicas. É importante destacar que 582 clusters (39% de todos os clusters analisados) mostraram similaridade significativa unicamente com os dados do Projeto Genoma de *C. perniciosus*. Este fato poderia indicar que uma boa parte dos genes deste fitopatógeno não possuem homólogos em outros fungos totalmente seqüenciados, sugerindo que provavelmente os mecanismos envolvidos na patogenicidade deste fungo não têm sido descritos até o momento e devem ser dirigidos esforços na caracterização destes genes.

Na figura 5.3 é mostrada a categorização dos 534 clusters (contigs e singlets) que mostraram similaridade significativa com as bases de dados públicas, alguns destes clusters são compostos por reads de múltiplas bibliotecas e cada um deles foi anotado para cada uma das bibliotecas que representa. Em total, os 534 clusters representaram 187 da biblioteca SAP-CAC, 105 da biblioteca SAP-GLI, 123 da biblioteca SAP-SUB, e 182 da biblioteca BIO.

Na figura 5.3 podemos observar que a categoria de maior peso nas quatro bibliotecas é “Função Desconhecida”, representando aproximadamente a terceira parte das quatro bibliotecas. A categoria “Metabolismo” foi subdividida em “Resposta a Estresse Oxidativo”, “Transporte de Elétrons”, “Metabolismo e Modificação de Proteínas”, e simplesmente “Metabolismo”, englobando todos

aqueles que não se encaixam nas três anteriores. Tomando em consideração estas quatro subdivisões da categoria “Metabolismo”, vemos que esta representaria o 34% da biblioteca SAP-CAC, o 40% da biblioteca SAP-GLI, o 39% da biblioteca SAP-SUB e o 36% da biblioteca BIO, também aproximadamente a terceira parte das quatro bibliotecas. Como a categoria “Metabolismo” engloba mecanismos tão dissimiles, foi necessária esta subdivisão para melhor observarmos e entendermos as diferenças entre as bibliotecas. Assim, vemos que a biblioteca SAP-SUB mostra uma grande quantidade de clusters classificados no transporte de elétrons e resposta ao estresse oxidativo, enquanto SAP-CAC, SAP-GLI e BIO mostram uma porcentagem importante de clusters na categoria de metabolismo e modificação de proteínas.



**Fig. 5.3.** Distribuição dos clusters em categorias funcionais do Gene Ontology para cada biblioteca (SAP-CAC, SAP-GLI, SAP-SUB e BIO). Foi realizada uma busca contra as bases de dados públicas (NR e Fungi) utilizando a ferramenta BLASTx (E-value  $\leq 1E-05$ ).

A categorização foi feita manualmente em base a função da proteína homóloga e utilizando a ontologia proposta pelo Gene Ontology Consortium. O número de clusters no qual foi baseada a categorização foi de 187 para SAP-CAC, 105 para SAP-GLI, 123 para SAP-SUB e 182 para BIO. Para visualizar e separar os clusters por biblioteca foi utilizada a ferramenta Northern Eletrônico criada no LGE.

Na figura 5.3 também resulta evidente que as bibliotecas BIO e SAP-CAC mostram maior complexidade quando comparadas a SAP-GLI e SAP-SUB ao apresentar clusters categorizados em três categorias adicionais: “Resposta ao Estresse”, “Homeostase” e “Morte”. A categoria “Intercâmbio Genético (retrotransposon)” só foi encontrada na biblioteca SAP-CAC.

Entre os genes que apareceram com maior frequência nas bibliotecas de micélio saprotrófico encontramos diversos genes envolvidos no reaproveitamento de proteínas, os quais são expressos unicamente na presença de extratos de cacau (SAP-CAC e SAP-SUB). Estes genes incluem: ubiquitina, poliubiquitina, protease ubiquitina-específica, proteína conjugada a ubiquitina, componentes do proteosoma, dipeptidase, serina protease, quatro genes envolvidos no catabolismo de amino ácidos específicos e quatro genes envolvidos no transporte de amino ácidos, peptídeos e proteínas. A expressão destes genes na presença de extratos de cacau poderia indicar que o fungo apresenta uma alta taxa de reaproveitamento de proteínas durante a interação com o hospedeiro.

Igualmente parece relevante a presença de um grande número de genes envolvidos na respiração celular ou outras reações redox unicamente na presença de extratos de cacau; estes genes incluem: NADH-ubiquinona reductase, proteína de biosíntese de ubiquinona, peroxiredoxina similar a proteína Q, NADPH oxidase, citocromo b5, citocromo c oxidase (quatro aparições, diversas subunidades), formato desidrogenase dependente de  $\text{NAD}^+$ , aminolevulinato sintetase, tioredoxina e tetrapirrole metilase. A expressão destes genes preferencialmente na presença de extratos de cacau indica a importância da respiração celular durante a interação da fase saprofítica do fungo com o hospedeiro e poderia estar correlacionada, em parte, com o crescimento mais acelerado do micélio no meio contendo extrato de cacau. Por outro lado, na presença de glicose como única fonte de carbono o metabolismo parece estar dirigido à fermentação e não a fosforilação oxidativa. Todavia, uma respiração celular intensa por parte do fungo poderia trazer como consequência um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são conhecidas por induzir uma resposta hipersensitiva nas plantas que culmina com a morte celular programada da região infectada (DELLEDONE *et al.*, 2002; DE GARA *et al.*, 2003). Este é um mecanismo de

defesa das plantas que tem sido amplamente estudado e é eficiente no controle da infecção por patógenos biotróficos. Porém, *C. pernicioso* é hemibiotrófico e a morte do tecido infectado da planta é um requisito para o fungo poder completar seu ciclo de vida. Já tem sido demonstrado que patógenos necrotróficos (aqueles que requerem a morte do tecido afetado para poder completar seu ciclo de vida), como *Botrytis elliptica* e *Sclerotinea sclerotiorum*, se beneficiam da RH e causam ativamente este tipo de morte celular programada no tecido vegetal infectado mediante a secreção de componentes protéicos que desencadeiam a RH em seus hospedeiros (HEGEDUS e RIMMER, 2005). Adicionalmente, também foi demonstrado que plantas geneticamente modificadas que são incapazes de desencadear a RH são mais resistentes a este tipo de patógenos (GOVRIN e LEVINE, 2000). Estes fatos levam à pergunta de se *C. pernicioso* poderia causar diretamente uma resposta hipersensitiva na planta; a resposta a esta pergunta poderia ser afirmativa em vista da existência de um gene que codifica para uma proteína elicitora de necrose no genoma de *C. pernicioso* (Odalys Garcia, dados não publicados) e, adicionalmente a este gene, o fungo também poderia beneficiar a resposta hipersensitiva ao acumular EROS no tecido afetado. Tal produção de EROS poderia ser causada por diversos genes encontrados neste estudo, como a NADPH oxidase, glioxal oxidase e Glicose oxidase, todas as quais catalisam a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Porém, é claro que altas concentrações de EROS também podem trazer prejuízos ao patógeno, mas também encontramos na biblioteca de micélio biotrófico de *C. pernicioso* uma peroxidase TAP e diversas Manganês super óxido dismutases, com função da degradação de EROS, indicando assim que este fungo pode mostrar grande resistência a este tipo de compostos tóxicos, pelo menos durante sua fase infectiva. Adicionalmente, a presença de EROS no fungo *Crinipellis pernicioso* também pode estar relacionada a cascatas de sinalização intracelular do próprio fungo, função que vem sendo estudada recentemente em fungos como *Neurospora crassa*, no qual foi demonstrado que certas EROS estão relacionadas a cascatas de sinalização que regulam o crescimento celular (HANSBERG *et al.*, 1993; LARA-ORTIZ *et al.*, 2003). No ascomiceto *Aspergillus nidulans*, também homotático, a deleção da NADPH oxidase resulta numa incapacidade do fungo de formar corpos de frutificação, indicando que a produção de EROS é necessária para completar seu ciclo sexual

(LARA-ORTIZ *et al.*, 2003). Assim, é de grande interesse investigar o papel de enzimas produtoras de EROs em *C. pernicioso*, as quais são expressas preferencialmente na presença do hospedeiro.

No caso do micélio biotrófico, o qual constitui a fase infecciosa do fungo, encontramos mecanismos diferentes àqueles do micélio saprotrófico que poderiam estar relacionados com o processo de fitopatogenicidade de *C. pernicioso*. Na biblioteca BIO (micélio biotrófico), o processo biológico anotado com maior frequência foi o metabolismo e modificação de proteínas. A diferença das bibliotecas de micélio saprotrófico, nesta categoria não encontramos unicamente ubiquitinas, mas também uma grande quantidade de proteases e peptidases diferentes. Nesta mesma categoria resultou interessante a grande quantidade de proteínas ribossomais e enzimas envolvidas na síntese dos diversos tRNAs, as quais não tinham sido observadas nas bibliotecas de micélio saprotrófico.

A superexpressão de tRNAs ligases e sintetases, assim como de proteínas ribossomais, resulta de grande interesse, já que o acúmulo destas proteínas dentro das células indica uma condição de falta de aminoácidos no meio (*amino acid starvation*) e esta falta é um sinalizador importante para o metabolismo de nitrogênio, desencadeando diversos processos metabólicos como a biosíntese de amino ácidos e a transcrição de proteínas (HINNEBUSCH, 1997). O metabolismo de nitrogênio em fungos é um processo cuidadosamente regulado ao nível de expressão gênica e depende não só da presença ou ausência de nitrogênio como também do tipo de fonte de nitrogênio disponível, sendo que os fungos filamentosos utilizam preferencialmente amônia e amino ácidos como fontes principais de nitrogênio (MARZLUF, 1997). Porém, na ausência deste tipo de fontes de nitrogênio, os fungos são capazes de utilizar outras fontes, mas tem sido relatado que a sinalização de falta das fontes principais de nitrogênio (*nitrogen starvation*) parece estar relacionada ao desencadeamento do processo de patogenicidade em fungos (LAU e HAMER, 1996; MARZLUF, 1997). O meio de cultura utilizado para a manutenção da fase biotrófica, a partir da qual foi extraído o RNA para a confecção da biblioteca, é de fato um meio que carece quase totalmente de fontes de nitrogênio (com a possível exceção das pequenas quantidades de cafeína e auxina, caso estas forem aproveitadas pelo fungo)



(MEINHARDT *et al.*, 2006). Porém, este meio procurava imitar as condições do fluido apoplástico, aonde se limita o crescimento do fungo durante a fase biotrófica e o qual é um meio muito pobre em nutrientes. De fato, foi verificado que a adição de outros nutrientes, como extrato de levedura ou fontes de carbono diferentes do glicerol, causavam a rápida mudança do fungo para a fase saprotrófica (MEINHARDT *et al.*, 2006), mas a adição de fontes alternativas de nitrogênio não foi testada. Em vista destes fatos, seria interessante verificar quais as possíveis fontes de nitrogênio que poderiam ser aproveitadas pelo fungo no fluido apoplástico, já que é possível que o metabolismo de nitrogênio utilizado durante a fase biotrófica seja diferente daquele utilizado durante a fase saprotrófica, na qual o fungo invade os espaços intracelulares que são mais ricos em fontes de nitrogênio, particularmente em amino ácidos.

Uma possível fonte de nitrogênio para a fase biotrófica do fungo poderia ser o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), já que na biblioteca BIO encontramos um transcrito com similaridade significativa a um transportador de GABA de *Saccharomyces cerevisiae* (E-value 4E-28) e outro com similaridade a uma semialdeído succínico desidrogenase de *Legionella pneumophila* (E-value 2E-32), que é uma das três enzimas do processo conhecido como *GABA shunt* que catalisa a formação de succinato a partir de GABA; o succinato entra no ciclo de Krebs e assim o GABA pode ser aproveitado como fonte de carbono (NELSON e COX, 2000). Durante a transformação de GABA a succinato, o GABA perde o grupo amino, o qual é transferido a  $\alpha$ -cetoglutarato ou piruvato para formar glutamato ou alanina, respectivamente; assim, o GABA também pode ser aproveitado como fonte de nitrogênio (BOUCHÉ e FROMM, 2004). O metabolismo de GABA como fonte de carbono e de nitrogênio já foi verificado para diversos fungos (KUMAR e PUNEKAR, 1997). Durante a infecção do tomate pelo fungo *Cladosporium fulvum*, o qual é um patógeno biotrófico com crescimento limitado ao espaço apoplástico, foi verificado que o GABA é acumulado no espaço intercelular em altas concentrações (2.5 mM) e este composto seria aproveitado pelo fungo como fonte de nitrogênio (SOLOMON e OLIVER, 2002). Em vista destas evidências, pretendemos verificar a presença de GABA no fluido apoplástico de vassouras verdes e tecidos de cacau sadios, assim como o efeito

da adição de diferentes fontes de nitrogênio durante o crescimento *in vitro* do micélio biotrófico de *C. pernicioso*.

Na biblioteca BIO também foram anotados transcritos com similaridade a quinases, fosfatases e glucosilases. Estes resultados indicam uma intensa síntese e reaproveitamento de proteínas e glucoproteínas, assim como a possível ativação de cascatas de sinalização nesta fase do desenvolvimento do fungo. A presença das peptidases também poderia indicar grandes esforços dirigidos à defesa do fungo contra possíveis peptídeos tóxicos produzidos pela planta.

Esta intensa atividade metabólica resulta interessante em vista de que o crescimento do micélio biotrófico dentro da planta durante a instalação da doença é quase imperceptível, sendo muito difícil de observar hifas do micélio biotrófico no cacauzeiro infectado, mesmo quando este apresenta sinais evidentes da doença. As hifas do micélio biotrófico concentram-se na base do ramo infectado e seu crescimento é quase desprezível, indicando que a alta atividade metabólica não está sendo utilizada para o crescimento do fungo nesta fase. O crescimento acelerado do fungo dá-se na fase saprotrófica, após a morte do ramo (EVANS, 1980; GRIFFITH e HEDGER, 1994c; SILVA e MATSUOKA, 1999). Assim, a intensa síntese de proteínas poderia estar relacionada à aceleração da resposta hipersensitiva da planta, ao produzir peptídeos como o fator de necrose e outros desconhecidos que causariam um desbalanço hormonal na planta, produzindo os conhecidos sintomas da VB (hipertrofia e hiperplasia dos tecidos afetados).

Outros alinhamentos significativos que resultam de interesse para o processo de doença seria a presença de estomatina e proibitina na biblioteca de micélio biotrófico. As proibitinas constituem um grupo de proteínas altamente conservadas com funções no controle do ciclo celular, senescência e morte. As estomatinas são proteínas integrais de membrana que regulam o transporte de cátions univalentes. Estas duas famílias de proteínas estão relacionadas estruturalmente entre elas e com proteínas indutoras da resposta hipersensitiva em plantas (similares a NG1 de tabaco), levando a que os três grupos sejam considerados uma única superfamília, tendo mecanismos moleculares equivalentes. Em milho, transcritos mostrando similaridade a estes três grupos estariam envolvidos na resposta hipersensitiva e morte celular através da

regulação da atividade de canais de íons (NADIMPALLI *et al.*, 2000). A presença de clusters com similaridade a proibitina e estomatina de outros fungos expressos no micélio biotrófico de *C. pernicioso* se encaixa na hipótese discutida anteriormente que sugere que o fungo causa e/ou acelera a resposta hipersensitiva do ramo de cacau infectado para poder completar assim seu ciclo de vida. Esta hipótese também é reforçada por outros trabalhos desenvolvido no LGE, como o da doutoranda Leandra Scarpari, quem encontrou que a morte da planta poderia ser uma consequência direta do metabolismo do fungo durante a fase biotrófica (SCARPARI *et al.*, 2005).

Na Tabela 5.2 encontram-se resumidos todos os genes encontrados nas quatro bibliotecas cuja análise indica uma possível função na patogenicidade em base à função destes genes em outros organismos fitopatogênicos. É importante destacar que a função na patogenicidade de um determinado gene deve ser comprovada experimentalmente por inativação do gene e comprovação da atenuação da virulência ou patogenicidade do fungo contra seu hospedeiro, sempre que o gene não seja essencial para completar o ciclo de vida do patógeno (IDNURM e HOWLETT, 2001). Adicionalmente, devemos destacar que em vista do ciclo de vida hemibiotrófico de *C. pernicioso* e do fato de ser um basidiomiceto (os quais têm sido pouco seqüenciados), é muito provável que muitos dos genes importantes na patogenicidade deste fungo sejam inéditos e não possam ser identificados a partir da comparação com genes de patogenicidade descritos em outros fungos. Também é provável que existam micro-RNAs em nossas bases de dados, os quais ainda não podem ser identificados por comparação com as bases de dados pública. Assim, esforços devem ser dirigidos à caracterização daqueles genes de função desconhecida que mostram uma alta similaridade com o genoma de *C. pernicioso* e que são expressos preferencialmente na presença de extratos de cacau ou no micélio biotrófico, o qual constitui a fase parasítica deste fungo. Contudo, a análise destes genes de patogenicidade descritos anteriormente pode apontar para alguns mecanismos comuns que podem ser de utilidade na elucidação dos mecanismos de patogenicidade de *C. pernicioso*.

A relação de todos os unigenes que mostraram similaridade com as bases de dados é mostrada no Anexo B, Tabela 8.3.

**Tabela 5.2.** Clusters com similaridade a genes de patogenicidade de outros patógenos.

	BIBLIOTECA		ORGANISMO	E-VALUE
<b>ESTRESSE OXIDATIVO</b>				
1	CAC	NADPH oxidase	<i>Emericella nidulans</i>	2,00E-15
2	CAC	Manganese-superoxide dismutase	<i>Ganoderma microsporum</i>	9,00E-72
3	BIO, CAC	Manganese-superoxide dismutase	<i>Paxillus involutus</i>	4,00E-80
4	BIO	Peroxidase TAP	<i>Termitomyces albuminosus</i>	2,00E-44
5	BIO, GLI	Putative copper amine oxidase	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-28
6	BIO, SUB	phenylalanine ammonium lyase	<i>Amanita muscaria</i>	1,00E-21
7	BIO	Glyoxal oxidase 1	<i>Ustilago maydis</i>	7,00E-16
<b>METABOLISMO DE LIGNINA</b>				
8	CAC	1,4-benzoquinone reductase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	6,00E-33
9	CAC	Laccase	<i>Rigidoporus microporus</i>	4,00E-13
10	SUB	Laccase	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	2,00E-18
11	GLI	Aryl-alcohol oxidase precursor	<i>Pleurotus eryngii</i>	1,00E-11
<b>METABOLISMO DE TOXINAS</b>				
12	CAC	Cytochrome P450	<i>Agaricus bisporus</i>	4,00E-33
13	CAC	Cytochrome P450	<i>Lentinula edodes</i>	5,00E-16
14	CAC, SUB	Cytochrome P450	<i>Agaricus bisporus</i>	2,00E-24
15	SUB	Related to cytochrome p450	<i>Neurospora crassa</i>	2,00E-07
16	SUB	OMST oxidoreductase (cyt. p450)	<i>Aspergillus flavus</i>	2,00E-06
17	CAC	Glutathione-s-transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,00E-13
18	GLI	Glutathione s transferase	<i>Gibberella zeae</i>	2,00E-13
19	CAC	30 KD Heat Shock Protein	<i>Emericella nidulans</i>	3,00E-07
20	SUB	Heat Shock Protein 70 KD	<i>Pneumocystis carinii</i>	1,00E-34
21	CAC	similarity to Mmf1p	<i>Neurospora crassa</i>	6,00E-16
22	CAC, GLI	Kp4 Toxin; Chain: A, B;	<i>Ustilago maydis</i>	1,00E-10
23	CAC	Thaumatococin-like protein	<i>Zea mays</i>	7,00E-11
<b>PATOGENICIDADE OUTROS ORGANISMOS</b>				
24	GLI	Malate synthase protein	<i>Laccaria bicolor</i>	6,00E-41
25	CAC	Malate synthase protein	<i>Laccaria bicolor</i>	4,00E-29
26	CAC	Neutral Trehalase (alfa,alfa-trahalase)	<i>Aspergillus nidulans</i>	5,00E-26
27	GLI	Pathogenesis-related protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,00E-09
28	GLI	CFEM conserved domain	<i>Aspergillus nidulans</i>	8,00E-06
29	GLI	CFEM conserved domain	<i>Gibberella zeae</i>	5,00E-09
30	BIO	Glucuronyl hydrolase	<i>Agaricus bisporus</i>	2,00E-30
31	GLI, BIO	Potential cell surface antigen	<i>Candida albicans</i>	8,00E-08
32	BIO	GABA transporter	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,00E-28
33	BIO	Succinic semialdehyde dehydrogenase	<i>Legionella pneumophila</i>	2,00E-32
<b>RESPOSTA HIPERSENSITIVA EM PLANTAS</b>				
34	BIO, GLI	Copper transporter	<i>Pleurotus ostreatus</i>	4,00E-19

35	BIO	Prohibitin PHB1, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-32
36	BIO	Stomatin-like protein, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-23
37	BIO	Pathogenicity protein	<i>Magnaporthe grisea</i>	3,00E-12
<b>PROTEASES E PEPTIDASES</b>				
38	BIO	Leucyl aminopeptidase, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	6,00E-22
39	BIO	Proteasome subunit, beta type 1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	8,00E-44
40	BIO	Zinc carboxypeptidase	<i>Aspergillus nidulans</i>	4,00E-15
41	BIO	Putative aspartyl-proteinase	<i>Pleurotus sp.</i>	2,00E-21
<b>OUTROS</b>				
42	CAC	WW domain-containing oxidoreductase	<i>Gibberella zeae</i>	4,00E-16
43	CAC	Gag polyprotein (retrotransposon)	<i>Takifugu rubripes</i>	3,00E-07

Genes cuja seqüência mostra similaridade significativa com proteínas envolvidas na geração e ou proteção do estresse oxidativo:

1) “NADPH oxidase”: As enzimas NADPH oxidases (Nox) estão envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e são conservadas em todos os eucariontes. No caso de animais e plantas, a produção de EROs pelas Nox está associada à infecção por patógenos e desatam cascatas de sinalização dirigidas a causar a morte do patógeno ou, no caso da resposta hipersensitiva em plantas, a morte celular programada do tecido afetado. No caso de fungos, a produção de EROs pelas Nox tem sido pouco estudada, mas em *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans* estas EROs desatam cascatas de sinalização essenciais no controle do ciclo de vida e diferenciação celular durante a reprodução sexual (LARA-ORTIZ *et al.*, 2003). No caso de *C. pernicioso*, a produção de EROs também poderia estar associada à indução de uma resposta hipersensitiva no tecido infectado do cacauzeiro, sendo que a morte deste tecido é necessária para o patógeno poder completar seu ciclo de vida.

2, 3) “Manganese superoxide dismutase”: Esta enzima tem um papel fundamental na mutação de radicais livres ( $O^{\cdot -}$  a  $H_2O_2$ ), os quais podem ser produto da defesa da planta ou gerados pelo próprio fungo.

4) “Peroxidase TAP”: Em vista da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a resposta hipersensitiva da planta em reação à infecção por *C. pernicioso*, a atividade de peroxidase no fungo resultaria importante na defesa das hifas contra a atividade dos radicais livres.

5) “Putative copper amine oxidase”: Estas enzimas catalisam a deaminação oxidativa de aminas primárias aos aldeídos correspondentes com a redução concomitante de oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio. Este radical livre poderia atuar na resposta hipersensitiva da planta ou ser degradado por algumas das enzimas com atividade peroxidase.

6) “Phenylalanine ammonium lyase”: Esta enzima é a primeira na via do fenilpropanoide, um precursor dos flavonóides, os quais podem funcionar como fitoalexinas e/ou antioxidantes (SOLORZANO *et al.*, 1996; TROGNITZ *et al.*, 2002; SCARPARI *et al.*, 2005). Como fitoalexinas, estes flavonóides participariam na explosão oxidativa que acontece nos primeiros estágios de defesa da planta contra patógenos, reforçando a hipótese levantada em relatórios anteriores, sugerindo que o fungo contribui para a formação de radicais livres que acelerem a resposta hipersensitiva na planta.

7) “Glyoxal oxidase 1”: Esta enzima oxida aldeídos de cadeia curta (<C4) e produz peróxido de hidrogênio. Em *Ustilago maydis* foi demonstrado que este gene é essencial para o crescimento filamentosos e a patogenicidade (LEUTHNER *et al.*, 2005), reforçando mais ainda a hipótese anterior.

Genes cuja seqüência mostra similaridade significativa com proteínas envolvidas no metabolismo de lignina:

8) “1,4-benzoquinone reductase”: Esta enzima está envolvida na degradação de lignina presente na parede celular da planta. Esta enzima tem sido encontrada em numerosos fungos degradadores de madeira (AKILESWARAN *et al.*, 1999).

9, 10) “Laccase”: também envolvida na degradação da lignina presente na parede celular da planta e tem sido descrita em numerosos fungos degradadores de madeira; poderia ter um papel adicional na produção dos basidiomas (LIU *et al.*, 2003). Adicionalmente, já foi relatado que a lacase de *C. perniciosus* é capaz de degradar o ácido 3-indole acético (auxina) *in vitro*, podendo causar assim um desbalanço citokina/auxina que tem sido sugerido como responsável pelos sintomas característicos da doença VB (KRUPASAGAR e SEQUEIRA, 1969).

11) “Aryl-alcohol oxidase precursor”: outra enzima envolvida na degradação da lignina presente na parede celular da planta, tem sido descrita em numerosos fungos degradadores de madeira (GUILLEN *et al.*, 1992).

Genes cuja seqüência mostra similaridade significativa com proteínas envolvidas com o metabolismo de toxinas:

12, 13, 14 e 15) “Cytochrome P450”: importante na detoxificação de toxinas lipossolúveis produzidas pela planta (PANWAR *et al.*, 2001; LEROUX *et al.*, 2002; KHAN *et al.*, 2003).

16) “O-methylsterigmatocystin oxidoreductase”: Esta enzima é importante na formação de aflatoxinas e também é parte da família do citocromo P450 importante na detoxificação de toxinas produzidos pela planta, tais como as fitoalexinas (PANWAR *et al.*, 2001; LEROUX *et al.*, 2002; KHAN *et al.*, 2003).

17, 18) “Glutathione-s-transferase”: as glutathione-transferases são proteínas que auxiliam no metabolismo de toxinas ao catalisar a transferência destas toxinas a uma molécula de glutathione. A molécula de glutathione possui uma asa pela qual a célula pode exportar a toxina conjugada. A presença destes genes já tem sido reportada em outros fungos fitopatogênicos como *Botrytis cinerea* e tem sido considerado um possível fator de virulência que permite que o fungo tolere compostos potencialmente fungitóxicos produzidos pela planta (PRINS *et al.*, 2000). A expressão desta proteína por *C. perniciososa* pode auxiliar na detoxificação de compostos produzidos pelo cacauzeiro.

19, 20 e 21) “Heat Shock Protein”: As Heat shock proteins estão envolvidas na proteção contra diversas condições de estresse, incluindo a resistência a drogas (KARABABA *et al.*, 2004).

22) “Kp4 Toxin”: A toxina KP4 de *Ustilago maydis* é codificada por um micovírus cujo material genético é RNA dupla-fita. Esta toxina inibe o crescimento de outros fungos ou de outras cepas de *U. maydis* que não estejam infectadas com o vírus (PARK *et al.*, 1994; GAGE *et al.*, 2002). A presença de uma toxina similar em *C. perniciososa* poderia ter implicações na colonização do hospedeiro ao impedir o crescimento de outros fungos competidores, incluindo os da própria espécie. Esta

estratégia pode ser bem sucedida em *C. perniciosus* já que este patógeno possui uma estratégia reprodutiva homotálica (autofértil).

23) “Thaumatin-like protein”: As taumatinas são proteínas da família das osmotinas secretadas por plantas; estas enzimas inibem o crescimento de fungos fitopatogênicos e possuem um sabor intensamente doce o qual é conferido aos tecidos que a produzem (FRENDON *et al.*, 1992). A expressão desta proteína por *C. perniciosus* poderia estar relacionada à inibição do crescimento de outros fungos competidores. O estudo deste gene desde o ponto de vista da transferência horizontal seria de interesse.

Genes cuja seqüência mostra similaridade significativa com proteínas envolvidas em mecanismos de patogenicidade de outros organismos:

24, 25) “Malate synthase”: Esta enzima é uma das duas enzimas principais do ciclo do glioxilato, o qual repõe intermediários ao ciclo de Krebs, e seu papel na patogenicidade tem sido comprovado na bactéria *Rhodococcus fascians* e nos fungos fitopatogênicos *Leptosphaeria maculans* e *Cryptococcus neoformans* (LORENZ e FINK, 2001; VEREECKE *et al.*, 2002; IDNURM e HOWLETT, 2002; RUDE *et al.*, 2004).

26) “Neutral Trehalase (alfa,alfa-trahalase)”: tem sido demonstrado que as trehalases neutras possuem um papel fundamental na esporulação de fungos fitopatogênicos protegendo os esporos de situações de estresse. Seu papel na patogenicidade tem sido demonstrado em *Magnaporthe grisea* sendo que a inativação deste gene causa falhas na colonização de tecidos e uma conseqüente diminuição na fitopatogenicidade deste fungo (D'ENFERT *et al.*, 1999; FOSTER *et al.*, 2003).

27) “Pathogenesis-related protein”: similar a “Human glioma pathogenesis protein” indicando similaridade entre o sistema de defesa das plantas e o sistema imune humano, a função desta proteína é desconhecida (referência não publicada). Também apresentou similaridade com “pathogen related protein” de *Saccharomyces cerevisiae* (E-value 1E-08) e a proteínas hipotéticas de fungos patogênicos como *Candida albicans* e *Ustilago maydis*.



28, 29) Homologia com domínio conservado CFEM contendo oito cisteínas, este domínio está presente em proteínas extracelulares de membrana em fungos e possui função na patogenicidade (Dos 65 resíduos deste domínio o 95% alinhou com o read, E-value 1E-05) (KULKARNI *et al.*, 2003). Este read apresentou similaridade com diversas proteínas hipotéticas de vários fungos fitopatogênicos como *Gibberella zeae* e *Ustilago maydis* (E-value 1E-09).

30) "Glucuronyl hydrolase": Esta enzima participa na degradação completa de glucoaminoglicanos e resulta essencial para a virulência de organismos patogênicos, podendo ser essencial na penetração da parede celular da planta (EASTWOOD *et al.*, 2001).

31) "Potential cell surface antigen": Contendo o domínio conservado CFEM que possui oito cisteínas, este domínio está presente em proteínas extracelulares de membrana em fungos e possui função na patogenicidade (Dos 65 resíduos deste domínio o 95% alinhou com o read, E-value 1E-05) (KULKARNI *et al.*, 2003).

32, 33) "GABA transporter" e "succinic semialdehyde dehydrogenase": Enzimas que participam do metabolismo de GABA que estão presentes apenas na fase biotrófica de *C. pernicioso*. Sua expressão pode estar relacionada ao aproveitamento do GABA como fonte de nitrogênio no fluido apoplástico durante a fase biotrófica.

Genes cuja seqüência mostra similaridade significativa com proteínas envolvidas na resposta hipersensitiva (RH) em plantas:

34) "Copper transporter": O metal cobre possui atividade redox e constitui um cofator essencial em processos biológico críticos como a respiração celular e o transporte de ferro. Esta família altamente conservada de transportadores com alta afinidade pelo cobre atua na toma de cobre na membrana plasmática. No caso particular de *C. pernicioso*, um transportador de cobre poderia ser de grande importância no processo de fitopatogenicidade já que a ligação do etileno no receptor de membrana requer cobre como cofator (CHANG e SHOCKEY, 1999), e tem sido estabelecido que durante o processo de instalação da VB há um aumento significativo na produção de etileno na vassoura verde (WOJTASZEK, 2005; SCARPARI *et al.*, 2005).

35) “Prohibitin PHB1, putative”: Como mencionado anteriormente, as proibitinas constituem um grupo de proteínas altamente conservadas com funções no controle do ciclo celular, senescência e morte. Junto com as estomatinas e algumas proteínas indutoras da resposta hipersensitiva em plantas (similares a NG1 de tabaco) constituem uma única superfamília que poderiam atuar na resposta hipersensitiva em plantas (NADIMPALLI *et al.*, 2000).

36) “Stomatin-like protein, putative”: As estomatinas são proteínas integrais de membrana que regulam o transporte de cátion univalentes e estão relacionadas estruturalmente às proibitinas e a algumas proteínas indutoras de resposta hipersensitiva em plantas (NADIMPALLI *et al.*, 2000).

37) “Pathogenicity protein”: Pertencente à família HVA22. Esta família é encontrada em membros de uma grande variedade de eucariontes, incluindo a proteína de planta HVA22 abscisic acid-induced protein, a qual é considerada uma proteína regulatória. Em *Magnaporthe grisea*, esta proteína teve sua participação no processo de patogenicidade confirmado (FUJIMOTO *et al.*, 2002).

Genes cuja seqüência mostra similaridade significativa com proteases e psptidases:

38, 39, 40 e 41) Proteases e peptidases diversas encontradas na biblioteca de micélio biotrófico. A intensa produção deste tipo de enzimas poderia indicar sua participação na defesa do fungo contra os mecanismos de defesa da planta para poder estabelecer a doença.

Genes cuja seqüência mostra similaridade significativa com proteínas envolvidas em outros processos de interesse:

42) “WW domain-containing oxidoreductase”: este tipo de oxidoreductases tem sido descritas principalmente em células antitumorais de vertebrados e induz a morte celular programada destas células (YENDAMURI *et al.*, 2003).

43) “Gag polyprotein (retrotransposon)”: A presença de retrotransposons ao longo do genoma de *C. perniciosus* tem sido verificada e correlacionada com a geração de variabilidade genética neste fitopatógeno homotálico, permitindo sua adaptação ao hospedeiro a talvez sendo responsável pela quebra de resistência do cacauero (RINCONES *et al.*, 2006).

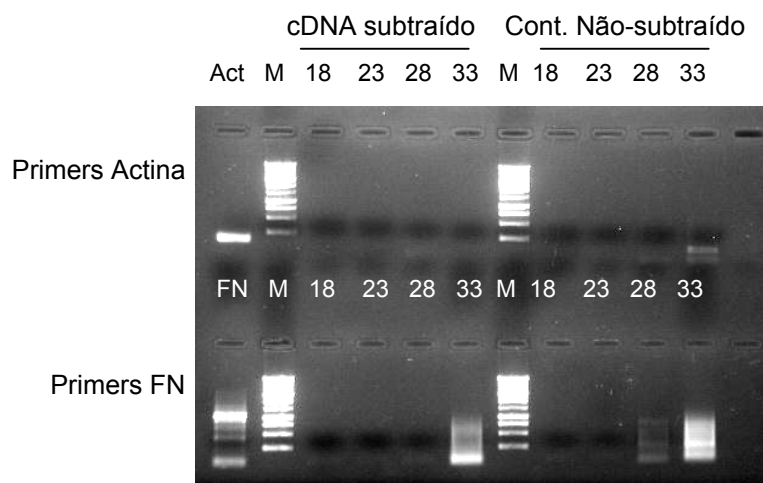
Em vista destes resultados, existem fortes indícios de que a participação de enzimas produtoras de EROs, as quais foram identificadas no micélio saprotrófico induzido com extratos de cacau e no micélio biotrófico, resulta de grande importância para o estabelecimento da doença. Igualmente resulta interessante que muitos dos genes produzidos pelo fungo durante a interação com o hospedeiro apresentam similaridade significativa com proteínas que participam na resposta hipersensitiva em plantas, sugerindo assim que o fungo não unicamente aguarda a ser reconhecido como um patógeno pela planta, mas também participa ativamente mimetizando as respostas de uma planta infectada, com o aparente objetivo de acelerar a morte do ramo infectado.

No primeiro momento da doença, o ramo infectado cresce aceleradamente com características hipertróficas e hiperplásicas, sugando assim uma grande quantidade de nutrientes; nesta fase a presença do fungo na planta é quase imperceptível. Após aproximadamente 60 dias de infecção, o ramo morre e o fungo muda de fase, colonizando rapidamente o tecido morto. Se a morte do ramo for acelerada o suficiente, é provável que a planta não tenha tempo de recuperar os nutrientes que foram deslocados para o ramo em crescimento. Desta maneira, a fase saprotrófica do fungo pode colonizar um tecido morto, mas muito rico em nutrientes, permitindo seu desenvolvimento acelerado e a produção de basidiomas. Até o momento, temos identificado genes do fungo envolvidos em causar uma resposta hipersensitiva na planta que culminaria na morte do tecido infectado e também genes que podem interferir no balanço hormonal da planta, o qual pode ser responsável pelo crescimento hipertrófico e hiperplásico durante o primeiro estágio da doença. Entre estes genes se encontram a lacase que é capaz de degradar a auxina *in vitro*, podendo causar assim um desbalanço citokinina/auxina; o transportador de cobre, já que o cobre é um cofator essencial na ligação do hormônio etileno aos respectivos receptores; e a proteína da família HVA22 que é induzida por ácido absícico, outro hormônio de plantas. Estes três genes podem constituir um indício da participação do fungo no desbalanço hormonal da planta, mas ainda não apresentam evidências contundentes. Também desconhecemos se existe um sinal específico que induz a mudança de fase para o micélio saprotrófico. Talvez o estudo sistematizado da expressão do

micélio do fungo desde a esporulação, micélio biotrófico, micélio saprotrófico e basidioma seja capaz de apresentar maiores evidências.

### 5.3.2. Validação da Subtração Cacau menos Glicose

#### 5.3.2.1. Validação por PCR semi-quantitativo



**Fig. 5.4.** Validação da eficiência da hibridação subtrativa Cacau-Glicose por PCR semiquantitativo. Cada jogo de primers específicos (Actina ou Fator de Necrose-FN) foi utilizado para amplificar cada gene a partir de duas populações de cDNA a comparar: cDNA subtraído, produto da PCR secundária do processo de hibridação subtrativa Cacau-Glicose; e Controle não-subtraído, o qual é um controle gerado a partir da ligação do cDNA *tester* (Cacau) a ambos os adaptadores e submetido às PCRs de supressão primária e secundária. **M)** Marcador de peso molecular 1 kb ladder (Promega); **Act)** Controle positivo da amplificação do gene de Actina utilizando primers específicos a partir de cDNA do micélio biotrófico obtido por amplificação SMART (Clontech); **FN)** Controle positivo da amplificação do gene do Fator de Necrose utilizando primers específicos a partir de cDNA do micélio biotrófico obtido por amplificação SMART (Clontech); **18, 23, 28, 33)** Número de ciclos após os quais foram detidos os produtos da amplificação para poder observar sua acumulação gradual, permitindo assim inferir qual população possui uma maior concentração inicial do gene. Gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/mL brometo de etídio.

Com este ensaio também pretendemos validar o processo de subtração, verificando que seqüências presentes nas populações *tester* e *driver* de cDNA foram eficientemente subtraídas no processo de hibridação subtrativa por supressão (SSH). Para este ensaio comparamos a abundância relativa de dois genes de expressão constitutiva (Fator de Necrose e Actina) em duas populações de cDNA: Subtraída Cacau-Glicose e Controle Não Subtraído, mediante uma reação de PCR semiquantitativo. Os produtos da reação foram coletados após 18, 23, 28 e 33 ciclos para poder observar o acúmulo gradativo do produto da reação

e não simplesmente o produto acumulado no final da reação, o que dificultaria a interpretação dos resultados. Os resultados são apresentados na Fig. 5.4.

Na Fig. 5.4. é possível observar que ambos os genes selecionados encontram-se num número inferior de cópias na população subtraída quando comparada à população não subtraída. Isto resulta evidente quando vemos que o gene de Actina só pôde ser amplificado a partir da população controle, a partir da qual tornou-se visível após os 33 ciclos da reação. Para o gene do fator de necrose vemos que houve uma diminuição no número de cópias deste transcrito na população subtraída, já que na população controle foi possível observar o produto da reação após 28 ciclos, enquanto que a partir da população controle um produto indefinido (sem bandas definidas) aparece só após os 33 ciclos. Estes resultados também corroboram os resultados obtidos para o northern reverso, indicando que a subtração Cacau-Glicose por SSH foi bem sucedida.

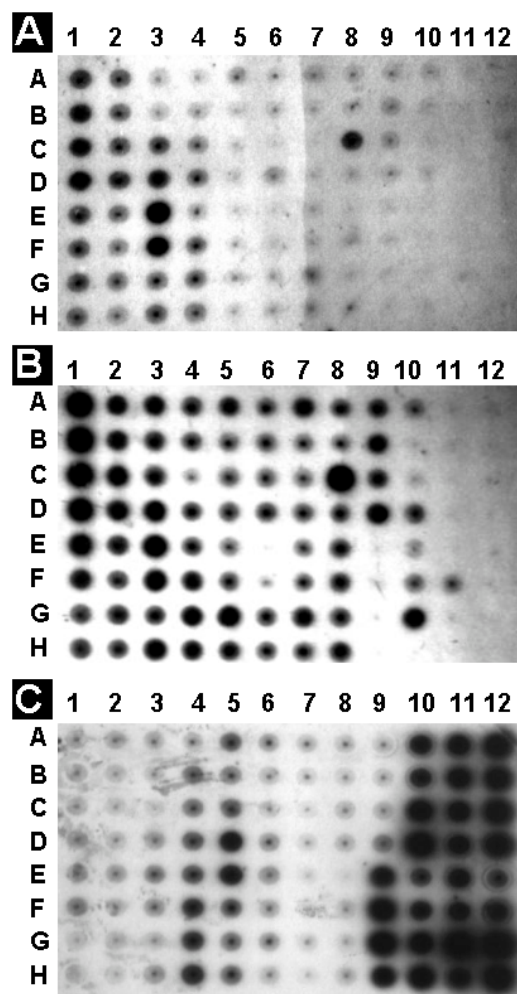
Os ensaios de PCR semiquantitativa e Northern Reverso permitiram a validação do processo de subtração Cacau-Glicose de duas maneiras independentes. Assim, é possível confiar nos resultados do seqüenciamento da biblioteca subtrativa SAP-SUB, precisando validar por ensaio tipo northern só aqueles transcritos chaves na interpretação dos possíveis mecanismos de fitopatogenicidade de *C. pernicioso*.

#### **5.3.2.2. Validação por Northern Reverso**

A Fig. 5.5. mostra os resultados da hibridação tipo dot-blot dos 96 clones selecionados contra três sondas diferentes: A) cDNA do fungo crescido em Glicose; B) cDNA do fungo crescido em Cacau; e C) cDNA subtraído Cacau-Glicose. A presença ou ausência de sinal, assim como a intensidade do mesmo, foi registrado para cada spot e estes resultados foram interpretados segundo a categoria pela qual foram selecionados os clones. De acordo com a análise realizada, os 22 clones na Categoria 1 (Constitutivos) tiveram sua expressão constitutiva confirmada, tendo apresentado sinal quando hibridados contra as sondas Cacau e Glicose, mas não contra a sonda subtrativa Cacau-Glicose, indicando ainda que foram eficientemente subtraídos no processo de hibridação subtrativa por supressão. Dos 11 clones classificados na categoria 2

(diferencialmente expressos na presença de Cacau), apenas seis tiveram sua expressão diferencial confirmada, enquanto os cinco restantes apresentaram sinal de hibridação equivalente quando comparadas as sondas Cacau e Glicose, indicando assim que sua expressão é constitutiva e seu aparecimento na biblioteca subtrativa Cacau-Glicose constitui falsos positivos. Contrariamente, dos 17 clones selecionados na categoria 3 (possíveis falsos positivos) apenas um foi confirmado como falso positivo enquanto os restantes 16 apresentaram expressão diferencial na presença de Cacau. Estes clones tinham sido selecionados por terem aparecido nas três bibliotecas, porém, seu sinal de hibridação contra a sonda de Glicose foi muito fraco em comparação às sondas Cacau e Subtrativa, indicando que são expressos na presença de Glicose, mas em baixo número de cópias; assim, sua expressão é mais intensa na presença de extratos de cacau. Adicionalmente, foram selecionados 46 clones de interesse (Categoria 4: com possível papel no processo de fitopatogenicidade e/ou alta redundância nas bibliotecas SAP-CAC ou SAP-SUB) com o intuito de verificar se apresentam expressão diferencial na presença de Cacau. Destes clones, 37 apresentaram expressão diferencial enquanto os nove restantes demonstraram ter expressão constitutiva.

Todos os 28 clones selecionados da biblioteca subtrativa (Cacau-Glicose) mostraram uma maior intensidade de hibridação contra a sonda Subtrativa, em comparação com as outras sondas, mas apenas dois desses clones mostraram hibridação significativa contra a sonda Cacau e nenhum hibridou contra a sonda Glicose. Este resultado pode ser explicado por estes clones representarem transcritos raros expressos unicamente na presença de Cacau, os quais são preferencialmente enriquecidos pelo processo de SSH, e cujo nível de expressão não permitiria sua observação na hibridação contra a sonda Cacau através deste ensaio. Adicionalmente, é possível que tenha ocorrido uma digestão incompleta dos adaptadores, os quais podem causar um sinal mais intenso quando os clones foram hibridados contra a sonda subtrativa. Independentemente, o fato de nenhum deste clones ter hibridado contra a sonda Glicose indica que são fortes candidatos a ter uma expressão diferencial.



**Fig. 5.5.** Resultados da validação tipo Northern Reverse a partir da hibridação tipo dot blot dos produtos de PCR apresentados na fig. 3.1, numa concentração de 200 ng por spot, contra três sondas diferentes: **A)** Sonda cDNA do micélio de *C. perniciosa* crescido em Glicose; **B)** Sonda cDNA do micélio crescido em Cacau; **C)** Produto da PCR secundária do processo de hibridação subtrativa por supressão Cacau-Glicose digerido com *Rsa* I para remoção dos adaptadores. Foram utilizados 400 ng de cada sonda marcada isotópicamente. O tempo de exposição foi de 72 horas. As letras e números se referem a posição dos clones na placa de 96 poços.

Em conclusão, este ensaio permitiu validar o processo de subtração, já que apenas seis clones (cinco da categoria 2 e um da categoria 3) puderam ser identificados como falsos positivos. Os clones da categoria 4 foram selecionados em base a sua participação em processos celulares que pareciam ser induzidos pela presença de extratos de cacau (apresentando alta redundância nas bibliotecas SAP-CAC e SAP-SUB) e também por sua possível participação em processos de fitopatogenicidade. Dentre destes processos destacam-se a respiração celular (citocromos, formato de desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup>, etc.), a degradação de proteínas (Ubiquitinas), a secreção de toxinas antibióticas

(Thaumatococcus e KP4) e alguns transcritos que não puderam ser identificados por não apresentarem similaridade com as bases de dados públicas, mas que mostraram alta redundância na biblioteca subtrativa (No Hits). A maioria destes clones de interesse (37, representando o 80% dos clones nesta categoria), representando os seguintes 25 contigs, demonstraram ter expressão diferencial na presença de extratos de cacau: aminolevulinatase (8E-46), CFEM conserved domain (8E-6), Cytochrome b5 (2E-21), cytochrome c oxidase (2E-48), cytochrome P450 (4E-33), glutathione-s-transferase (1E-13), heat shock protein 70 (1E-34), Kp4 Toxin (1E-10), Laccase (2E-18), Malate synthetase (4E-29), NAD-dep. formate dehydrogenase (4E-11), Neutral trehalase (5E-36), No hits (contig 27), No hits (contig 139), No hits (contig 150), No hits (contig 153), No hits (contig 172), No hits (contig 188), OMST oxidoreductase (2E-6), p14.5 protein (6E-16), Pathogenesis-related protein (4E-9), Polyubiquitin (4E-64), potential glutaredoxin (9E-21), subtilisin-like serine protease (9E-8), Thaumatococcus-like protein (7E-11), ubiquinone oxidoreductase (2E-24), ubiquitin-specific protease (1E-26), Unknown (4E-13), Unknown (4E-6), Unknown (5E-26). Apenas 9 (20%), agrupados em 8 contigs, mostraram expressão constitutiva: benzoquinone reductase (6E-33), gag polyprotein (retrotransposon, 3E-7), glycerol efflux/uptake protein (5E-9), Mitochondrial membrane protein (8E-47), NADPH oxidase (2E-15), Ubiquitin-conjugating enzyme (2E-54), Unknown (4E-6), WW oxidoreductase (4E-16). Assim, foi possível confirmar, mediante um ensaio independente, a interpretação feita com base na frequência de seqüenciamento dos clones para cada biblioteca. Os resultados desta análise são apresentados na Tabela 8.2 na seção 8. Anexos.

O ensaio aqui apresentado confirma apenas os resultados obtidos para a análise da expressão gênica do micélio saprotrófico do isolado CP02 crescido em extrato de cacau e glicose. Porém, pretendemos também utilizar este tipo de ensaio para validar, de maneira global, os resultados obtidos a partir da análise da biblioteca de micélio biotrófico do isolado BP10. Neste ensaio tipo dot blot serão fixados na membrana genes que apresentaram expressão diferencial no micélio biotrófico, e estes genes serão hibridados contra sondas de cDNA total obtido a partir do micélio biotrófico e a partir do micélio saprotrófico do isolado BP10 crescido nas exatas condições nas quais foi crescido o micélio biotrófico. Assim,



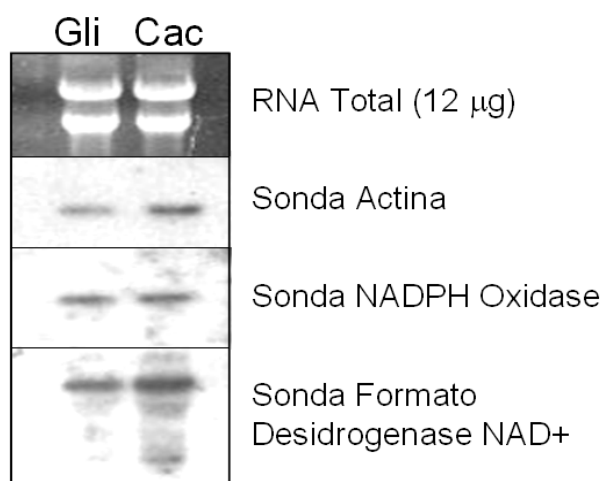
pretendemos confirmar se os genes encontrados na biblioteca de micélio biotrófico respondem apenas ao estado fisiológico ou se são uma resposta às condições do meio de cultura, independentemente do estágio de desenvolvimento. Para este ensaio, já foram confeccionadas as membranas contendo os genes de interesse discutidos acima, faltando apenas sua hibridação contra as duas sondas representando os dois estágios de desenvolvimento.

### **5.3.3. Validação da Expressão Diferencial de Clones de Interesse por Ensaios Tipo Northern Blot**

Até o momento só foi possível realizar o ensaio tipo northern utilizando as sondas Actina, NADPH oxidase e formato desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup>. É possível observar na Fig. 5.6 que as amostras de RNA provenientes do micélio do fungo crescido nos meios Glicose ou Cacau foram carregadas equivalentemente, já que tanto as bandas de RNA ribossomal como a hibridação com a sonda preparada a partir da amplificação do gene da Actina mostram intensidades similares em ambas as amostras. Também pode ser verificado na Fig. 5.6 que a hibridação com a sonda correspondente a NADPH oxidase mostra intensidade similar para ambas as populações de RNA, indicando que este gene apresenta expressão constitutiva para as duas condições testadas e coincidindo assim com os resultados do northern reverso (poço D06, Fig. 5.5). Para a sonda correspondente a formato desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup> sim foi possível verificar a expressão diferencial, sendo que esta sonda hibridou com maior intensidade contra amostra de RNA extraído após crescimento em extrato de cacau (Fig. 5.6). Este resultado também coincide com os resultados do northern reverso (poço G10, Fig. 5.5) e com a alta redundância observada para este transcrito nas bibliotecas de SAP-CAC e SAP-SUB.

Adicionalmente a estes dois genes, pretendemos completar as análises tipo northern blot para validar os resultados da análise de ESTs de micélio saprotrófico crescido em cacau ou glicose utilizando como sondas genes relacionados com: detoxificação de toxinas da planta (Cytochrome p450), reaproveitamento de proteínas (ubiquitina), algumas toxinas (Thaumatococcus e KP4), uma enzima que atua na formação dos grupos heme das porfirinas e que é encontrada de maneira redundante na biblioteca SAP-SUB (Aminolevulinic acid

synthase), e alguns clones sem similaridade com as bases de dados públicas (No hits) que parecem ser preferencialmente expressos na presença de extratos de cacau, podendo estar envolvidos no processo de patogenicidade. Todos estes clones já tinham sido selecionados para a análise da expressão por northern reverso, tendo na maioria dos casos sua expressão diferencial confirmada. Porém, ensaios tipo northern reverso não possuem a sensibilidade que só pode ser obtida por ensaios tipo northern blot ou Real Time-PCR. Em conseqüência, clones mostrando similaridade significativa (BLASTx com E-value  $\leq 10E-10$ ) com estes genes serão utilizados como sonda para completar os ensaios tipo northern blot.



**Fig. 5.6.** Northern blot do RNA de *C. pernicioso* extraído do micélio saprotrófico do isolado CP02 crescido em glicose ou extrato de cacau contra três sondas: Actina, NADPH oxidase e formato desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup>. O RNA extraído aos diferentes tempos de crescimento (24 h, 48 h, 72 h, 6 dias e 8 dias) foi combinado e concentrado numa única amostra para cada tipo de médio (Cacau ou Glicose). Foram carregados 12 µg de RNA total por poço e foram realizadas duas réplicas da membrana.

Adicionalmente, pretendemos realizar ensaios tipo northern blot para confirmar a expressão diferencial dos genes encontrados na biblioteca de micélio biotrófico do isolado BP10. Para estes ensaios serão confeccionadas membranas contendo o RNA total extraído dos micélios biotrófico e saprotrófico do isolado BP10 crescidos sob as mesmas condições de cultura, além das amostras de RNA total do micélio saprotrófico do isolado CP02 crescido em glicose ou extrato de cacau. Assim, utilizando uma única membrana será possível verificar a expressão de genes selecionados nas quatro condições, o que permitirá comprovar se a expressão dos genes encontrados na biblioteca de micélio biotrófico responde

apenas ao estado fisiológico ou também às condições de cultura. Membranas contendo o RNA obtido nas quatro condições já foram preparadas e aguardam hibridação.

Estas confirmações são necessárias para poder submeter uma publicação dos resultados aqui apresentados. Adicionalmente a estas confirmações, também realizaremos uma anotação detalhada dos genes aqui descritos para que estes possam ser submetidos ao GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>), o que também é um requisito para a submissão do manuscrito a uma revista arbitrada.

#### **5.4. AGRADECIMENTOS**

À FAPESP (No. Processo 02/09280-1), ao CNPq (No. Processo 471609/2003-0), à Cargill e à SEAGRI pelo apoio financeiro. Ao Alan Pomela e à Fazenda Almirante Cacau (Mars & Mars) por ter provido os esporos do isolado BP10 utilizados neste estudo.

#### **5.5. LITERATURA CITADA**

- AGRAWAL, N., DASARADHI, P. V. N., MOHMMED, A., MALHOTRA, P., BHATNAGAR, R. K., MUKHERJEE, S. K. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.67, n.4, p.657-685, 2003.
- AKILESWARAN, L., BROCK, B. J., CEREGHINO, J. L., GOLD, M. H. 1,4-benzoquinone reductase from *Phanerochaete chrysosporium*: cDNA cloning and regulation of expression. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.2, p.415-421, 1999.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Research*, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- ANDREWS, D. L., GARCÍA-PEDRAJAS, M. D., GOLD, S. E. Fungal dimorphism regulated gene expression in *Ustilago maydis*: I. Filament up-regulated genes. *Molecular Plant Pathology*, v.5, n.4, p.281-293, 2004.
- AUDIC, S., CLAVERIC, J. M. The Significance of Digital Gene Expression Profiles. *Genome Research*, v.7, n.10, p.986-995, 1997.

- BARTLEY, B. G. D. *Breeding for durable resistance in perennial crops*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1986. Cacao, *Theobroma cacao.*, p.25-42.
- BIRCH, P. R., AVROVA, A. O., DUVAN, J. M., LYON, G. D., TOTH, I. K. Isolation of potato genes which are induced during an early stage of the hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.12, p.356-361, 1999.
- BIRCH, P. R., KAMOUN, S. *New Technologies for Life Sciences: A Trends Guide*. 1.ed., New York: Elsevier Science, 2000. Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions, p.77-82.
- BOUCHÉ, N., FROMM, H. GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science*, v.9, n.3, p.110-115, 2004.
- BRAZILIAN MINISTRY OF AGRICULTURE. Brazilian Agriculture in Figures: Agriculture - Production, Acreage, Yield, Imports, Exports, States Main Producers. 1991-2000: Permanent Crops/cocoa. [<http://www.agricultura.gov.br/spa/indice02.htm>]. 2002.
- BROWN, J. R., SANSEAU, P. A computational view of micro-RNAs and their targets. *Drug Discovery Today*, v.10, n.8, p.595-601, 2005.
- CHANG, C., SHOCKEY, J. A. The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, v.2, n.5, p.352-358, 1999.
- CLEGG, N., EROGLU, B., FERGUSON, C., ARNOLD, H., MOORMAN, A., NELSON, P. S. Digital expression profiles of the prostate androgen-response program. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v.80, n.1, p.13-23, 2002.
- CRAMER, R. A., LAWRENCE, C. B. Identification of *Alternaria brassicicola* genes expressed in planta during pathogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Genetics and Biology*, v.41, n.2, p.115-128, 2004.
- D'ENFERT, C., BONINI, B. M., ZAPPELLA, P. D., FONTAINE, T., DA SILVA, A. M., TEREZI, H. F. Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, v.32, n.3, p.471-483, 1999.
- DE GARA, L., PINTO, M. C., TOMMASI, F. The antioxidant system vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.41, n.10, p.863-870, 2003.

- DELLAGI, A., BIRCH, P. R., HEILBRONN, J., AVROVA, A. O., MONTESANO, M., PALVA, E. T., LYON, G. D. A potato gene *erg-1* is rapidly induced by *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica*, *Phytophthora infestans*, ethylene and salicylic acid. *Journal of Plant Physiology*, v.157, p.201-205, 2000.
- DELLEDONE, M., MURGIA, I., EDERLE, D., SBICEGO, P. F., BIONDANI, A., POLVERARI, A., LAMB, C. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.40, n.6-8, p.605-610, 2002.
- DIATCHENKO, L., LAU, Y. F. C., CAMPBELL, A. P., CHENCHIK, A., MOQADAM, F., HUANG, B., LUKYANOV, S., LUKYANOV, K., GURSKAYA, N., SVERDLOV, E. D., SIEBERT, P. D. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, v.93, n.12, p.6025-6030, 1996.
- DOES, M. P., HOUTERMAN, P. M., DEKKER, H. L., CORNELISSEN, B. J. Processing, targeting, and antifungal activity of stinging nettle agglutinin in transgenic tobacco. *Plant Physiology*, v.120, n.2, p.421-432, 1999.
- EASTWOOD, D. C., KINGSNORTH, C. S., JONES, H., BURTON, K. S. Genes with increased transcript levels following harvest of the sporophores of *Agaricus bisporus* have multiple physiological roles. *Mycological Research*, v.105, n.10, p.1223-1230, 2001.
- ENGBRECHT, J., BRENT, R., KADERBHAI, M. A. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, U.S.A.: John Wiley and Sons, 1998. Unit 1.6. Minipreps of Plasmid DNA, p.1.6.1-1.6.3.
- ESKES, A. B., ENGELS, J. M. M., LASS, R. A. *Working procedures for cocoa germplasm evaluation and selection*. In *Proceedings of the CFC/ICCO/IPGRI Project Workshop. 1-6 February, 1998. Montpellier, France*. Montpellier: CFC/GRST/ICCO, 2000, 176 p.
- EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' broom disease of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*, v.74, n.6, p.515-526, 1980.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. C., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, v.8, n.3, p.175-185, 1998.
- FEINBERG, A. P., VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, v.132, n.1, p.6-13, 1983.

- FERNANDES, J., BRENDEL, V., GAI, X., LAL, S., CHANDLER, V. L., ELUMALAI, R. P., GALBRAITH, D. W., PIERSON, E. A., WALBOT, V. Comparison of RNA expression profiles based on maize expressed sequence tag frequency analysis and microarray hybridization. *Plant Physiology*, v.128, n.3, p.896-910, 2002.
- FOSTER, A. J., JENKINSON, J. M., TALBOT, N. J. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *EMBO Journal*, v.22, n.2, p.225-235, 2003.
- FRENDO, P., DIDIERJEAN, L., PASSELEGUE, E., BURKARD, G. Abiotic stresses induce a thaumatin-like protein in maize, cDNA isolation and sequence analysis. *Plant Science*, v.85, n.1, p.61-69, 1992.
- FUJIMOTO, D., SHI, Y., CHRISTIAN, D., MANTANGUIHAN, J. B., LEUNG, H. Tagging quantitative loci controlling pathogenicity in *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.61, n.2, p.77-88, 2002.
- GAGE, M. J., RANE, S. G., HOCKERMAN, G. H., SMITH, T. J. The Virally Encoded Fungal Toxin KP4 Specifically Blocks L-Type Voltage-Gated Calcium Channels. *Molecular Pharmacology*, v.61, n.4, p.936-944, 2002.
- GOVRIN, E. M., LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, v.10, p.751-757, 2000.
- GRIFFITH, G. W., HEDGER, J. N. Dual culture of *Crinipellis pernicioso* and potato callus. *European Journal of Plant Pathology*, v.100, n.6, p.371-379, 1994c.
- GRIFFITH, G. W., NICHOLSON, J. N., NENNINGER, A., BIRCH, R. N., HEDGER, J. N. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany*, v.41, p.423-435, 2003.
- GUETTLER, S., JACKSON, E. N., LUCCHESI, S. A., HONAAS, L., GREEN, A., HITTINGER, C. T., TIAN, Y., LILLY, W. W., GATHMAN, A. C. ESTs from the basidiomycete *Schizophyllum commune* grown on nitrogen-replete and nitrogen-limited media. *Fungal Genetics and Biology*, v.39, p.191-198, 2003.
- GUILLEN, F., MARTINEZ, A. T., MARTINEZ, M. J. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*, v.609, n.2, p.607-611, 1992.

- GUILLEROUX, M., OSBOURN, A. Gene expression during infection of wheat roots by the "take-all" fungus *Gaeumannomyces graminis*. *Molecular Plant Pathology*, v.5, n.3, p.203-216, 2004.
- HANSBERG, W., DE GROOT, H., SIES, H. Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biological Medicine*, v.14, n.3, p.287-293, 1993.
- HEGEDUS, D. D., RIMMER, S. R. *Sclerotinia sclerotiorum*: When "to be or not to be" a pathogen? *FEMS Microbiology Letters*, v.251, p.177-184, 2005.
- HINNEBUSCH, A. G. Translational Regulation of Yeast *GCN4*. A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *Journal of Biological Chemistry*, v.272, n.35, p.21661-21664, 1997.
- HUANG, X., MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, v.9, n.9, p.868-877, 1999.
- IDNURM, A., HOWLETT, B. J. Isocitrate Lyase Is Essential for Pathogenicity of the Fungus *Leptosphaeria maculans* to Canola (*Brassica napus*). *Eukaryotic Cell*, v.1, n.5, p.719-724, 2002.
- IDNURM, A., HOWLETT, B. J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*, v.2, n.4, p.241-255, 2001.
- KANG, H. L., BENZER, S., MIN, K. T. Life extension in *Drosophila* by feeding a drug. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, v.99, n.2, p.838-843, 2002.
- KARABABA, M., COSTE, A. T., ROGNON, B., BILLE, J., SANGLARD, D. Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, n.8, p.3064-3079, 2004.
- KARLSSON, M., OLSON, A., STENLID, J. Expressed sequences from the basidiomycetous tree pathogen *Heterobasidion annosum* during early infection of scots pine. *Fungal Genetics and Biology*, v.39, n.1, p.51-59, 2003.
- KHAN, R., TAN, R., MARISCAL, A. G., STRANEY, D. A binuclear zinc transcription factor binds the host isoflavonoid-responsive element in a fungal cytochrome p450 gene responsible for detoxification. *Molecular Microbiology*, v.49, n.1, p.117-130, 2003.

- KIM, S., AHN, I. P., LEE, Y. H. Analysis of genes expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.14, n.11, p.1340-1346, 2001b.
- KIM, S., AHN, I. P., LEE, Y. H. Analysis of genes expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.14, n.11, p.1340-1346, 2001a.
- KRUGER, W. M., PRITSCH, C., CHAO, S., MUEHLBAUER, G. J. Functional and comparative bioinformatic analysis of expressed genes from wheat spikes infected with *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.15, n.5, p.445-455, 2002.
- KRUPASAGAR, V., SEQUEIRA, L. Auxin destruction by *Marasmius perniciosus*. *American Journal of Botany*, v.56, n.4, p.390-397, 1969.
- KULKARNI, R. D., KELKAR, H. S., DEAN, R. A. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends in Biochemical Science*, v.28, n.3, p.118-121, 2003.
- KUMAR, S., PUNEKAR, N. S. The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. *Mycological Research*, v.101, p.403-409, 1997.
- LARA-ORTIZ, T., RIVEROS-ROSAS, H., AGUIRRE, J. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase *NoxA* regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, v.50, n.4, p.1241-1255, 2003.
- LAU, G., HAMER, J. E. Regulatory genes controlling MPG1 expression and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, v.8, p.771-781, 1996.
- LEROUX, P., FRITZ, R., DEBIEU, D., ALBERTINI, C., LANEN, C., BACH, J., GRETT, M., CHAPELAND, F. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, v.58, n.9, p.876-878, 2002.
- LEUTHNER, B., AICHINGER, C., OEHMEN, E., KOOPMANN, E., MULLER, O., MULLER, P., KAHMANN, R., BOLKER, M., SCHREIER, P. H. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, v.272, n.6, p.639-650, 2005.
- LI, R., RIMMER, R., BUCHWALDT, L., SHARPE, A. G., SEGUIN-SWARTZ, G., HEGEDUS, D. D. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo- and exo-polygalacturonases



- expressed during saprophytic and parasitic modes. *Fungal Genet.Biol.*, v.41, n.8, p.754-765, 2004.
- LIU, W., CHAO, Y., LIU, S., BAO, H., QIAN, S. Molecular cloning and characterization of a laccase from the basidiomycete *Fomes lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.63, n.2, p.174-181, 2003.
- LORENZ, M. C., FINK, G. R. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature*, v.412, n.6842, p.83-86, 2001.
- LU, G., JANTASURIYARAT, C., ZHOU, B., WANG, G. L. Isolation and characterization of novel defense response genes involved in compatible and incompatible interactions between rice and *Magnaporthe grisea*. *Theoretical and Applied Genetics*, v.108, n.3, p.525-534, 2004.
- MARZLUF, G. A. Genetic Regulation of Nitrogen Metabolism in the Fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.61, n.1, p.17-32, 1997.
- MEINHARDT, L. W., BELLATO, C. M., RINCONES, J., AZEVEDO, R. A., PEREIRA, G. A. G. Development of an *in vitro* germination and growth method for the biotrophic phase of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Current Microbiology*, v.52, n.3, p.191-196, 2006.
- NADIMPALLI, R., YALPANI, N., JOHAL, G. S., SIMMONS, C. R. Prohibitins, Stomatins, and Plant Disease Response Genes Compose a Protein Superfamily That Controls Cell Proliferation, Ion Channel Regulation, and Death. *Journal of Biological Chemistry*, v.275, n.38, p.29579-29586, 2000.
- NELSON, D. L., COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers, 2000,
- NELSON, M. A., KANG, S., BRAUN, E. L., CRAWFORD, M. E., DOLAN, P. L., LEONARD, P. M., MITCHELL, J., ARMIJO, A. M., BEAN, L., BLUEYES, E., CUSHING, T., ERRETT, A., FLEHARTY, M., GORMAN, M., JUDSON, K., MILLER, R., ORTEGA, J., PAVLOVA, I., PEREA, J., TODISCO, S., TRUJILLO, R., VALENTINE, J., WELLS, A., WERNER-WASHBURNE, M., NATVIG, D. O., . Expressed sequences from conidial, mycelial, and sexual stages of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet.Biol.*, v.21, n.3, p.348-363, 1997.
- NEUMANN, M. J., DOBINSON, K. F. Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genet.Biol.*, v.38, n.1, p.54-62, 2003.

- NEWMAN, T., DE BRUIJIN, F. J., GREEN, P., KEEGSTRA, K., KENDE, H., MCINTOSH, L., OHLROGGE, J., RAIKHEL, N., THOMASHOW, M. Genes Galore: A summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiology*, v.106, n.4, p.1241-1255, 1994.
- NUGENT, K. G., CHOFFE, K., SAVILLE, B. J. Gene expression during *Ustilago maydis* diploid filamentous growth: EST library creation and analyses. *Fungal Genet.Biol.*, v.41, n.3, p.349-360, 2004.
- OHLROGGE, J., BENNING, C. Unraveling plant metabolism by EST analysis. *Current Opinion in Plant Biology*, v.3, n.3, p.224-228, 2000.
- PANWAR, S. L., KRISHNAMURTHY, S., GUPTA, V., ALARCO, A. M., RAYMOND, M., SANGLARD, D., PRASAD, R. CaALK8, an alkane assimilating cytochrome P450, confers multidrug resistance when expressed in a hypersensitive strain of *Candida albicans*. *Yeast*, v.18, n.12, p.1117-1129, 2001.
- PARK, C. M., BRUENN, J. A., GANESA, C., FLURKEY, W. F., BOZARTH, R. F., KOLTIN, Y. Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin KP4. *Molecular Microbiology*, v.11, n.1, p.155-164, 1994.
- PEREIRA, J. L., DE ALMEIDA, L. C., SANTOS, S. M. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. *Crop Protection*, v.15, p.743-752, 1996.
- PEREIRA, J. L., RAM, A., FIGUEREIDO, J. M., DE ALMEIDA, L. C. La primera aparición de la "escoba de bruja" en la principal área productora de cacao del Brasil. *Turrialba*, v.39, n.7, p.459-461, 1989.
- PIRES, J. L., LUZ, E. D. M. N. Resistência à Vassoura-de-Bruja na espécie *Theobroma cacao*. *Fitopatologia Brasileira*, v.20, n.3, p.303-303, 1995.
- PRINS, T. W., WAGEMAKERS, L., SCHOUTEN, A., VAN KAN, J. A. L. Cloning and characterization of a glutathione S-transferase homologue from the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, v.1, n.3, p.169-178, 2000.
- PURDY, L. H., SCHMIDT, R. A. Status of cacao Witches' broom: biology, epidemiology and management. *Annual Review of Phytopathology*, v.34, n.1, p.573-594, 1996.
- QUTOB, D., HRABER, P. T., SOBRAL, B. W., GIJZEN, M. Comparative analysis of expressed sequences in *Phytophthora sojae*. *Plant Physiology*, v.123, p.243-254, 2000.

- RAUYAREE, P., CHOI, W., FANG, E., BLACKMON, B., DEAN, R. A. Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant Pathology*, v.2, p.347-354, 2001.
- RIBICHICH, K. F., SALEM-IZACC, S. M., GEORG, R. C., VENCIO, R. Z., NAVARRO, L. D., GOMES, S. L. Gene discovery and expression profile analysis through sequencing of expressed sequence tags from different developmental stages of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryot.Cell*, v.4, n.2, p.455-464, 2005.
- RINCONES, J., MAZOTTI, G. D., GRIFFITH, G. W., POMELA, A., FIGUEIRA, A., LEAL, G. A., QUEIROZ, M. V., PEREIRA, J. F., PEREIRA, G. A. G., MEINHARDT, L. W. Chromosome-length polymorphisms and genetic variability in the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various south american locations and hosts. *Mycological Research*, v.Under review, 2006.
- RINCONES, J., MEINHARDT, L. W., VIDAL, B. C., PEREIRA, G. A. G. Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycological Research*, v.107, n.4, p.452-458, 2003.
- ROS, B., THÜMMLER, F., WENZEL, G. Analysis of differentially expressed genes in a susceptible and moderately resistant potato cultivar upon *Phytophthora infestans* infection. *Molecular Plant Pathology*, v.5, n.3, p.191-201, 2004.
- RUDE, T. H., TOFFALETI, D. L., COX, G. M., PERFECT, J. R. Relationship of the glyoxylate pathway to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, v.70, n.10, p.5684-5694, 2004.
- SACADURA, N. T., SAVILLE, B. J. Gene expression and EST analyses of *Ustilago maydis* germinating teliospores. *Fungal Genet.Biol.*, v.40, n.1, p.47-64, 2003.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001,
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.
- SCARPARI, L. M., MEINHARDT, L. W., MAZZAFERA, P., POMELLA, A. W., SCHIAVINATO, M. A., CASCARDO, J. C., PEREIRA, G. A. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important

- disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *Journal of Experimental Botany*, v.56, n.413, p.865-877, 2005.
- SILVA, D. M. M. H., CARNEIRO, F. S., DA SILVA, R. A. M., BARBOSA, T. M. F., BASTOS, C. N., SILVA, S. D. V. M., ALBUQUERQUE, P. S. B. Seleção de Novas Fontes de Resistência a Vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) em Progênies de Cacaueiro (*Theobroma cacao*) Nativos da Amazônia Brasileira. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, São Paulo, agosto de 2001. Resumos. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, n.suplemento, p.437-438, 2001.
- SILVA, S. D. V. M., MATSUOKA, K. Histologia da Interação *Crinipellis pernicioso* em Cacaueiros Suscetível e Resistente à Vassoura-de-Bruxa. *Fitopatologia Brasileira*, v.24, n.1, p.54-59, 1999.
- SOLOMON, P. S., OLIVER, R. P. Evidence that  $\gamma$ -aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporium fulvum* infection of tomato. *Planta*, v.214, p.414-420, 2002.
- SOLORZANO, E., FERNANDEZ, A., PETEIRA, B., FERNANDEZ, E. Polyphenoloxidases and phenylalanine ammonium lyases induction in tomato leaves infected with *Alternaria solani*. *Revista de Producción Vegetal*, v.11, n.2, p.153-157, 1996.
- SUGUI, J. A., DEISING, H. B. Isolation of infection-specific sequence tags expressed during early stages of maize anthracnose disease development. *Molecular Plant Pathology*, v.3, p.197-203, 2002.
- TELLES, G. P., SILVA, F. R. Trimming and clustering sugarcane ESTs. *Genetics and Molecular Biology*, v.24, n.1-4, p.17-23, 2001.
- THOMAS, S. W., RASMUSSEN, S. W., GLARING, M. A., ROUSTER, J. A., CHRISTIANSEN, S. K., OLIVER, R. P. Gene identification in the obligate fungal pathogen *Blumeria graminis* by expressed sequence tag analysis. *Fungal Genetics and Biology*, v.33, n.2, p.195-211, 2001.
- TRAIL, F., XU, J. R., SAN, M. P., HALGREN, R. G., KISTLER, H. C. Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Fungal Genet.Biol.*, v.38, n.2, p.187-197, 2003.
- TROGNITZ, F., MANOSALVA, P., GYSIN, R., NINO-LIU, D., SIMON, R., HERRERA, M. D. R., TROGNITZ, B., GHISLAIN, M., NELSON, R. Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* x Dihaploid *S. tuberosum* hybrids. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.15, n.6, p.587-597, 2002.

- VEREECKE, D., CORNELIS, K., TEMMERMAN, W., JAZIRI, M., VAN MONTAGU, M., HOLSTERS, M., GOETHALS, K. Chromosomal locus that affects pathogenicity of *Rhodococcus fascians*. *Journal of Bacteriology*, v.184, n.4, p.1112-1120, 2002.
- WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, v.322, n.3, p.681-692, 2005.
- XIONG, L., LEE, M. W., QI, M., YANG, Y. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Mol.Plant Microbe Interact.*, v.14, n.5, p.685-692, 2001.
- YENDAMURI, S., KUROKI, T., TRAPASSO, F., HENRY, A. C., DUMON, K. R., HUEBNER, K., WILLIAMS, N. N., KAISER, L. R., CROCE, C. M. WW Domain Containing Oxidoreductase Gene Expression Is Altered in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, v.63, n.4, p.878-881, 2003.

## 6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

O presente trabalho abordou alguns aspectos referentes à genética molecular do fungo fitopatogênico *Crinipellis pernicioso* e sua interação com o cacaueiro no estabelecimento da doença VB.

Este trabalho apresentou, pela primeira vez, o cariótipo molecular de *C. Pernicioso* e mostrou a existência de polimorfismos cromossômicos para esta espécie. Além disso, a partir da análise de 38 isolados diferentes provenientes de três biótipos deste fitopatógeno mostramos que a variabilidade genética dentro de um mesmo biótipo e entre biótipos diferentes pode ser determinada a partir de uma análise do cariótipo combinada com uma análise tipo microsátélites. Este estudo permitiu verificar que o cariótipo do biótipo-C de *C. pernicioso* é muito estável ao longo do tempo e que a variabilidade do fungo é muito baixa na região da Bahia, mostrando apenas dois cariótipos principais, muito provavelmente provenientes de duas introduções independentes da Amazônia. Assim, estes resultados indicam a fragilidade do programa de melhoramento genético do cacaueiro que está sendo empregado na Bahia, já que os clones resistentes selecionados no campo foram desafiados contra apenas dois genótipos do patógeno. Próximos estudos utilizando uma amostra mais ampla de isolados, considerando a região amazônica em sua totalidade e um maior número de biótipos, permitiriam uma avaliação mais completa da variabilidade genética do fungo. Adicionalmente, os resultados encontrados sugerem que os rearranjos cromossômicos observados em *C. pernicioso* são gerados a partir de processos meióticos que poderiam envolver a presença de múltiplas cópias de retrotransposons. Uma investigação aprofundada das fontes de geração de variabilidade genética neste fungo também teria grande impacto sobre o desenvolvimento de uma estratégia de controle para a VB.

Com relação à análise da expressão do fungo em presença de extratos do hospedeiro, foram obtidas quatro bibliotecas de cDNA de *C. pernicioso* sob diferentes condições de cultivo e em diferentes estágios do desenvolvimento.

Destas quatro bibliotecas foram obtidos 7406 reads, dos quais 3650 apresentaram qualidade suficiente para passar à etapa de clusterização, a qual gerou 1427 clusters ou unigenes.

A partir do alinhamento destes clusters com as bases de dados públicas foi possível identificar 36% dos unigenes, cuja análise revelou a presença de transcritos possivelmente envolvidos com a patogenicidade do fungo e permitindo o levantamento de hipóteses com relação aos genes e vias metabólicas que podem ser importantes na instalação da doença ao exibirem um nível de expressão maior na presença de extratos do hospedeiro. No caso do micélio saprotrófico, entre os genes induzidos pela presença de extratos do hospedeiro destacam-se: enzimas do ciclo do glioxilato; citocromos P450, glutathione S-transferase e Heat Shock Proteins, todos envolvidos na defesa contra compostos tóxicos; NADPH oxidase e Manganês SOD que produzem Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) possivelmente envolvidas na resposta hipersensitiva em plantas que culmina na morte celular programada do tecido afetado; Trehalase neutra essencial na esporulação e colonização de tecidos; Taumatina e toxina KP4 são antifúngicos que podem impedir a competição com outros fungos; a lacase é uma enzima utilizada na degradação de lignina, mas foi comprovado que também é capaz de degradar auxina *in vitro*, podendo assim estar envolvida no desbalanço citokinina/auxina que pode ser o responsável pelos sintomas da VB, entre outros. As vias metabólicas que são aparentemente reguladas pela presença de extratos de cacau são a degradação de proteínas pela via das ubiquitinas e a respiração celular. No caso das ubiquitinas não temos uma hipótese que explique uma aparente maior taxa de reaproveitamento de proteínas salvo a observação de um crescimento mais acelerado na presença de extrato de cacau. O fato de a respiração celular ser ativada pela presença de extrato de cacau acreditamos que seja de grande interesse para o estudo da interação planta-patógeno já que poderia estar envolvida na geração de EROs que podem desencadear uma resposta hipersensitiva no tecido afetado da planta, permitindo assim que o fungo complete seu ciclo de vida hemibiotrófico.

A análise dos reads da biblioteca EP que representa a fase biotrófica do fungo, durante a qual é estabelecido o processo de doença, reforçou mais ainda a

hipótese sugerindo que o fungo mimetiza os mecanismos de defesa da planta para acelerar a resposta hipersensitiva que leva à morte do tecido afetado; esta morte é um requisito para que o fungo continue seu desenvolvimento e reprodução. Além da produção de EROs, que já tinha sido detectada em transcritos da fase saprotrófica induzidos com extratos de cacau, encontramos que durante a fase biotrófica são expressos transcritos com similaridade a genes que poderiam participar diretamente na resposta hipersensitiva em plantas, como as proibitinas e estomatinas, além de uma peroxidase que poderia proteger esta fase do fungo do efeito tóxico das EROs. Adicionalmente, encontramos evidências de uma condição de falta de amino ácidos que poderia simplesmente refletir as condições do meio de cultura utilizado, mas que também poderia indicar a utilização de uma via alternativa de metabolismo de nitrogênio durante a fase biotrófica do fungo, já que neste mesmo tipo de micélio detectamos a presença de genes envolvidos com o metabolismo do GABA, um amino ácido não protéico que pode ser utilizado como fonte de nitrogênio por fungos biotróficos patógenos de plantas. Também foi encontrado um transportador de cobre, o qual também poderia ter um papel na fitopatogenicidade, já que o cobre é um cofator essencial para a ligação do etileno ao receptor de membrana, e o etileno é produzido pela planta em maiores concentrações no começo da doença. Porém, é importante lembrar que a maioria dos unigenes não pôde ser identificada em base à similaridade com proteínas nas bases de dados públicas, indicando assim que ainda desconhecemos muitas das vias metabólicas e mecanismos moleculares utilizados pelo fungo durante a interação com o cacau.

Desta maneira, a análise destas bibliotecas permitiu o levantamento de hipóteses com relação aos diversos mecanismos pelos quais o fungo poderia estar manipulando o metabolismo da planta para seu benefício e em detrimento da produção de cacau. Alguns destes genes poderiam ser utilizados como alvos para o desenho de drogas para o combate à doença. Porém, para poder determinar se estes genes podem ser encaixados na categoria de genes de fitopatogenicidade, é necessário comprovar que são necessários para o estabelecimento da doença, mas não essenciais para a sobrevivência do fungo. Adicionalmente, devemos destacar que as condições de cultura utilizadas para a confecção das bibliotecas



não são *in planta* e, conseqüentemente, a interpretação dos resultados só será válida após estudos posteriores de patogenicidade de mutantes. Em conseqüência, propomos como próxima etapa deste trabalho a disrupção destes genes (*knockout*) para assim poder comprovar sua função no processo de patogenicidade. Os genes essenciais para a sobrevivência do fungo que não possuam homólogos na planta também constituiriam alvos interessantes para o desenho de drogas. Em vista de que não é possível verificar a função de um gene essencial a partir da geração de *knockouts*, uma alternativa seria o silenciamento pós-transcricional por RNA de interferência (RNAi), a qual é uma técnica de silenciamento reversível. A geração destes dois tipos de mutantes para este importante fitopatógeno constituiria um passo importante na busca por alternativas de controle para a VB.

Com relação aos objetivos principais do trabalho, consideramos que a partir das metodologias empregadas foi possível obter uma maior compreensão dos mecanismos utilizados por *C. pernicioso* no desenvolvimento da VB em cacaueteiro e estudos mais aprofundados, baseados nos resultados aqui obtidos, deverão auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle para esta importante doença.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. D., CELNIKER, S. E., HOLT, R. A., EVANS, C. A., GOCAYNE, J. D., ET AL. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, v.287, n.5461, p.2185-2195, 2000.
- AGUILAR, M. A. G., PACHECO, R. E., SENA-GOMES, A. R. Comportamento de clones de cacau resistentes a *Crinipellis pernicioso* propagados por enxertia e estaquia em diferentes localidades da região cacauzeira da Bahia. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, São Paulo, agosto de 2001. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, n.Suplemento, p.353-353, 2001.
- AINSCOUGH, R., BARDILL, S., BARLOW, K., BASHAM, V., BAYNES, C., ET AL. Genome sequence of the nematode *Caenorhabditis elegans*. A platform for studying biology. *Science*, v.282, n.5396, p.2012-2018, 1998.
- ANDEBRHAN, T., FURTEK, D. B. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* isolates from different hosts. *Plant Pathology*, v.43, n.6, p.1020-1027, 1994.
- BARTLEY, B. G. D. *Breeding for durable resistance in perennial crops*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Cacao, *Theobroma cacao*., p.25-42.
- BASTOS, C. N. Efeito Fungitóxico do Óleo de *Piper enckea* sobre *Crinipellis pernicioso* e *Phytophthora palvívora* *in vitro*. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, São Paulo, agosto de 2001. Resumos. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, n.suplemento, p.417-417, 2001.
- BASTOS, C. N., ANDERBRHAN, T. Urucu (*Bixa orellana*): nova espécie hospedeira da VB (*Crinipellis pernicioso*) do cacauzeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.11, p.963-965, 1986.

- BASTOS, C. N., ANDERBRHAN, T., DE ALMEIDA, L. C. Comparação Morfológica de Isolados de *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira*, v.13, n.3, p.202-206, 1988.
- BASTOS, C. N., EVANS, H. C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. *Plant Pathology*, v.34, n.3, p.306-312, 1985.
- BLATTNER, F. R., ET AL. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, v.277, n.5331, p.1453-1474, 1997.
- BRAZILIAN MINISTRY OF AGRICULTURE Brazilian Agriculture in Figures: Agriculture - Production, Acreage, Yield, Imports, Exports, States Main Producers, 1991-2000: Permanent Crops/cocoa. *Brazilian Ministry of Agriculture*, 2002. . <http://www.agricultura.gov.br/spa/indice02.htm>
- COSTA, J. C., SILVA, S. D. V. M., MELLO, I. S., BEZERRA, J. L. Interação Micelial de *Trichoderma stromaticum* e *Crinipellis pernicioso* em Vassouras Secas de Cacaueiro. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, São Paulo, agosto de 2001. Resumos. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, n.suplemento, p.352-352, 2001.
- DA SILVA, A. C. R., FERRO, J. A., REINACH, F. C., FARAH, C. S., FURLAN, C. R., ET AL. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, v.417, n.6887, p.459-463, 2002.
- DELGADO, J. C., COOK, A. A. Nuclear condition of basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius perniciosus*. *Canadian Journal of Botany*, v.54, n.1, p.66-72, 1976.
- EVANS, H. C. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' broom disease of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society*, v.74, n.6, p.515-526, 1980.
- EVANS, H. C. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador. I. The fungus. *Annals of Applied Biology*, v.89, n.1, p.186-192, 1978.

- EVANS, H. C., BASTOS, C. N. Uma Avaliação do Ciclo de Vida da Vassoura-de-Bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do Cacaueiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.4, n.1, p.104-104, 1979.
- FLEISHMANN, R. D., ET AL. Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science*, v.269, n.5223, p.496-512, 1995.
- GRIFFITH, G. W., HEDGER, J. N. Spatial distribution of mycelia of the liana (L-) biotype of the agaric *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer in tropical forest. *New Phytologist*, v.127, p.243-259, 1994b.
- GRIFFITH, G. W., HEDGER, J. N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*. *Heredity*, v.72, p.278-289, 1994a.
- HEDGER, J. N., PICKERING, V., ARAGUNDI, J. A. Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*). *Transactions of the British Mycological Society*, v.88, p.533-546, 1987.
- MCPHERSON, J. D., MARRA, M., HILLIER, L., WATERSON, R. H., CHINWALLA, R., ET AL. A physical map of the human genome. *Nature*, v.409, n.6822, p.934-941, 2001.
- MCQUILKEN, M. P., SUPRIADI, A. A., RUGARD, S. A. Sensitivity of *Crinipellis perniciosa* to two triazole fungicides in vitro and their effect on development of the fungus in cocoa. *Plant Pathology*, v.37, p.499-506, 1988.
- ORCHARD, J., COLLIN, H. A., HARDWICK, K., ISAAC, S. Changes in Morphology and Measurement of Cytokinin Levels During the Development of Witches' broom on Cocoa. *Plant Pathology*, v.43, n.1, p.65-72, 1994.
- PEGLER, D. N. *Crinipellis perniciosa* (Agaricales). *Kew Bulletin*, v.32, n.4, p.731-733, 1978.
- PEREIRA, J. L., RAM, A., FIGUEREIDO, J. M., DE ALMEIDA, L. C. La primera aparición de la "escoba de bruja" en la principal área productora de cacao del Brasil. *Turrialba*, v.39, n.7, p.459-461, 1989.

- PURDY, L. H., SCHMIDT, R. A. Status of cacao Witches' broom: biology, epidemiology and management. *Annual Review of Phytopathology*, v.34, n.1, p.573-594, 1996.
- RESENDE, M. L. V., GUTEMBERG, B. A. N., SILVA, L. H. C. P., NIELLA, G. R., CARVALHO, G. A., SANTIAGO, D. V. R., BEZERRA, J. L. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patogênico a *T. cacao*. *Fitopatologia Brasileira*, v.25, n.1, p.88-91, 2000.
- SAMUELS, G. J., PARDO-SCULULTHEISS, R., HEBBAR, K. P., LUMSDEN, R. D., BASTOS, C. N., COSTA, J. C., BEZERRA, J. L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao Witches' Broom pathogen. *Mycological Research*, v.104, n.6, p.760-764, 2000.
- SARDAGNA, A. A., MELO, I. S. Estudos Citológicos de *Trichoderma stromaticum*, um agente de Biocontrole de *Crinipellis pernicioso*. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, São Paulo, agosto de 2001. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, n.Suplemento, p.354-354, 2001.
- SILVA, D. M. M. H., CARNEIRO, F. S., DA SILVA, R. A. M., BARBOSA, T. M. F., BASTOS, C. N., SILVA, S. D. V. M., ALBUQUERQUE, P. S. B. Seleção de Novas Fontes de Resistência a Vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) em Progenies de Cacaueiro (*Theobroma cacao*) Nativos da Amazônia Brasileira. In: XXXIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia, São Pedro, São Paulo, agosto de 2001. Resumos. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, n.suplemento, p.437-438, 2001.
- SILVA, S. D. V. M., MATSUOKA, K. Histologia da Interação *Crinipellis pernicioso* em Cacaueiros Suscetível e Resistente à Vassoura-de-Bruxa. *Fitopatologia Brasileira*, v.24, n.1, p.54-59, 1999.
- SIMPSON, A. J. G., REINACH, F. C., ARRUDA, P., ABREU, F. A., ET AL. The Genome Sequence of the Plant Pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, v.406, n.6792, p.151-157, 2000.
- SINGER, R. Monograph Study of the Genera *Crinipellis* and *Chaetochalatus*. *Liloa*, v.8, n.7, p.503-503, 1942.

- SREENIVASAN, T. N., DABYDEEN, S. Modes of Penetration of Young Cocoa Leaves by *Crinipellis pernicioso*. *Plant Disease*, v.73, n.6, p.478-484, 1989.
- STELL, F. Witch-broom Disease of Cocoa and its Control. *Bulletin of the Department of Agriculture Trinidad and Tobago*, v.1, n.1, p.1-21, 1928.
- THE ARABIDOPSIS INITIATIVE Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, v.408, n.6814, p.796-815, 2000.

## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO A. Resultados do Ensaio Tipo Northern Reverso Para Validação do Processo de Subtração Cacao menos Glicose

**Tabela 8.1.** Clones selecionados para validação por northern reverso. Categorias: 1) clones que representam genes constitutivos; 2) clones diferencialmente expressos; 3) possíveis falsos positivos; e 4) genes de interesse (aqueles com possível função na patogenicidade). Pos.: Posição; Cat.: Categoria.

Pos.	Cat.	Contig	Read	BLASTx NR	BLASTn Cp
1	1	57	CP02-EG-001-010-H07-EU.F	No hits	No hits
2	1	57	CP02-EC-001-015-C05-EU.F	No hits	No hits
3	1	102	CP02-EG-001-006-H03-EU.F	Agglutinin, 3E-10	0,0
4	1	102	CP02-EC-001-003-G05-EU.F	Agglutinin, 3E-10	0,0
5	1	21	CP02-EC-001-003-H04-EU.F	Unknown, 1E-20	1E-77
6	1	21	CP02-EG-001-007-F10-EU.F	Unknown, 1E-20	1E-77
7	1	30	CP02-EC-001-011-B08-EU.F	Unknown, 2E-06	2E-70
8	1	30	CP02-EG-001-001-F02-EU.F	Unknown, 2E-06	2E-70
9	1	108	CP02-EG-001-009-E08-UE.F	Zn-dependent hydrolases, 2E-29	9E-91
10	1	108	CP02-EC-001-006-E03-UE.F	Zn-dependent hydrolases, 2E-29	9E-91
11	1	22	CP02-EG-001-006-F01-UE.F	Hydrophobin, 6E-31	1E-114
12	1	22	CP02-EC-001-008-G02-UE.F	Hydrophobin, 6E-31	1E-114
13	1	36	CP02-EC-001-005-B01-UE.F	No hits	5E-86
14	1	36	CP02-EG-001-006-H08-UE.F	No hits	5E-86
15	1	39	CP02-EG-001-010-A06-UE.F	No hits	0,0
16	1	39	CP02-EC-001-005-C07-UE.F	No hits	0,0
17	1	44	CP02-EC-001-005-G08-UE.F	Unknown, 5E-26	1E-152
18	1	44	CP02-EG-001-009-B04-UE.F	Unknown, 5E-26	1E-152
19	1	90	CP02-EC-001-005-C11-UE.F	Tetrapyrrole methylase, 2E-23	1E-136
20	1	90	CP02-EG-001-006-F06-UE.F	Tetrapyrrole methylase, 2E-23	1E-136
21	1	67	CP02-EC-001-012-C08-UE.F	glucose oxidase, 3E-14	0,0
22	1	67	CP02-EG-001-009-A02-UE.F	glucose oxidase, 3E-14	0,0
23	2	7	CP02-ES-001-001-G09-EU.F	Hydrophobin, 1E-21	1E-103
24	2	7	CP02-EC-001-001-F05-EU.F	Hydrophobin, 1E-21	1E-103
25	2	12	CP02-EC-001-008-C09-EU.F	peroxiredoxin Q-like prot., 6E-21	8E-76
26	2	14	CP02-EC-001-002-C06-EU.F	manganese-SOD, 9E-72	1E-123
27	2	20	CP02-ES-001-011-D09-EU.F	No hits	0,0
28	2	20	CP02-EC-001-003-A01-EU.F	No hits	0,0

29	2	83	CP02-ES-001-001-G11-EU.F	Cytochrome P450, 2E-24	2E-70
30	2	83	CP02-EC-001-011-D12-EU.F	Cytochrome P450, 2E-24	2E-70
31	2	86	CP02-EC-001-005-H10-EU.F	Hydrophobin, 2E-23	1E-169
32	2	94	CP02-ES-001-010-G09-EU.F	Choline dehydrogenase, 4E-17	8E-66
33	2	94	CP02-EC-001-012-H09-EU.F	Choline dehydrogenase, 4E-17	8E-66
34	3	70	CP02-ES-001-001-A10-EU.F	Ubiquitin, 1E-167	0,0
35	3	70	CP02-EC-001-004-G11-EU.F	Ubiquitin, 1E-167	0,0
36	3	70	CP02-EG-001-010-E01-EU.F	Ubiquitin, 1E-167	0,0
37	3	88	CP02-ES-001-008-F11-EU.F	chitin deacetylase, 4E-53	1E-127
38	3	88	CP02-EG-001-009-E06-EU.F	chitin deacetylase, 4E-53	1E-127
39	3	88	CP02-EC-001-015-B08-EU.F	chitin deacetylase, 4E-53	1E-127
40	3	132	CP02-ES-001-004-D02-EU.F	No hits	0,0
41	3	132	CP02-EC-001-008-G12-EU.F	No hits	0,0
42	3	132	CP02-EG-001-002-E07-EU.F	No hits	0,0
43	3	144	CP02-ES-001-008-E05-EU.F	No hits	No hits
44	3	144	CP02-EG-001-002-C10-EU.F	No hits	No hits
45	3	144	CP02-EC-001-001-B06-EU.F	No hits	No hits
46	3	149	CP02-ES-001-006-A12-EU.F	NAD-dep. formate dehydro., 1E-8	0,0
47	3	149	CP02-EG-001-009-H09-EU.F	NAD-dep. formate dehydro., 1E-8	0,0
48	3	169	CP02-ES-001-011-H07-EU.F	metal-dependent RNase, 2E-16	0,0
49	3	169	CP02-EC-001-003-H09-EU.F	metal-dependent RNase, 2E-16	0,0
50	3	169	CP02-EG-001-009-F04-EU.F	metal-dependent RNase, 2E-16	0,0
51	4	188	CP02-ES-001-015-G09-EU.F	No hits	0,0
52	4	27	CP02-ES-001-008-C11-EU.F	No hits	5E-67
53	4	27	CP02-EC-001-003-E03-EU.F	No hits	5E-67
54	4	42	CP02-ES-001-010-H09-EU.F	Unknown, 4E-6	1E-117
55	4	42	CP02-EC-001-005-D08-EU.F	Unknown, 4E-6	1E-117
56	4	186	CP02-ES-001-016-F08-EU.F	cytochrome c oxidase, 2E-48	1E-168
57	4	139	CP02-ES-001-012-D05-EU.F	No hits	8E-90
58	4	143	CP02-ES-001-007-C10-EU.F	aminolevulinate synthetase, 8E-46	No hits
59	4	147	CP02-ES-001-016-B04-EU.F	Unknown, 5E-26	1E-114
60	4	150	CP02-ES-001-015-C07-EU.F	No hits	1E-147
61	4	161	CP02-ES-001-009-A05-EU.F	NAD-dep. formate dehydro., 4E-11	1E-11
62	4	172	CP02-ES-001-015-E09-EU.F	No hits	8E-30
63	4	-	CP02-EC-001-006-F08-UE.F	Malate synthetase, 4E-29	1E-110
64	4	38	CP02-EC-001-005-C02-UE.F	NADPH oxidase, 2E-15	No hits
65	4	1	CP02-EC-001-001-B12-UE.F	cytochrome P450, 4E-33	1E-79
66	4	-	CP02-ES-001-008-C12-UC.F	cytochrome P450, 2E-7	3E-68



67	4	162	CP02-ES-001-007-E11-UE.F	OMST oxidoreductase, 2E-6	2E-71
68	4	59	CP02-EC-001-007-E10-UE.F	Kp4 Toxin, 1E-10	0,0
69	4	-	CP02-EC-001-009-G11-UE.F	glutathione-s-transferase, 1E-13	1E-49
70	4	-	CP02-EG-001-002-C06-UE.F	glutathione-s-transferase, 2E-13	1E-160
71	4	-	CP02-EC-001-005-A09-UE.F	benzoquinone reductase, 6E-33	3E-96
72	4	-	CP02-EC-001-006-D07-UE.F	Laccase, 4E-13	1E-23
73	4	-	CP02-ES-001-009-H10-UE.F	Laccase, 2E-18	1E-51
74	4	-	CP02-EC-001-003-F12-UE.F	Neutral trehalase, 5E-36	4E-51
75	4	-	CP02-EC-001-001-E11-UE.F	Thaumatococcus-like protein, 7E-11	1E-128
76	4	-	CP02-EG-001-002-D05-UE.F	Pathogenesis-related protein, 4E-9	2E-93
77	4	130	CP02-EG-001-005-F10-UE.F	CFEM conserved domain, 8E-6	1E-99
78	4	-	CP02-EC-001-003-A06-UE.F	WW oxidoreductase, 4E-16	3E-84
79	4	23	CP02-EC-001-003-B04-UE.F	gag polyprotein, 3E-7	1E-175
80	4	-	CP02-ES-001-004-H04-UC.F	heat shock protein 70, 1E-34	1E-94
81	4	-	CP02-EC-001-005-B08-UE.F	p14.5 protein, 6E-16	8E-53
82	4	-	CP02-EC-001-012-C06-UE.F	Mitochondrial memb. prot., 8E-47	2E-48
83	4	122	CP02-EG-001-005-B08-UE.F	potential glutaredoxin, 9E-21	3E-49
84	4	-	CP02-EC-001-002-C05-UE.F	ubiquinone oxidoreductase, 2E-24	No hits
85	4	-	CP02-EC-001-009-F08-UE.F	ubiquinone oxidoreductase, 2E-17	2E-60
86	4	-	CP02-EC-001-002-E04-UE.F	Cytochrome b5, 2E-21	3E-75
87	4	-	CP02-EC-001-009-H06-UE.F	cytochrome c oxidase, 2E-22	3E-65
88	4	-	CP02-EC-001-001-B05-UE.F	glycerol efflux/uptake protein, 5E-9	5E-73
89	4	18	CP02-EC-001-002-G11-UE.F	subtilisin-like serine protease, 9E-8	5E-89
90	4	45	CP02-EC-001-006-A12-UE.F	Ubiquitin-conjug. enzyme, 2E-54	4E-77
91	4	45	CP02-EG-001-001-F07-UE.F	Ubiquitin-conjug. enzyme, 2E-54	4E-77
92	4	28	CP02-ES-001-013-A06-UE.F	Polyubiquitin, 4E-64	2E-57
93	4	28	CP02-EC-001-003-F04-UE.F	Polyubiquitin, 4E-64	2E-57
94	4	-	CP02-ES-001-015-C12-UE.F	ubiquitin-specific protease 6, 1E-26	5E-36
95	4	153	CP02-ES-001-009-F04-UE.F	No Hits	1E-68
96	4	166	CP02-ES-001-009-H06-UE.F	Unknown, 4E-13	2E-96

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	26	39	53	71	81	89	34	54	66
B	2	10	18	28	41	55	72	82	90	37	56	67
C	3	11	19	30	42	63	74	83	91	40	57	73
D	4	12	20	31	44	64	75	84	93	43	58	80
E	5	13	21	33	45	65	76	85	23	46	59	92
F	6	14	22	35	47	68	77	86	27	48	60	94
G	7	15	24	36	49	69	78	87	29	51	61	95
H	8	16	25	38	50	70	79	88	32	52	62	96

**Fig. 8.1.** Rearranjo dos clones selecionados em placa de 96 poços para a validação por northern reverso. Os números representam a posição na Tabela 1 (primeira coluna). Os clones E09 a H12 (separados por linha grossa) são clones da biblioteca ES e portanto possuem seleção em ampicilina, enquanto que os clones restantes (A01 a E08) provêm das bibliotecas SAP-CAC e EG e possuem seleção em cloranfenicol. As cores representam as categorias pelas quais foram selecionados os diferentes clones. **Amarelo:** Categoria 1 (constitutivos); **Azul:** Categoria 2 (diferencialmente expressos); **Rosa:** Categoria 3 (possíveis falsos positivos); **Verde:** Categoria 4 (genes de interesse com possível expressão diferencial).

**Tabela 8.2.** Resultados da validação por northern reverso da subtração Cacau menos Glicose

Poço	Sonda Cacau	Sonda glicose	Sonda subtract	Cat	Contig	Confirma
A01	++	+	-	1	57	sim (constitutivo)
A02	++	+	-	1	108	sim (constitutivo)
A03	++	-	-	1	44	sim (constitutivo)
A04	+	-	-	2	14	mais em cacau
A05	+	+	+	3	88	sim
A06	+	-	+	4	27	mais em cacau
A07	+	+	-	4	-	constitutivo
A08	+	-	-	4	-	mais em cacau
A09	+	-	-	4	18	mais em cacau
A10	+	-	++	3	70	não
A11	-	-	++	4	42	sim
A12	-	-	++	4	-	mais em cacau
B01	++	+	-	1	57	sim (constitutivo)
B02	++	+	-	1	108	sim (constitutivo)
B03	++	-	-	1	44	sim (constitutivo)
B04	+	+	+	2	20	não, falso positivo
B05	+	-	+	3	132	não
B06	+	+	+	4	42	não, falso positivo

B07	+	-	-	4	-	mais em cacau
B08	+	+	-	4	-	constitutivo
B09	++	+	-	4	45	constitutivo
B10	-	-	++	3	88	não
B11	-	-	++	4	186	mais em cacau
B12	-	-	++	4	162	mais em cacau
C01	++	+	-	1	102	sim (constitutivo)
C02	++	+	-	1	22	sim (constitutivo)
C03	++	+	-	1	90	sim (constitutivo)
C04	+	+	+	2	83	não, falso positivo
C05	+	-	+	3	132	não
C06	+	-	+	4	-	mais em cacau
C07	+	-	-	4	-	mais em cacau
C08	++	+	+	4	122	mais em cacau
C09	++	+	-	4	45	constitutivo
C10	-	-	++	3	132	não
C11	-	-	++	4	139	mais em cacau
C12	-	-	++	4	-	mais em cacau
D01	++	+	-	1	102	sim (constitutivo)
D02	++	+	-	1	22	sim (constitutivo)
D03	++	+	-	1	90	sim (constitutivo)
D04	+	+	+	2	86	não, falso positivo
D05	+	-	++	3	144	não
D06	+	+	+	4	38	constitutivo
D07	+	-	-	4	-	mais em cacau
D08	+	-	-	4	-	mais em cacau
D09	++	-	+	4	28	mais em cacau
D10	+	-	++	3	144	não
D11	-	-	++	4	143	mais em cacau
D12	-	-	++	4	-	mais em cacau
E01	++	+	-	1	21	sim (constitutivo)
E02	++	+	-	1	36	sim (constitutivo)
E03	++	++	-	1	67	sim (constitutivo)
E04	+	+	+	2	94	não, falso positivo
E05	+	-	++	3	144	não
E06	-	-	+	4	1	mais em cacau
E07	+	-	-	4	-	mais em cacau
E08	+	-	-	4	-	mais em cacau
E09	-	-	++	2	7	sim
E10	+	-	++	3	149	não
E11	-	-	++	4	147	mais em cacau
E12	-	-	++	4	28	mais em cacau
F01	++	+	-	1	21	sim (constitutivo)
F02	+	+	-	1	36	sim (constitutivo)
F03	++	++	-	1	67	sim (constitutivo)
F04	++	+	++	3	70	não

F05	+	-	+	3	149	não
F06	+	-	+	4	59	mais em cacau
F07	+	-	-	4	130	mais em cacau
F08	++	-	-	4	-	mais em cacau
F09	-	-	++	2	20	sim
F10	+	-	++	3	169	não
F11	+	-	++	4	150	mais em cacau
F12	-	-	++	4	-	mais em cacau
G01	+	+	-	1	30	sim (constitutivo)
G02	+	+	-	1	39	sim (constitutivo)
G03	+	+	-	2	7	não, constitutivo
G04	++	+	++	3	70	não
G05	++	+	+	3	169	não
G06	+	-	+	4	-	mais em cacau
G07	++	+	-	4	-	não, falso positivo
G08	+	-	-	4	-	mais em cacau
G09	-	-	++	2	83	sim
G10	++	-	++	4	188	mais em cacau
G11	-	-	++	4	161	mais em cacau
G12	-	-	++	4	153	mais em cacau
H01	++	+	-	1	30	sim (constitutivo)
H02	+	+	-	1	39	sim (constitutivo)
H03	++	+	+	2	12	sim
H04	++	+	+	3	88	não
H05	+	-	+	3	169	não
H06	+	-	+	4	-	constitutivo
H07	+	+	-	4	23	constitutivo
H08	++	+	-	4	-	constitutivo
H09	-	-	++	2	94	sim
H10	-	-	++	4	27	mais em cacau
H11	-	-	++	4	172	mais em cacau
H12	-	-	++	4	166	mais em cacau

## 8.2. ANEXO B. Unigenes com Similaridade nas Bases de Dados Públicas

**Tabela 8.3.** Unigenes com similaridade nas bases de dados públicas. É mostrado o primeiro resultado de BLAST, utilizando a ferramenta tBLASTx (ALTSCHULTZ *et al.*, 1997)

Bibliotecas	Read/Contig	Homólogo	Organismo	E-value
<i>Cell Communication</i>				
CAC GLI	contig102	A-agglutinin	<i>Streptococcus gordonii</i>	3,00E-10
CAC	CP02-EC-001-005-D12-UE.F	small monomeric GTPase	<i>Ustilago maydis</i>	5,00E-56
CAC	CP02-EC-001-011-B03-UE.F	small GTP-binding protein	<i>Aspergillus oryzae</i>	5,00E-66
SUB	CP02-ES-001-009-G05-UE.F	serine/threonine-protein kinase mhk1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2,00E-23
CAC	CP02-EC-001-006-B05-UE.F	UDP-glucose:sterol glucosyltransferase	<i>Gibberella zeae</i>	5,00E-36
GLI	CP02-EG-001-003-E12-UE.F	Signal recognition particle 9 kDa protein	<i>Zea mays</i>	3,00E-11
GLI	CP02-EG-001-006-A11-UE.F	hypothetical protein similar to Rab-protein 11	<i>Ustilago maydis</i>	3,00E-08
GLI	CP02-EG-001-009-C07-UE.F	ARF_CRYNE ADP-RIBOSYLATION FACTOR	<i>Ustilago maydis</i>	9,00E-36
GLI	CP02-EG-001-010-A04-UE.F	rho GTPase; RhoA	<i>Emericella nidulans</i>	2,00E-57
SUB	CP02-ES-001-011-C03-UE.F	member of GTP1/OBG family PFJ01018	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8,00E-08
GLI	CP02-EG-001-010-B05-UE.F	Glycolipid anchored surface protein (GAS1)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,00E-21
BIO	CP04-EP-001-002-G08-UE.F	ER to Golgi transport-related protein, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-11
BIO	CP04-EP-001-016-F05-UE.F	guanine nucleotide binding protein gamma subunit	<i>Lentinula edodes</i>	9,00E-22
GLI BIO	contig300	RAB11B, member RAS oncogene family	<i>Paxillus involutus</i>	4,00E-54
CAC BIO	contig76	SAR small monomeric GTPase, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,00E-78
<i>Cell Organization and Biogenesis</i>				
BIO	CP02-EC-002-001-D03-UC.R	cyclin-dependent kinases regulatory subunit	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,00E-09
BIO	CP04-EP-001-005-B09-UE.F	histone H4.2	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	5,00E-39
GLI BIO	contig311	Acidic profilin IA	<i>Acanthamoeba sp.</i>	3,00E-23
BIO	CP04-EP-001-008-E07-UE.F	beta-1,6-glucanase	<i>Verticillium fungicola</i>	9,00E-18
BIO	CP04-EP-001-013-B02-UE.F	glucosidase, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-21
SUB	contig211	SKN1, Beta-glucan synthesis-associated protein	<i>Candida albicans</i>	7,00E-23
SUB	contig219	SKN1, Beta-glucan synthesis-associated protein	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-30
BIO	contig305	putative histone	<i>Agaricus bisporus</i>	2,00E-28
CAC BIO	contig89	outer mitochondrial membrane protein required to localize Dnm1p and Mdv1p during mitochondrial division	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,00E-39
SUB	contig164	actin-like protein 3	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,00E-20
CAC	CP02-EC-001-001-E12-UE.F	actin	<i>Ustilago maydis</i>	7,00E-25
CAC	CP02-EC-001-007-D11-UE.F	actin 1	<i>Schizophyllum commune</i>	8,00E-79

CAC	CP02-EC-001-012-G11-UE.F	cytoskeletal beta actin	<i>Sus scrofa</i>	2,00E-16
GLI	contig121	actin	<i>Paxillus involutus</i>	4,00E-08
CAC	CP02-EC-001-001-G04-UE.F	septin-1	<i>Coccidioides immitis</i>	5,00E-37
CAC	CP02-EC-001-010-H04-UE.F	cellulose-growth-specific protein	<i>Agaricus bisporus</i>	3,00E-16
GLI	CP02-EG-001-002-F02-UE.F	glucan 1,3 beta-glucosidase-like protein	<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	1,00E-07
CAC GLI SUB	contig88	chitin deacetylase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	4,00E-53
CAC	CP02-EC-001-015-A10-UE.F	chitin deacetylase	<i>Schizophyllum commune</i>	6,00E-18
GLI	contig109	MANNOSYLTRANSFERASE OF THE KTR FAMILY	<i>Yarrowia lipolytica</i>	6,00E-11
CAC	CP02-EC-001-014-E06-UE.F	histone H2B	<i>Agaricus bisporus</i>	1,00E-37
CAC GLI	contig74	histone H3	<i>Lentinula edodes</i>	6,00E-55
GLI	contig131	postsynaptic protein CRIPT, putative	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2,00E-20
SUB	CP02-ES-001-008-F07-UC.F	alpha2 tubulin	<i>Coprinopsis cinerea</i>	5,00E-07
CAC	CP02-EC-001-012-C06-UE.F	outer mitochondrial membrane protein required to localize Dnm1p and Mdv1p during mitochondrial division	<i>Ustilago maydis</i>	8,00E-47
CAC	CP02-EC-001-009-E03-UE.F	Nucleoside-diphosphate-sugar epimerases	<i>Cryptococcus neoformans</i>	7,00E-63
CAC	CP02-EC-001-002-B08-UE.F	Vacuolar ATP synthase subunit F	<i>Gibberella zeae</i>	3,00E-39
CAC BIO	contig325	septin-1	<i>Coccidioides immitis</i>	4,00E-68
CAC	contig5	hydrophobin CoH1	<i>Coprinopsis cinerea</i>	9,00E-24
CAC	contig17	hydrophobin	<i>Pholiota nameko</i>	4,00E-07
CAC	contig73	hydrophobin 2	<i>Lentinula edodes</i>	4,00E-29
CAC	contig86	hydrophobin CoH1	<i>Coprinopsis cinerea</i>	2,00E-23
CAC	CP02-EC-001-015-E07-UE.F	hydrophobin CoH1	<i>Coprinopsis cinerea</i>	2,00E-09
CAC GLI	contig22	hydrophobin	<i>Pleurotus ostreatus</i>	6,00E-31
CAC GLI	contig48	hydrophobin	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1,00E-28
CAC SUB	contig7	hydrophobin	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1,00E-21
CAC BIO SUB	contig7	hydrophobin	<i>Pleurotus ostreatus</i>	1,00E-21
CAC BIO	contig5	hydrophobin CoH1	<i>Coprinopsis cinerea</i>	1,00E-23
<i>Developmental Processes</i>				
CAC	CP02-EC-001-003-A06-UE.F	WW domain-containing oxidoreductase	<i>Gibberella zeae</i>	4,00E-16
CAC	contig23	gag polyprotein	<i>Takifugu rubripes</i>	3,00E-07
BIO	contig303	prohibitin PHB1, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-32
BIO				
CAC	contig12	peroxiredoxin Q-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6,00E-21
CAC BIO	contig13	peroxiredoxin Q-like protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,00E-21
<i>Amino Acid Metabolism</i>				
CAC	CP02-EC-001-008-G09-UE.F	fumarylacetoacetate hydrolase	<i>Candida albicans</i>	7,00E-19
CAC	CP02-EC-001-005-H02-UE.F	Choline dehydrogenase	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-07

CAC	CP02-EC-001-005-F10-UE.F	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	<i>Neurospora crassa</i>	1,00E-23
CAC	CP02-EC-001-005-B09-UE.F	putative arginase	<i>Pleurotus ostreatus</i>	8,00E-60
SUB	CP02-ES-001-014-D06-UE.F	Acetolactate synthase, mitochondrial precursor	<i>Neurospora crassa</i>	1,00E-39
CAC GLI	contig61	acetolactate synthase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	9,00E-21
SUB	CP02-ES-001-004-B09-UC.F	glutamine synthetase	<i>Hebeloma cylindrosporium</i>	2,00E-55
GLI	CP02-EG-001-010-F09-UE.F	Saccharopine dehydrogenase [NADP+, L-glutamate forming] (Saccharopine reductase)	<i>Magnaporthe grisea</i>	3,00E-17
CAC	CP02-EC-001-012-E07-UE.F	Mo-molybdopterin cofactor biosynthesis	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-10
BIO	CP02-ES-002-024-H09-FC.F	acetolactate synthase, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	7,00E-07
BIO	CP04-EP-001-007-D09-UE.F	aspartate transaminase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2,00E-41
BIO	CP04-EP-001-010-C09-UE.F	Selenocysteine lyase	<i>Nostoc punctiforme</i>	1,00E-19
BIO	CP04-EP-001-019-G12-UE.F	cystathionine gamma-lyase-like protein	<i>Xanthomonas oryzae</i>	2,00E-19
CAC	contig2	Prephenate dehydrogenase (NADP+)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,00E-19
BIO	CP04-EP-001-010-F02-UE.F	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase precursor	<i>Aspergillus niger</i>	4,00E-30
<i>Carbohydrate Metabolism</i>				
CAC	CP02-EC-001-005-H03-UE.F	Transketolase 1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	6,00E-40
CAC	CP02-EC-001-012-D11-UE.F	cellulose-binding beta-glucosidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	2,00E-13
CAC	CP02-EC-001-013-G02-UE.F	beta-glucosidase	<i>Volvariella volvacea</i>	8,00E-51
CAC GLI	contig108	Zn-dependent hydrolases, including glyoxylases	<i>Aspergillus nidulans</i>	2,00E-29
CAC	CP02-EC-001-008-D11-UE.F	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	1,00E-33
SUB	contig177	malate dehydrogenase	<i>Talaromyces emersonii</i>	6,00E-31
CAC	CP02-EC-001-012-H11-UE.F	aconitase	<i>Aspergillus terreus</i>	3,00E-15
SUB	CP02-ES-001-012-D09-UE.F	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	<i>Piromyces sp.</i>	9,00E-50
BIO	CP04-EP-001-013-F10-UE.F	succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>Legionella pneumophila</i>	2,00E-32
CAC	contig16	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>Armillariella tabescens</i>	8,00E-58
CAC	contig105	pyruvate kinase	<i>Agaricus bisporus</i>	4,00E-46
GLI	CP02-EG-001-002-E09-UE.F	L-lactate 2-monooxygenase	<i>Streptomyces avermitilis</i>	2,00E-11
BIO	CP04-EP-001-005-H06-UE.F	mitochondrial citrate synthase	<i>Podospora anserina</i>	5,00E-43
CAC	CP02-EC-001-013-A05-UE.F	enolase	<i>Haematoboechus sp.</i>	2,00E-06
BIO	CP04-EP-001-006-F09-UE.F	acetate--CoA ligase	<i>Coprinopsis cinerea</i>	2,00E-71
BIO	CP04-EP-001-004-E09-UE.F	Dehydrogenases with different specificities	<i>Ralstonia metallidurans</i>	4,00E-18
BIO	CP04-EP-001-008-C02-UE.F	aldehyde reductase i, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	6,00E-06
BIO	CP02-ES-002-024-H05-FC.F	Uncharacterized protein involved in propionate catabolism	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7,00E-12
CAC	contig10	alcohol dehydrogenase	<i>Puccinia triticina</i>	1,00E-15
CAC GLI	contig80	putative zinc-containing alcohol dehydrogenase	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,00E-47
CAC SUB	contig140	Alcohol dehydrogenase III, mitochondrial precursor	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,00E-31

BIO	contig332	probable transaldolase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2,00E-37
BIO	CP04-EP-001-016-A05-UE.F	ribulose-phosphate 3-epimerase, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,00E-38
CAC	CP02-EC-001-005-B05-UE.F	trehalose synthase	<i>Grifola frondosa</i>	4,00E-44
GLI	contig114	malate synthase protein	<i>Laccaria bicolor</i>	6,00E-41
CAC	CP02-EC-001-006-F08-UE.F	malate synthase protein	<i>Laccaria bicolor</i>	4,00E-29
CAC	CP02-EC-001-003-F12-UE.F	NEUTRAL TREHALASE (ALPHA,ALPHA-TREHALASE)	<i>Aspergillus nidulans</i>	5,00E-26
CAC	contig10	L-arabinitol 4-dehydrogenase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-19
<i>Electron Transport and Oxidative Phosphorilation</i>				
SUB	contig186	cytochrome c oxidase subunit 3	<i>Crinipellis pernicioso</i>	2,00E-48
CAC	CP02-EC-001-002-C05-UE.F	nadh-ubiquinone oxidoreductase	<i>Neurospora crassa</i>	2,00E-24
CAC	CP02-EC-001-002-E04-UE.F	Cytochrome b5	<i>Mortierella alpina</i>	2,00E-21
CAC	CP02-EC-001-009-F08-UE.F	NADH-ubiquinone oxidoreductase 30.4 kDa subunit	<i>Armillariella tabescens</i>	2,00E-17
CAC	CP02-EC-001-009-H06-UE.F	cytochrome c oxidase polypeptide	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2,00E-22
		Cytochrome c oxidase polypeptide IV, mitochondrial precursor		
CAC	CP02-EC-001-013-D01-UE.F		<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	9,00E-07
CAC	CP02-EC-001-005-B02-UE.F	Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog	<i>Magnaporthe grisea</i>	8,00E-21
GLI	CP02-EG-001-008-G08-UE.F	cytochrome c oxidase subunit 2	<i>Crinipellis pernicioso</i>	2,00E-10
CAC	CP02-EC-001-011-A04-UE.F	NAD-dependent formate dehydrogenase	<i>Aspergillus nidulans</i>	3,00E-48
GLI	CP02-EG-001-002-C04-UE.F	NAD-dependent formate dehydrogenase	<i>Ustilago maydis</i>	5,00E-06
GLI SUB	contig149	NAD-dependent formate dehydrogenase	<i>Candida methylca</i>	1,00E-08
SUB	contig161	NAD-dependent formate dehydrogenase	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	4,00E-11
SUB	CP02-ES-001-008-E11-UC.F	NAD-dependent formate dehydrogenase	<i>Pichia angusta</i>	1,00E-38
CAC BIO GLI	contig88	methylase	<i>Gloeobacter violaceus</i>	6,00E-31
CAC GLI	contig90	Tetrapyrrole (Corrin/Prophyrin) methylase	<i>Legionella pneumophila</i>	2,00E-23
SUB	contig143	aminolevulinic acid synthetase	<i>Agaricus bisporus</i>	8,00E-46
GLI	contig122	potential glutaredoxin	<i>Candida albicans</i>	9,00E-21
CAC	CP02-EC-001-014-D10-UE.F	Thioredoxin m4	<i>Ustilago maydis</i>	8,00E-21
CAC	CP02-EC-001-002-D04-UE.F	ATP synthase j chain, mitochondrial	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4,00E-06
GLI	CP02-EG-001-009-D11-UE.F	ATP synthase D chain, mitochondrial (EC 3.6.3.14)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,00E-26
GLI BIO	contig138	ATP synthase D chain, mitochondrial	<i>Neurospora crassa</i>	5,00E-26
CAC BIO	contig 17	Cytochrome b5	<i>Mortierella alpina</i>	2,00E-21
BIO	CP04-EP-001-012-F02-UE.F	Cytochrome c oxidase polypeptide	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	9,00E-11
CAC BIO	contig333	cytochrome-c oxidase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,00E-24
SUB	contig201	hypothetical protein 23 (mitochondria)	<i>Crinipellis pernicioso</i>	5,00E-08
BIO	CP04-EP-001-006-F02-UE.F	NADH-ubiquinone oxidoreductase, putative	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,00E-41
BIO	CP04-EP-001-013-A02-UE.F	NADH-ubiquinone oxidoreductase, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5,00E-32
BIO	CP04-EP-001-022-A05-UE.G	Glyoxaloxidase 1oxidoreductase, GMC family	<i>Silicibacter pomeroyi</i>	3,00E-11



BIO	CP04-EP-001-007-D03-UE.F	putative chloroperoxidase	<i>Agaricus bisporus</i>	1,00E-37
BIO	CP04-EP-001-016-H03-UE.F	ubiquinol-cytochrome c reductase complex	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,00E-09
<i>Lipid Metabolism</i>				
GLI	CP02-EG-001-002-A10-UE.F	Mevalonate pyrophosphate decarboxylase	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-30
GLI	CP02-EG-001-003-D11-UE.F	Delta(14)-sterol reductase (EC 1.3.1.70)	<i>Ustilago maydis</i>	3,00E-25
GLI	CP02-EG-001-010-A05-UE.F	C-4 methyl sterol oxidase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4,00E-37
GLI	CP02-EG-001-010-C08-UE.F	acetyl-CoA acetyl transferase	<i>Laccaria bicolor</i>	1,00E-46
CAC	CP02-EC-001-014-F06-UE.F	PUTATIVE LIPASE/ESTERASE PROTEIN	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-05
SUB	contig238	C-4 methyl sterol oxidase, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,00E-33
BIO	contig331	Ergosterol biosynthetic protein 28	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,00E-17
BIO	CP04-EP-001-010-A10-UE.F	isopentenyl-diphosphate delta-isomerase, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	7,00E-33
BIO	CP04-EP-001-022-G05-UE.G	delta 12-fatty acid desaturase	<i>Lentinula edodes</i>	1,00E-33
BIO	CP04-EP-001-015-H03-UE.F	carotenoid ester lipase precursor	<i>Pleurotus sapidus</i>	3,00E-37
BIO	CP04-EP-001-021-H02-UE.G	oxysterol-binding protein	<i>Neurospora crassa</i>	2,00E-14
<i>Peptide and Protein Metabolism or Modification</i>				
SUB	CP02-ES-001-014-E12-UE.F	1,2-alpha-mannosidase dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycotransferase	<i>Aspergillus nidulans</i>	3,00E-08
CAC	contig8	glycotransferase	<i>Ustilago maydis</i>	1,00E-13
SUB	CP02-ES-001-015-G02-UE.F	peptide synthetase	<i>Nostoc sp</i>	5,00E-18
CAC	CP02-EC-001-015-G08-UE.F	Phospholipase-like protein	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-12
CAC GLI	contig137	ARF6_CHICK ADP-RIBOSYLATION FACTOR 6	<i>Ustilago maydis</i>	9,00E-23
GLI	CP02-EG-001-003-E10-UE.F	ADP-ribosylation factor-like protein	<i>Coprinopsis cinerea</i>	2,00E-73
GLI	CP02-EG-001-001-C09-UE.F	Protein phosphatase 2a 65kd regulatory subunit	<i>Lentinula edodes</i>	7,00E-65
CAC	CP02-EC-001-009-B11-UE.F	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase	<i>Gallus gallus</i>	7,00E-07
CAC	CP02-EC-001-002-C11-UE.F	putative ribosomal protein L26	<i>Oryza sativa</i>	4,00E-42
CAC	CP02-EC-001-001-E07-UE.F	probable 40S RIBOSOMAL PROTEIN S24	<i>Neurospora crassa</i>	6,00E-40
CAC	CP02-EC-001-002-H01-UE.F	40S RIBOSOMAL PROTEIN S13	<i>Agaricus bisporus</i>	3,00E-37
CAC	CP02-EC-001-004-G10-UE.F	60s ribosomal protein I2	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2,00E-32
CAC	CP02-EC-001-006-F12-UE.F	60s ribosomal protein L30/L30A	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2,00E-22
CAC	CP02-EC-001-008-D05-UE.F	40s ribosomal protein s10	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,00E-36
CAC	CP02-EC-001-008-F02-UE.F	60S ribosomal protein L6, mitochondrial precursor	<i>Ustilago maydis</i>	1,00E-06
CAC	CP02-EC-001-014-F02-UE.F	ribosomal protein L10	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,00E-68
CAC	CP02-EC-001-015-E05-UE.F	mitochondrial ribosomal Mrp10 protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,00E-10
CAC GLI	contig104	probable ribosomal protein S28	<i>Neurospora crassa</i>	7,00E-37
GLI	contig123	predicted protein	<i>Neurospora crassa</i>	1,00E-10
GLI	CP02-EG-001-001-C02-UE.F	60S ribosomal protein	<i>Cryptococcus neoformans</i>	9,00E-40
GLI	CP02-EG-001-002-B07-UE.F	ribosomal protein L17	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	1,00E-22

GLI	CP02-EG-001-002-H11-UE.F	50s ribosomal protein l14	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3,00E-26
GLI	CP02-EG-001-006-F08-UE.F	40s ribosomal protein S2	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4,00E-28
SUB	contig165	60s ribosomal protein l18	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	6,00E-40
CAC	contig77	prolyl isomerase Ess1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	4,00E-25
GLI	CP02-EG-001-003-B11-UE.F	Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like	<i>Danio rerio</i>	1,00E-08
GLI	CP02-EG-001-009-A04-UE.F	cyclophilin	<i>Pleurotus ostreatus</i>	4,00E-56
SUB	CP02-ES-001-011-G04-UE.F	Endoplasmic Reticulum Oxidoreductin 1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,00E-27
CAC	CP02-EC-001-012-H07-UE.F	translation elongation factor 2	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-19
GLI	CP02-EG-001-001-B05-UE.F	putative alpha NAC protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3,00E-27
CAC	CP02-EC-001-002-H09-UE.F	protein translation factor sui1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3,00E-23
CAC	CP02-EC-001-012-A10-UE.F	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,00E-48
GLI	CP02-EG-001-003-A09-UE.F	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 54 KD PROTEIN	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	4,00E-17
CAC	CP02-EC-001-005-A08-UE.F	HOMOLOG	<i>Aspergillus niger</i>	5,00E-24
CAC	contig18	subtilisin-like serine protease	<i>Coprinopsis cinerea</i>	9,00E-08
CAC	CP02-EC-001-007-D03-UE.F	Microsomal dipeptidase precursor	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4,00E-11
CAC	CP02-EC-001-006-G12-UE.F	Cell division control protein 53 (Cullin A)	<i>Ustilago maydis</i>	9,00E-42
CAC GLI	contig45	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-16 kDa	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-54
CAC GLI SUB	contig70	ubiquitin	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1,00E+167
CAC SUB	contig28	polyubiquitin	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	4,00E-64
GLI	CP02-EG-001-006-E03-UE.F	Proteasome component C7-alpha	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-33
SUB	CP02-ES-001-015-C12-UE.F	ubiquitin-specific protease 6 (UBP6)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,00E-26
BIO	CP04-EP-001-004-E04-UE.F	zinc carboxypeptidase	<i>Aspergillus nidulans</i>	4,00E-15
BIO	CP04-EP-001-008-C07-UE.F	Urease accessory protein ureG, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	4,00E-34
BIO	CP04-EP-001-021-E06-UE.G	putative proteasome maturation factor	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	7,00E-12
BIO	CP04-EP-001-005-C06-UE.F	probable phosphoprotein phosphatase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,00E-08
BIO	CP04-EP-001-012-E08-UE.F	protein phosphatase 4 catalytic subunit	<i>Dictyostelium discoideum</i>	2,00E-59
BIO	CP04-EP-001-019-A09-UE.F	potential mitochondrial chaperonin	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-12
GLI BIO	contig308	putative cyclophilin dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48	<i>Pleurotus sp</i>	3,00E-58
CAC	contig8	mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,00E-11
SUB	contig240	Hypusine containing protein HP2	<i>Aspergillus nidulans</i>	1,00E-12
CAC BIO	contig87	casein kinase ii beta chain	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5,00E-44
BIO	CP04-EP-001-003-B03-UE.F	casein kinase ii beta chain (ck ii), putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-37
BIO	CP04-EP-001-003-B03-UE.F	casein kinase ii beta chain (ck ii), putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-37
BIO	CP04-EP-001-008-A02-UE.F	guanine nucleotide binding protein beta subunit	<i>Lentinula edodes</i>	5,00E-80
BIO	CP04-EP-001-025-C09-UE.F	elongation initiation factor 5C [	<i>Drosophila melanogaster</i>	2,00E-13

BIO	CP04-EP-001-016-F09-UE.F	Dipeptidyl aminopeptidases/acylaminoacyl-peptidases	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	8,00E-19
SUB	contig284	leucyl aminopeptidase, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	6,00E-22
BIO	CP04-EP-001-010-D03-UE.F	Proteasome subunit, beta type 1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	8,00E-44
BIO	CP04-EP-001-005-D07-UE.F	putative aspartyl-proteinase	<i>Pleurotus sp.</i>	2,00E-21
BIO	contig304	RPN12 PROTEIN.	<i>Apis mellifera</i>	8,00E-22
GLI BIO	contig328	ThiJ/Pfpl family protein	<i>Leptospira interrogans</i>	9,00E-09
BIO	CP04-EP-001-007-H04-UE.F	ubiquitin-specific protease, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,00E-17
CAC	CP02-EC-001-015-A11-UE.F	poly(A) binding protein	<i>Emericella nidulans</i>	3,00E-28
<i>Nucleic Acid Metabolism</i>				
GLI	CP02-EG-001-002-D07-UE.F	dna polymerase delta small subunit Predicted metal-dependent RNase, consists of a metallo-beta-lactamase domain and an RNA-binding KH domain	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3,00E-20
CAC GLI SUB	contig169		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2,00E-16
GLI	contig134	RNA helicase-1	<i>Plasmodium falciparum</i>	9,00E-47
CAC	CP02-EC-001-015-E10-UE.F	ARGININE/SERINE-RICH PROTEIN	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5,00E-22
GLI	contig136	small nuclear ribonucleoprotein, F-like	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	6,00E-20
CAC	CP02-EC-001-013-F10-UE.F	glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6,00E-08
GLI	CP02-EG-001-009-C03-UE.F	2'-O-ribosyl phosphate transferase RIT1	<i>Neurospora crassa</i>	2,00E-24
BIO	CP04-EP-001-022-C04-UE.G	DNA repair helicase, putative	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2,00E-17
BIO	CP04-EP-001-023-G02-UE.F	ribonucleotide reductase small subunit	<i>Lentinula edodes</i>	1,00E-56
BIO	CP04-EP-001-012-G02-UE.F	decapping protein 2-like	<i>Oryza sativa</i>	1,00E-20
BIO	CP04-EP-001-006-C10-UE.F	exosome complex exonuclease rrp45, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	4,00E-40
BIO	CP04-EP-001-010-B04-UE.F	probable RRM-type RNA binding protein	<i>Neurospora crassa</i>	2,00E-28
BIO	CP04-EP-001-009-D05-UE.F	asparagine-tRNA ligase, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,00E-08
BIO	CP04-EP-001-002-E06-UE.F	Mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9,00E-25
BIO	CP04-EP-001-002-E06-UE.F	Mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9,00E-25
BIO	CP04-EP-001-009-G07-UE.F	tRNA-intron endonuclease, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5,00E-11
<i>Transcription Regulation</i>				
SUB	contig198	CCR4 transcriptional complex component	<i>Cryptococcus neoformans</i>	6,00E-46
BIO	CP04-EP-001-013-D11-UE.F	probable transcription factor BTF3a	<i>Neurospora crassa</i>	5,00E-41
BIO	CP04-EP-001-010-G09-UE.F	ThiJ/Pfpl family protein	<i>Xanthomonas campestris</i>	6,00E-16
GLI BIO	contig295	yIMBF1- putative multi-protein binding factor 1	<i>Yarrowia lipolytica</i>	3,00E-32
BIO	CP04-EP-001-010-D01-UE.F	translation elongation factor-1 gamma Transcriptional regulator containing an amidase domain and an AraC-type DNA-binding HTH domain	<i>Locusta migratoria</i>	5,00E-09
GLI	CP02-EG-001-002-C11-UE.F		<i>Aspergillus nidulans</i>	4,00E-27
CAC	CP02-EC-001-006-E02-UE.F	transcription factor ScGATA-6	<i>Schizophyllum commune</i>	4,00E-09
CAC	CP02-EC-001-012-B07-UE.F	Histone acetyltransferase HPA2	<i>Kineococcus radiotolerans</i>	5,00E-10

CAC	CP02-EC-001-014-F05-UE.F	ELONGIN-C PROTEIN	<i>Drosophila yakuba</i>	1,00E-09
GLI	CP02-EG-001-004-D04-UE.F	Putative zinc finger protein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7,00E-11
GLI	CP02-EG-001-006-H01-UE.F	nonhistone chromosomal protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2,00E-18
GLI	CP02-EG-001-003-H07-UE.F	putative multi-protein binding factor 1	<i>Yarrowia lipolytica</i>	9,00E-27
<i>Oxidative Stress Response/Peroxide Formation</i>				
CAC	contig11	NADPH oxidase	<i>Emericella nidulans</i>	5,00E-20
CAC GLI	contig67	glucose oxidase	<i>Talaromyces flavus</i>	3,00E-14
SUB	contig249	Putative copper amine oxidase	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-28
CAC	contig38	NADPH oxidase	<i>Emericella nidulans</i>	2,00E-15
CAC	CP02-EC-001-001-G07-UE.F	NADPH oxidase	<i>Emericella nidulans</i>	2,00E-15
GLI BIO	contig128	copper transporter	<i>Pleurotus ostreatus</i>	4,00E-19
CAC BIO	contig15	manganese-superoxide dismutase precursor	<i>Paxillus involutus</i>	4,00E-80
BIO	CP04-EP-001-010-F09-UE.F	peroxidase TAP	<i>Termitomyces albuminosus</i>	2,00E-44
CAC	contig14	manganese-superoxide dismutase	<i>Ganoderma microsporum</i>	9,00E-72
CAC BIO SUB	contig1	cytochrome P450	<i>Lentinula edodes</i>	2,00E-26
CAC SUB	contig2	cytochrome P450	<i>Agaricus bisporus</i>	8,00E-34
CAC	contig111	glucose oxidase	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	1,00E-19
<i>Toxin Metabolism</i>				
CAC	CP02-EC-001-001-E11-UE.F	thaumatin-like protein	<i>Zea mays</i>	7,00E-11
CAC GLI	contig59	Kp4 Toxin; Chain: A, B;	<i>Ustilago Maydis</i>	1,00E-10
CAC	contig1	cytochrome P450	<i>Agaricus bisporus</i>	4,00E-33
CAC	CP02-EC-001-007-C04-UE.F	cytochrome P450	<i>Lentinula edodes</i>	5,00E-16
CAC SUB	contig83	cytochrome P450	<i>Agaricus bisporus</i>	2,00E-24
SUB	CP02-ES-001-008-C12-UC.F	related to cytochrome p450	<i>Neurospora crassa</i>	2,00E-07
SUB	contig162	OMST oxidoreductase (cytochrome p450)	<i>Aspergillus flavus</i>	2,00E-06
CAC	CP02-EC-001-009-G11-UE.F	glutathione-s-transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,00E-13
GLI	CP02-EG-001-002-C06-UE.F	glutathione s transferase	<i>Gibberella zeae</i>	2,00E-13
<i>N-Glycan/Aminosugar Metabolism</i>				
BIO	CP04-EP-001-015-H04-UE.F	chitin deacetylase	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5,00E-28
BIO	CP02-ES-002-018-F10-FC.F	phenylalanine ammonium lyase	<i>Amanita muscaria</i>	1,00E-21
BIO	CP04-EP-001-022-B05-UE.G	Glyoxal oxidase 1	<i>Neurospora crassa</i>	7,00E-16
GLI	CP02-EG-001-008-F05-UE.F	aryl-alcohol oxidase precursor	<i>Pleurotus eryngii</i>	1,00E-11
CAC	CP02-EC-001-006-D07-UE.F	Laccase	<i>Rigidoporus microporus</i>	4,00E-13
SUB	CP02-ES-001-009-H10-UE.F	laccase	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	2,00E-18
CAC	CP02-EC-001-005-A09-UE.F	1,4-benzoquinone reductase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	6,00E-33
BIO	contig319	glucuronyl hydrolase	<i>Agaricus bisporus</i>	2,00E-30

*Pathogenesis Related*

GLI	CP02-EG-001-002-D05-UE.F	pathogenesis-related protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4,00E-09
GLI	contig130	CFEM, eight cysteine-containing domain present in fungal extracellular membrane proteins	<i>Aspergillus nidulans</i>	8,00E-06
GLI	CP02-EG-001-002-B03-UE.F	CFEM conserved domain	<i>Gibberella zeae</i>	5,00E-09
GLI BIO	contig294	potential cell surface antigen	<i>Candida albicans</i>	8,00E-08
BIO	CP04-EP-001-015-A10-UE.F	pathogenicity protein	<i>Magnaporthe grisea</i>	3,00E-12
BIO				
CAC	CP02-EC-001-004-C12-UE.F	30 KD HEAT SHOCK PROTEIN	<i>Emericella nidulans</i>	3,00E-07
CAC	CP02-EC-001-005-B08-UE.F	Member of the p14.5 protein family with similarity to Mmf1p	<i>Neurospora crassa</i>	6,00E-16
SUB	CP02-ES-001-004-H04-UC.F	heat shock protein 70	<i>Pneumocystis carinii</i>	1,00E-34
SUB	contig264	Heat shock cognate 70 kDa protein 3	<i>Neurospora crassa</i>	7,00E-63
BIO	CP04-EP-001-008-H10-UE.F	small heat shock protein	<i>Laccaria bicolor</i>	8,00E-45
<i>Transport</i>				
BIO	contig322	stomatin-like protein, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-23
CAC SUB	contig94	Choline dehydrogenase	<i>Ustilago maydis</i>	4,00E-17
GLI	CP02-EG-001-009-A10-UE.F	4 aminobutyrate aminotransferase	<i>Streptomyces coelicolor</i>	2,00E-22
SUB	CP02-ES-001-009-D08-UE.F	Excitatory amino acid transporter 2 (Sodium-dependent glutamate/aspartate transporter 2)	<i>Ambystoma tigrinum</i>	2,00E-09
CAC	CP02-EC-001-007-C12-UE.F	Plasma membrane proteolipid 3	<i>Neurospora crassa</i>	3,00E-21
CAC	CP02-EC-001-005-B07-UE.F	nuclear pore complex subunit, protein involved in release of transport vesicles from the ER	<i>Ustilago maydis</i>	3,00E-17
CAC	CP02-EC-001-001-B05-UE.F	glycerol efflux/uptake facilitator protein	<i>Leishmania major</i>	5,00E-09
CAC GLI	contig25	putative emp24/gp25L/p24	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,00E-07
GLI	contig117	copper transporter	<i>Pleurotus sp.</i>	1,00E-17
CAC	CP02-EC-001-014-F12-UE.F	metallothionein	<i>Agaricus bisporus</i>	8,00E-05
GLI	CP02-EG-001-001-B11-UE.F	peptide transporter MTD1	<i>Schizophyllum commune</i>	1,00E-27
CAC	CP02-EC-001-011-H12-UE.F	Succinate/fumarate mitochondrial transporter (Regulator of acetyl-CoA synthetase activity).	<i>Neurospora crassa</i>	9,00E-20
CAC	CP02-EC-001-003-E02-UE.F	adaptor-related protein complex AP-3, sigma 2 subunit	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,00E-30
GLI	CP02-EG-001-003-B08-UE.F	Synaptobrevin-like protein	<i>Dictyostelium discoideum</i>	2,00E-21
CAC GLI	contig60	surfeit locus protein 4 homologue, putative	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3,00E-25
BIO	CP04-EP-001-005-B05-UE.F	adenine nucleotide translocator	<i>Zea mays</i>	3,00E-26
BIO	CP04-EP-001-004-E11-UE.F	ER to Golgi transport-related protein, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	4,00E-45
BIO	CP04-EP-001-004-G10-UE.F	ER to Golgi transport-related protein, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5,00E-19
BIO	CP04-EP-001-013-F12-UE.F	mitochondrial phosphate carrier protein, putative	<i>Theileria annulata</i>	1,00E-13

BIO	CP04-EP-001-004-H03-UE.F	monosaccharide transporter	<i>Aspergillus niger</i>	5,00E-14
BIO	CP04-EP-001-023-C09-UE.F	GABA transporter	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,00E-28
BIO	CP04-EP-001-021-D05-UE.G	putative lysine-specific permease	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1,00E-26
BIO	CP04-EP-001-021-D09-UE.G	putative vacuolar ATP synthase subunit H	<i>Oryza sativa</i>	2,00E-10
EC GLI BIO	contig140	ARF3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,00E-28
BIO	CP04-EP-001-005-E04-UE.F	probable ras related GTP-binding protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1,00E-08
CAC BIO	contig58	cation transport-related protein, putative	<i>Cryptococcus neoformans</i>	4,00E-22
CAC EP	contig 29	Golgi to vacuole transport-related protein, putat	<i>Cryptococcus neoformans</i>	9,00E-48
<i>Unknown Function</i>				
BIO	CP04-EP-001-005-C09-UE.F	iron-sulfur cluster Isu1-like protein	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,00E-41
CAC	contig29	hypothetical protein CNBC0450	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,00E-16
CAC	contig32	hypothetical protein CNBK3120	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,00E-37
CAC	contig71	hypothetical protein UM01150.1	<i>Ustilago Maydis</i>	5,00E-06
CAC	contig75	hypothetical protein CNBG1530	<i>Cryptococcus neoformans</i>	7,00E-08
CAC	contig79	hypothetical protein MG04910.4	<i>Magnaporthe grisea</i>	1,00E-08
CAC	contig87	hypothetical protein CNBD2380	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,00E-10
CAC	contig96	hypothetical protein UM04957.1	<i>Ustilago maydis</i>	6,00E-11
CAC	CP02-EC-001-001-F10-UE.F	putative ankyrin-like protein	<i>Streptomyces coelicolor</i>	4,00E-11
CAC	CP02-EC-001-001-G11-UE.F	hypothetical protein	<i>Yarrowia lipolytica</i>	8,00E-07
CAC	CP02-EC-001-002-A05-UE.F	putative chloroperoxidase	<i>Agaricus bisporus</i>	9,00E-10
CAC	CP02-EC-001-002-C09-UE.F	hypothetical protein UM00108.1	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-07
CAC	CP02-EC-001-002-D06-UE.F	hypothetical protein UM01632.1	<i>Ustilago maydis</i>	6,00E-06
CAC	CP02-EC-001-002-D12-UE.F	conserved hypothetical protein	<i>Aspergillus nidulans</i>	1,00E-26
CAC	CP02-EC-001-002-F05-UE.F	hypothetical protein UM06218.1	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-15
CAC	CP02-EC-001-002-F12-UE.F	hypothetical protein AN7949.2	<i>Aspergillus nidulans</i>	2,00E-18
CAC	CP02-EC-001-002-H02-UE.F	hypothetical protein UM01219.1	<i>Ustilago maydis</i>	8,00E-19
CAC	CP02-EC-001-003-E05-UE.F	hypothetical protein MG06556.4	<i>Magnaporthe grisea</i>	5,00E-05
CAC	CP02-EC-001-003-E07-UE.F	hypothetical protein UM00292.1	<i>Ustilago maydis</i>	4,00E-32
CAC	CP02-EC-001-003-F07-UE.F	related to PEP5 protein	<i>Neurospora crassa</i>	4,00E-28
CAC	CP02-EC-001-003-G06-UE.F	predicted protein	<i>Neurospora crassa</i>	1,00E-27
CAC	CP02-EC-001-003-H08-UE.F	hypothetical protein UM01686.1	<i>Ustilago maydis</i>	7,00E-51
CAC	CP02-EC-001-005-B03-UE.F	hypothetical protein UM04749.1	<i>Ustilago maydis</i>	4,00E-27
CAC	CP02-EC-001-005-H06-UE.F	hypothetical protein UM01283.1	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-21
CAC	CP02-EC-001-006-C03-UE.F	hypothetical protein FG01175.1	<i>Gibberella zeae</i>	6,00E-07
CAC	CP02-EC-001-006-F06-UE.F	hypothetical protein AN7710.2	<i>Aspergillus nidulans</i>	3,00E-22
CAC	CP02-EC-001-006-H06-UE.F	DUF636	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	1,00E-07

CAC	CP02-EC-001-008-E05-UE.F	hypothetical protein UM04030.1	<i>Ustilago maydis</i>	4,00E-10
CAC	CP02-EC-001-009-E07-UE.F	hypothetical protein FG11255.1	<i>Gibberella zeae</i>	3,00E-07
CAC	CP02-EC-001-009-H11-UE.F	hypothetical protein CNBB3590	<i>Cryptococcus neoformans</i>	7,00E-09
CAC	CP02-EC-001-011-H01-UE.F	hypothetical protein AN7652.2	<i>Aspergillus nidulans</i>	5,00E-07
CAC	CP02-EC-001-012-B08-UE.F	hypothetical protein UM03539.1	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-15
CAC	CP02-EC-001-014-E03-UE.F	hypothetical protein Avar025200	<i>Anabaena variabilis</i>	4,00E-10
CAC	CP02-EC-001-014-F01-UE.F	hypothetical protein CNBC3230	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,00E-14
CAC	CP02-EC-001-015-H04-UE.F	hypothetical protein UM04793.1	<i>Ustilago maydis</i>	1,00E-24
CAC	contig106	putative bifunctional protein	<i>Streptomyces coelicolor</i>	1,00E-06
CAC GLI	contig9	hypothetical protein CNBJ1380	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5,00E-11
CAC GLI	contig21	AAR075Cp (hypotetical protein)	<i>Eremothecium gossypii</i>	1,00E-20
CAC GLI	contig30	hypothetical protein UM00262.1	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-06
CAC GLI	contig31	hypothetical protein CNBB4210	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,00E-10
CAC GLI	contig33	hypothetical protein MG08765.4	<i>Magnaporthe grisea</i>	4,00E-08
CAC GLI	contig44	hypothetical protein MG05344.4	<i>Magnaporthe grisea</i>	5,00E-26
CAC GLI	contig50	predicted protein	<i>Neurospora crassa</i>	3,00E-27
CAC GLI	contig58	hypothetical protein UM00309.1	<i>Ustilago maydis</i>	5,00E-47
CAC GLI	contig63	hypothetical protein UM05176.1	<i>Ustilago Maydis</i>	3,00E-20
CAC GLI	contig91	hypothetical protein CNBI2770	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-07
CAC GLI	contig97	hypothetical protein UM02261.1	<i>Ustilago maydis</i>	1,00E-29
CAC GLI	contig100	allergen	<i>Malassezia sympodialis</i>	5,00E-08
CAC GLI	contig110	hypothetical protein	<i>Neurospora crassa</i>	4,00E-06
CAC GLI	contig111	Aycl012	<i>Cryptococcus neoformans</i>	6,00E-07
CAC GLI	contig135	hypothetical protein UM05875.1	<i>Ustilago maydis</i>	3,00E-35
CAC SUB	contig15	hypothetical protein CNBD4370	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-33
CAC SUB	contig42	hypothetical protein MG08593.4	<i>Magnaporthe grisea</i>	4,00E-06
GLI	contig112	hypothetical protein UM02862.1	<i>Ustilago maydis</i>	1,00E-08
GLI	contig129	hypothetical protein MG05855.4	<i>Magnaporthe grisea</i>	7,00E-16
GLI	CP02-EG-001-001-E05-UE.F	hypothetical protein FG04390.1	<i>Gibberella zeae</i>	1,00E-13
GLI	CP02-EG-001-001-E11-UE.F	hypothetical protein AN0052.2	<i>Aspergillus nidulans</i>	7,00E-14
GLI	CP02-EG-001-002-D02-UE.F	hypothetical protein AN2727.2	<i>Aspergillus nidulans</i>	1,00E-07
GLI	CP02-EG-001-002-F11-UE.F	putative GAMM1 protein	<i>Oryza sativa</i>	2,00E-38
GLI	CP02-EG-001-002-G07-UE.F	hypothetical protein	<i>Ustilago maydis</i>	3,00E-13
GLI	CP02-EG-001-002-H08-UE.F	hypothetical protein FG02341.1	<i>Gibberella zeae</i>	4,00E-06
GLI	CP02-EG-001-003-A10-UE.F	hypothetical protein UM01632.1	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-05
GLI	CP02-EG-001-003-F10-UE.F	hypothetical protein AN8309.2	<i>Aspergillus nidulans</i>	1,00E-13

GLI	CP02-EG-001-004-B12-UE.F	hypothetical protein CNBN1440	<i>Cryptococcus neoformans</i>	4,00E-10
GLI	CP02-EG-001-006-A10-UE.F	hypothetical protein UM01193.1	<i>Ustilago maydis</i>	1,00E-06
GLI	CP02-EG-001-008-A10-UE.F	hypothetical protein UM00961.1	<i>Ustilago maydis</i>	1,00E-07
GLI	CP02-EG-001-008-D08-UE.F	hypothetical protein UM00615.1	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-52
GLI	CP02-EG-001-008-F08-UE.F	hypothetical protein CNBA0800	<i>Cryptococcus neoformans</i>	6,00E-37
GLI	CP02-EG-001-009-C12-UE.F	hypothetical protein UM01709.1	<i>Ustilago maydis</i>	1,00E-16
GLI	CP02-EG-001-009-F10-UE.F	hypothetical protein MG06653.4	<i>Magnaporthe grisea</i>	2,00E-10
GLI	CP02-EG-001-010-C10-UE.F	hypothetical protein CNBE4120	<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,00E-22
GLI	CP02-EG-001-010-E06-UE.F	hypothetical protein UM03733.1	<i>Ustilago maydis</i>	9,00E-07
GLI	CP02-EG-001-010-H09-UE.F	Dehydrogenases with different specificities (related to short-chain alcohol dehydrogenases)	<i>Streptococcus suis</i>	1,00E-09
		ALU4_HUMAN Alu subfamily SB2 sequence	<i>Homo sapiens (bata com CP genômico)</i>	
SUB	contig141	contamination warning entry		2,00E-10
SUB	contig147	hypothetical protein CNBJ1790	<i>Cryptococcus neoformans</i>	5,00E-26
SUB	contig166	hypothetical protein AN8185.2	<i>Aspergillus nidulans</i>	4,00E-13
SUB	contig167	hypothetical protein CNBE0330	<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,00E-21
SUB	CP02-ES-001-004-H11-UC.F	hypothetical protein UM00988.1	<i>Ustilago maydis</i>	8,00E-25
SUB	CP02-ES-001-005-F07-UC.F	hypothetical protein UM01432.1	<i>Ustilago maydis</i>	2,00E-08
SUB	CP02-ES-001-006-D05-UC.F	hypothetical protein CNBB4100	<i>Cryptococcus neoformans</i>	1,00E-12
SUB	CP02-ES-001-009-G08-UE.F	hypothetical protein	<i>Neurospora crassa</i>	6,00E-09
		HUMAN Alu subfamily SP sequence	<i>Homo sapiens (bata com CP genômico)</i>	
SUB	CP02-ES-001-012-D06-UE.F	warning entry		5,00E-23
SUB	CP02-ES-001-014-E09-UE.F	hypothetical protein FG05434.1	<i>Gibberella zeae</i>	2,00E-20
SUB	contig245	mala s 12 allergen precursor	<i>Malassezia sympodialis</i>	5,00E-14



### 8.3. ANEXO C. Manuscrito Publicado na Revista Current Microbiology (v.52, n.3, 191-197p) de Co-autoria da Aluna

CURRENT MICROBIOLOGY Vol. xx (2006), pp. 1-7  
DOI: 10.1007/s00284-005-0182-z

**Current  
Microbiology**

An International Journal

© Springer Science+BusinessMedia, Inc. 2006

## In Vitro Production of Biotrophic-Like Cultures of *Crinipellis pernicioso*, the Causal Agent of Witches' Broom Disease of *Theobroma cacao*

Lyndel W. Meinhardt,<sup>1</sup> Cláudia M. de Bellato,<sup>2</sup> Johana Rincones,<sup>1</sup> Ricardo A. Azevedo,<sup>3</sup> Julio C. M. Cascardo,<sup>4</sup> Gonçalo A. G. Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas, São Paulo, Brazil, 13083-970

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil, 13416-000

<sup>3</sup>Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil, 13400-970

<sup>4</sup>Laboratório de Genômica e Expressão Gênica, Universidade Estados Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16, Ilhéus, Bahia, Brazil, 45650-000

Received: 24 June 2005 / Accepted: 9 November 2005

**Abstract.** Witches' broom disease (WBD) of cacao, caused by the hemibiotrophic fungus, *Crinipellis pernicioso*, exhibits a succession of symptoms that are caused by the biotrophic phase of the fungus. However, the study of this biotrophic phase is limited by its exclusive growth inside the plant or in the presence of callus. Here we report for the first time a method for the growth and maintenance of the biotrophic-like phase of *C. pernicioso* on a defined medium with metabolites found in the diseased tissues. Our results suggest that glycerol is a key carbon source for this interaction. This is a crucial achievement toward understanding the biology of this fungus during the infectious phase of WBD.

*Theobroma cacao* is the source of cocoa beans, the raw material for the production of chocolate. Its worldwide production is hindered by several major fungal pathogens. *Crinipellis pernicioso* (Stabel) Singer (*Basidiomycota*, *Agaricales*, *Tricholomataceae*) is a hemibiotrophic fungal pathogen that causes witches broom disease (WBD) of cacao, which has drastically decreased cacao production in most of the western hemisphere [11]. This fungal pathogen appears to have originated in the Amazon basin, where it infects and causes disease on plant species from the families *Heteropterys*, *Sterculiaceae*, *Solanaceae*, and *Bignoniaceae* [7, 13, 14, 23, 24]. Because of the importance of this disease, a genome project is currently sequencing *C. pernicioso*.

WBD begins when wind-borne monokaryotic spores infect young meristematic tissues through stomatal openings [8]. The unicellular biotrophic mycelia lack clamp connections and grow intercellularly within

the living host tissues without causing the death of the tissue [2]. An important aspect of this disease is that the infectious process, disease development, and ultimate death of the tissue all happen at or distal to the original infection point, thus limiting the spread and scope of this disease to new growth. Furthermore, all of the elicited plant responses of the living tissue result from a limited amount of fungal biomass [22]. The characteristic symptoms of WBD, caused only by the biotrophic phase of the fungus, are hyperplastic and hypertrophic growth of infected meristematic tissues, which are associated with the loss of apical dominance, resulting in brooming of the affected branches and the occurrence of parthenocarpic fruits, which occur when flower cushions are infected [11]. After 2 to 3 months, the fungus undergoes dikaryotization, produces clamp connections, and transforms to the saprotrophic phase [2]. The mechanisms involved in the change of the fungal phases (from biotrophic to saprotrophic) are not presently known, but it coincides with the cessation of green broom development and the subsequent senescence of the broom, which is rapidly colonized by the saprotrophic fungal

Correspondence to: L. W. Meinhardt; email: meinharl@ba.ars.usda.gov

mycelia. After multiple cycles of wetting and drying, the fungal matrix inside the dry broom produces small pinkish basidiocarps on the surface of the broom and copious amounts of basidiospores. The process of basidiocarp formation from a single broom can be repeated for several years.

A number of different plant metabolites have been suggested in the past to have a role in maintaining or shifting the biotrophic phase of *C. pernicioso*. In the work of Brownlee et al. [3–5], cacao metabolites such as tannins and procyanidins were shown to have the ability to alter the growth of *C. pernicioso*. Furthermore, Evans [7] postulated that decreasing sugars prevented the dikaryotization of the biotrophic phase. Unfortunately, none of these compounds have led to a method by which the biotrophic phase can be maintained for extended periods in culture. Therefore, to date, very little is known about the biotrophic phase of *C. pernicioso* because it has only been observed in vivo or maintained in vitro in the presence of cacao or potato callus [7, 14]. Germinating spores in typical culture media rapidly undergo dikaryotization, resulting in the saprotrophic phase [7, 14, 16]. Consequently, almost all current knowledge of this fungus is based on the saprotrophic phase despite the obvious biochemical, metabolic, and physiologic differences between the two phases. These differences are consistent with findings from our own recent work [26]. Therefore, one of the main objectives of our research is to develop methodologies to examine *C. pernicioso* at all stages of the disease process, with particular emphasis on the biotrophic phase, which could ultimately lead to a control for WBD.

In this article, we report for the first time the conditions preventing the rapid in vitro shift of *C. pernicioso* cultures from the monokaryotic mycelia, which germinate from spores, to the saprotrophic/necrotrophic hyphae. A defined medium containing host metabolites was developed to support the stable growth of hyphae that were morphologically identical to the biotrophic hyphae found in infected cacao tissues. This achievement opens the possibility of studying in vitro the most important phase of *C. pernicioso* biology and could potentially be applied to other hemibiotrophic or biotrophic fungi.

## Materials and Methods

**Basidiospores.** Basidiospores were prepared by the bran-vermiculite medium as described by Griffith and Hodger [12] from single-spore isolates and were collected and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  in a buffered 16% (v/v) glycerol solution [9]. Spore preparations were provided by Dr. Alan Pomella (Almirante Cacau Agrícola, Itajupe, Bahia, Brazil) and were maintained at  $-70^{\circ}\text{C}$  before use. Before plating, spores were thawed at room temperature, and a volume representing approximately 250,000 spores was diluted in 2 volumes of sterile water containing kanamycin

( $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and streptomycin ( $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ), and the mixture was spread over a 15-cm diameter plate containing the spore germination medium.

**Spore germination medium.** Spore germination was carried out on a water-agar ( $30\ \text{g l}^{-1}$ )-based medium containing glycerol ( $20\ \text{ml l}^{-1}$ ) as sole carbon source with no nitrogen source. A final concentration of  $5\ \text{mg l}^{-1}$  caffeine was added before autoclaving, and  $10\ \text{mg l}^{-1}$  auxin (indole-3-acetic acid) was added as a sterile solution ( $25\ \text{mg ml}^{-1}$  stock solution made up in 0.1 N KOH and filter sterilized) after autoclaving. This solid medium was designated LMCpS+. After adding and spreading the spore-water dilution (mentioned previously with antibiotics) over the surface, the plates were immediately wrapped with plastic film so that the surface of the plate was covered with a layer of water and spores. This was done to ensure a layer of free water, which is required for spore germination [8]. This method was used with spores that were relatively free of contaminating bacteria, yeast, or other fungal species. With contaminated spore preparations, the method was modified by using an additional step, which was to apply a  $15\text{-g l}^{-1}$  top agar after the addition of the spore solution. The top agar contained the same concentrations of antibiotics, auxin, caffeine, and glycerol—as mentioned previously—as in the support layer. This additional step helped by confining the contaminating bacteria and yeast within the top agar. Plates were incubated at  $28^{\circ}\text{C}$  in the dark.

**Microscopic evaluations.** A stereomicroscope (Zeiss Stemi 1000; Zeiss International) was used to monitor the germination and growth of the *C. pernicioso* spores on a daily basis. Minicolonies derived from single spores were observed after 7 to 10 days. Colonies that showed rapid germination or growth, especially within the first 5 days, were not *Crinipellis* sp. (most were either *Penicillium* or *Trichoderma* spp.) and were removed aseptically. Agar blocks containing *C. pernicioso* mycelia were removed, placed onto a slide, squashed under a cover slip, and observed with a light microscope (using oil-emersion) to verify the presence of dolipore septa and the lack of clamp connections. Mycelia were stained with SYBR Green I (Invitrogen—Molecular Probes, Eugene, OR) as described by Meinhardt et al. [19] to verify nuclei number per cell with epifluorescence microscopy (Olympus BX40 microscope with a BX-FLA fluorescence attachment; Olympus, Melville, NY) and excitation filters (Olympus filter cube WB excitation 450 to 480 and emission 515).

**Liquid growth medium.** Biotrophic-like mycelia of *C. pernicioso* were aseptically cut from the LMCpS+ medium. The agar blocks (approximately 1 to 2  $\text{cm}^3$  agar and mycelia) were cut into numerous smaller blocks and added to 50-mL flasks containing a semidefined liquid growth medium comprising  $5\ \text{g l}^{-1}$  yeast extract (Difco),  $50\ \text{ml l}^{-1}$  glycerol,  $2.5\ \text{g l}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and  $1\ \text{ml l}^{-1}$  MPR trace elements [18] and designated LMCpL+. The inoculated medium was placed at  $27^{\circ}\text{C}$  at 120 rpm in the dark. The mycelia were microscopically monitored with a Nikon Elipse E800 microscope (Nikon, Melville, NY) equipped with the Media Cybernetics Digital Imaging System [Image Pro Plus version 4.0] every 48 hours to ensure that no alteration had occurred in the growth phase and to check for contamination.

**DNA extraction.** To verify the identity of the fungal mycelia, DNA analysis of the biotrophic-like phase of *C. pernicioso* was conducted. DNA was extracted from mycelia grown in LMCpL+ medium that had been verified by microscopy to have the characteristics of the biotrophic phase. DNA extraction was done according to Meinhardt et al. [20] (<http://www.scielo.br>). Microsatellite polymerase chain reaction (PCR) primers [20, 21] were tested with DNA extracted from the biotrophic-like and saprotrophic phases of the same isolates. The primers used were capable of distinguishing genetic variability among



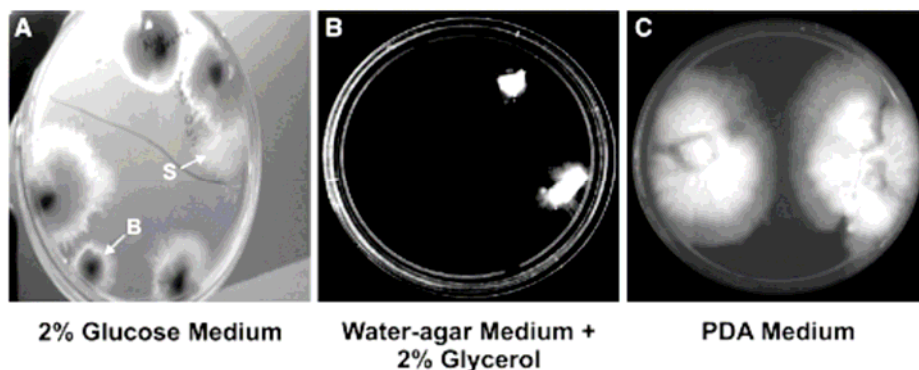


Fig. 1. Representative growth patterns of the different phases of *C. perniciosus* on agar media. (A) Typical slow-growing biotrophic phase. B = colony; S = fast-growing sector. Small slow-growing colonies were moved from LMCpS+ medium to the same medium supplemented with 2% glucose without glycerol. Sectoring began between 10 and 14 days after transferring to the colonies. (B) Agar blocks containing the biotrophic-like mycelia were removed from the primary plate, LMCpS+ medium, and transferred to a plate with water-agar plus 2% glycerol. The plate shows 14 days of growth of the biotrophic-like phase. (C) Agar blocks containing the biotrophic-like mycelia were transferred to a PDA plate where the mycelia transformed to the saprotrophic phase. The plate shows 14 days of growth after transference. The biotrophic-like mycelia rapidly transformed to saprotrophic (note the fast-growing sectors) on PDA medium. PDA = potato-dextrose agar.

the different clonal populations of *C. perniciosus* [25]. The ITS region containing the ITS1, ITS2, and 5.8S sequences were amplified with the universal ITS1 and ITS4 primers [28]. PCR-restriction length fragment polymorphism analysis was done with the restriction enzyme *HinfI* [1].

## Results and Discussion

Initially, we reasoned that substances present in living infected tissues could be determinants for the maintenance of the biotrophic phase of *C. perniciosus*. Therefore, we tried to mimic the conditions found in the infected tissue by adding specific compounds to artificial culture medium. Spores were germinated at low densities on water-agar media to identify *C. perniciosus* monokaryotic mycelia and isolate them from contaminants that are frequently associated with spore preparations. The germinating spores were then transferred after 7 days to other media containing different classes of compounds at different concentrations. In most cases, the cultures rapidly shifted to binucleate mycelia with clamp connections, which are characteristics of the saprotrophic phase of this fungus. The first promising results were achieved by inoculating spores onto a nutrient-poor solid medium containing  $5 \text{ mg l}^{-1}$  caffeine,  $10 \text{ mg l}^{-1}$  auxin, and 0.05% glucose. In this case, we could clearly detect the slow-growing colonies with mononucleated hyphae, dolipore septae and no clamp connections, which are distinct well-accepted features of the biotrophic mycelia [7, 14, 23, 8, 2]. However, these colonies were unstable, and they transformed into the saprotrophic/necrotrophic hyphae within 15 days, which would typically begin as a faster-growing sector of mycelia at the border of the colonies. (Fig. 1A). Sub-

sequently, our group found that green brooms contain a significantly higher amount of glycerol than normal tissues [26], and thus we tried this carbon source to replace glucose. Spores plated onto the LMCpS+ medium showed small slow-growing minicolonies approximately 7 days after inoculation. These slow-growing colonies had white fluffy mycelia that normally stopped growing after 4 to 6 weeks on the solid medium (Fig. 1B), although the cells remained viable for up to 3 months on this plate. The viability was tested by transferring the colonies to the LMCpL+ liquid medium and evaluating the growth of the biotrophic-like colonies. The cessation of growth on the solid medium could have been caused by the lack of a nitrogen source in the solid medium. Biotrophic-like colonies transferred to typically fungal media such as malt extract or potato dextrose agar converted to the saprotrophic phase after 7 to 10 days of growth (Fig. 1C). Biotrophic-like colony growth in the LMCpL+ liquid medium, which contained a nitrogen source (amino acids from the yeast extract), was more vigorous and showed multiple round colonies of varying sizes (not shown). The size variation of the colonies showed no effect on the biotrophic characteristics and appeared to be derived from mycelia that had broken off the original colonies imbedded in the agar. It is interesting to note that the biotrophic-like mycelia appear to be produced only under conditions in which nutrients are limited. This seems to mimic the in vivo situation because the biotrophic hyphae do not have haustoria and grow exclusively outside the plant cell within the intercellular space (apoplast), subsisting on the limited nutrients found there. This may also explain

the low density found for the biotrophic hyphae in the green broom.

To test other carbon sources, the biotrophic-like phase of *C. pernicioso* was grown on LMCpL+ for 10 days and transferred to LMCpL medium containing different compounds (supplemented with a 2% [w/v or v/v] concentration of each of the different compounds) such as, ethanol, fructose, glucose, glycerol, sorbitol, or sucrose. The transferred mycelia transformed into the saprotrophic phase of the fungus (Fig. 1C) in all carbon sources except glycerol.

The next step was the removal of caffeine and auxin. The working hypothesis was that the maintenance of the biotrophic phase needed a plant hormone, such as auxin, which was very tempting because this could connect the physiology of both the fungus and the plant. However, no differences in the growth pattern of the mycelia were observed after removal of the hormone, clearly showing that glycerol was the fundamental compound. Nevertheless, there was a clear benefit in maintaining auxin and caffeine in the medium because the spores are normally collected along with various contaminants, such as yeasts, that are more sensitive to the caffeine and auxin concentrations used than the monokaryotic biotrophic-like hyphae. Therefore, these compounds are useful in obtaining clean cultures, but only glycerol is required to maintain the biotrophic mycelia.

Lipids have been found to be one of the signals that promote and maintain the filamentous phenotype of *Ustilago maydis*, which resembles the infectious mycelia found in planta [17]. Furthermore, Wei et al. [27] provided evidence that glycerol played a significant role in nutrient transfer from infected plants to the fungal pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*. In addition, the sucrose nonfermenting-related protein kinase from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*, which is overexpressed during penetration in planta, was found to have higher expression when the fungus was grown in glycerol [10]. Taken together, all of the evidence suggests that glycerol, and possibly lipids, could play a significant role in altering the fungal response during in planta growth. The levels of glycerol used to germinate *C. pernicioso* and maintain the biotrophic phase in vitro are comparable with those observed by Scarpari et al. [26], who found significantly higher levels of glycerol in infected green broom tissue of *T. cacao* compared with uninfected tissues. These higher levels of glycerol found in the infected tissues were completely gone in dry broom tissues, which have been shown to contain only the saprotrophic phase of *C. pernicioso* [2]. These high levels of glycerol in planta may maintain the biotrophic phase during the development of WBD.

As mentioned previously, *C. pernicioso* spores are collected with various contaminating microorganisms. Therefore, it was important to prove that the colonies with different morphology were indeed *C. pernicioso*. To do that, DNA was extracted from the saprotrophic mycelia of four different *C. pernicioso* isolates (CP02, CP09, Bp10, and FA42) and from four biotrophic-like colonies developed from spores from the isolate Bp10. In all cases, PCR produced ITS1-5.8S-ITS2 bands of similar size for all of the samples, and the DNA fragments that were generated from these bands produced exactly the same restriction pattern after being digested with the restriction enzyme *Hinf*I [1] (data not shown). Additionally, no differences in PCR banding patterns were observed between the samples for several microsatellites primers used [20, 21, 25] (data not shown). Furthermore, cDNAs derived from mRNA extracted from the biotrophic-like mycelia of *C. pernicioso* were verified by sequence analysis and matched exactly the genomic DNA sequences (unpublished data). Together, these results clearly show that the morphologically different biotrophic-like and saprotrophic colonies are indeed the same organism: *C. pernicioso*.

Epifluorescence microscopy confirmed the cytotologic nature of the colonies (Fig. 2). Biotrophic-like cultures presented mycelia lacking clamp connections (Fig. 2A) that were uninucleated (Fig. 2B), whereas mycelia with clamp connection (Figs. 2D and 2E) were binucleated (Fig. 2E) [25]. The transformation of biotrophic to saprotrophic mycelia has been previously characterized by a slight narrowing of the mycelia accompanied by the formation of clamp connections. In addition, during the period of transition, we detected highly swollen cells (Fig. 2C), which are structures previously reported by Griffith and Hedger [14].

To date, this procedure has been repeated at least 12 times during a 2-year period using four different *C. pernicioso* isolates representing the two main genotypic groups found in the State of Bahia, Brazil [25]. As mentioned previously, this is the first report of an in vitro method to prevent the direct shift of the biotrophic-like mycelia of *C. pernicioso* to the saprotrophic mycelia, thus creating conditions to maintain the biotrophic-like phase of *C. pernicioso*. Mycelia obtained with this procedure are now being used in multiple physiologic, biochemical, and genetic analyses of this developmental stage. In particular, this methodology has allowed the production of cDNA libraries that are now being sequencing as part of the *C. pernicioso* functional genome project (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>). These analyses will allow a detailed examination of the complete host-pathogen interaction involved in WBD at the molec-



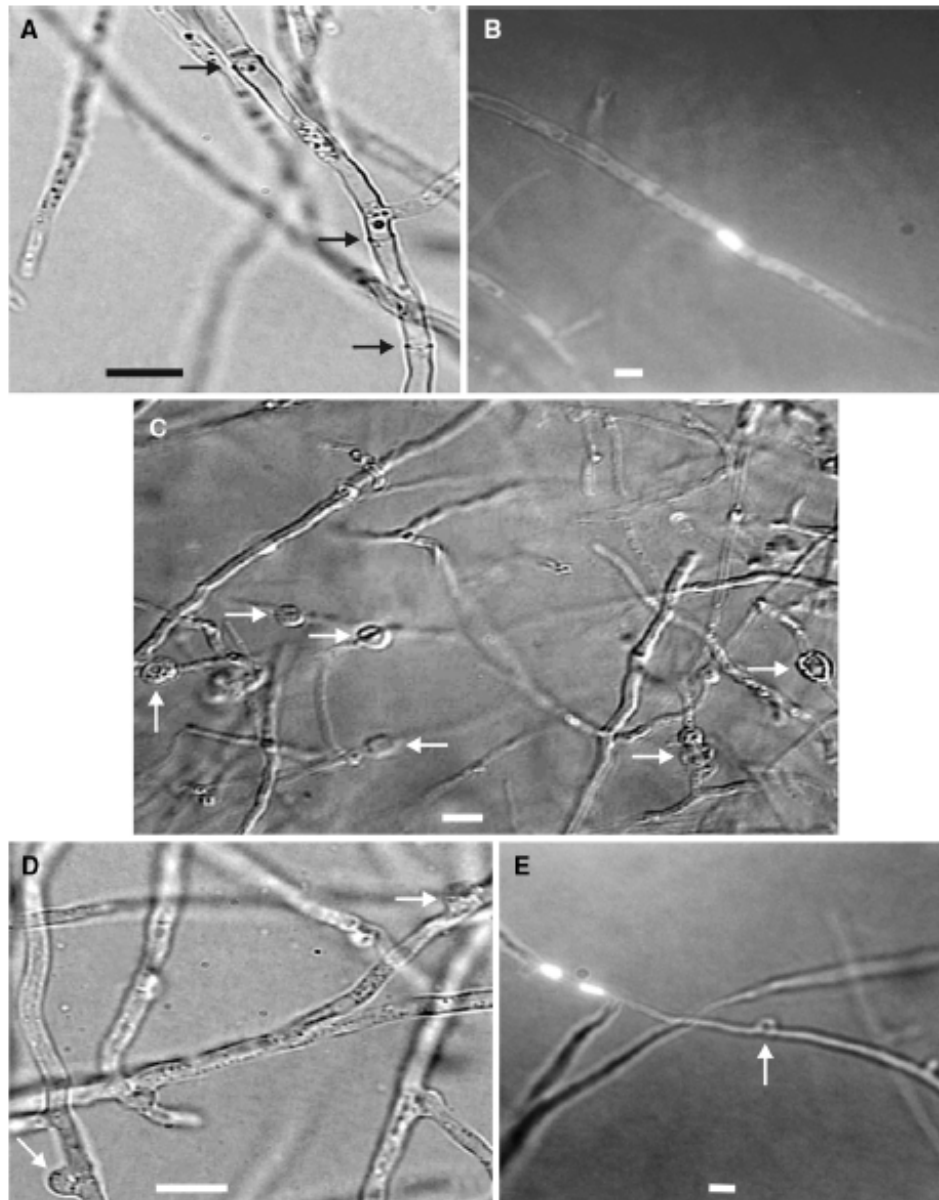


Fig. 2. (A and D) Micrographs of the biotrophic-like and saprotrophic phases of *C. pernicioso*. (A) Biotrophic-like characteristics (larger mycelia, dolipore septa, and no clamp connections). Black arrows point to septa. (D) Saprotrrophic-phase mycelia. White arrows point to clamp connections. (B and E) Nuclear condition of the different phases of *C. pernicioso*. (B) Epifluorescence micrograph of the uninucleated biotrophic-like mycelia. (E) Binucleated mycelia of the saprotrophic phase, which also has clamp connections (white arrow). (C) Highly swollen cells (white arrows) that occur during the period between biotrophic and saprotrophic phases of *C. pernicioso* growth in vitro. The micrograph was taken with Nomarski phase filters. Solid bars = 10 microns. All photos are in gray scale.

ular level and could help determine the signaling mechanisms involved in phase changes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The investigators thank the ongoing corporate support listed by Almirante Cacau Agrícola (Masterfoods) and Cargill. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(Nos. 00/10545-4 and 02/09280-1); Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (No. 68.0032/01-0; 47.1609/03-0); and Secretaria de Agricultura do Estado da Bahia.

#### Literature Cited

1. Arruda MCC, Ferreira MASV, Miller RNG, Resende MLV, Felipe MSS (2003) Nuclear and mitochondrial rDNA variability

- in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. *Mycol Res* 107:25–37
2. Calle H, Cook AA, Fernando SY (1982) Histology of witches broom caused in cacao by *Crinipellis pernicioso*. *Phytopathology* 72:1479–1481
  3. Brownlee HE, Hedger J, Scott IM (1990) Host extracts cause morphological variation in germ tubes of the cocoa pathogen, *Crinipellis pernicioso*. *Mycol Res* 94:543–547
  4. Brownlee HE, Hedger J, Scott IM (1992) Effects of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso*. *Physiol Mol Plant Pathol* 40:227–232
  5. Brownlee HE, Mœun AR, Hedger J, Scott IM (1990) Antifungal effects of cocoa tannin on the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso*. *Physiol Mol Plant Pathol* 36:39–48
  6. Delgado JC, Cook AA (1976) Nuclear condition of basidia, basidiospores and mycelia of *Marasmius pernicioso*. *Can J Bot* 54:66–72
  7. Evans HC (1980) Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' broom disease of cocoa. *T Brit Mycol Soc* 74:515–526
  8. Frias GA, Purdy LH (1991) Infection biology of *Crinipellis pernicioso* on vegetative flushes of cacao. *Plant Dis* 75:552–556
  9. Frias GA, Purdy LH (1995) An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis pernicioso*. *Plant Dis* 79:787–791
  10. Goodwin PH, Chen GYJ (2002) High expression of a sucrose non-fermenting (SNF1)-related protein kinase from *Colletotrichum gloeosporioides f. sp. malvae* is associated with penetration of *Malva pusilla*. *FEMS Microbiol Lett* 215:169–174
  11. Griffith GW (2004) Witches' brooms and frosty pods. *Biologist* 51:71–75
  12. Griffith GW, Hedger JN (1993) A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso* using a bran-vermiculite medium. *Neth J Plant Pathol* 99:227–230
  13. Griffith GW, Hedger JN (1994a) The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen, *Crinipellis pernicioso*. *Heredity* 72:278–289
  14. Griffith GW, Hedger JN (1994b) Dual culture of *Crinipellis pernicioso* and potato callus. *Eur J Plant Pathol* 100:371–379
  15. Hedger JN, Pickering V, Aragundi JA (1987) Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*). *T Br Mycol Soc* 88:533–546
  16. Kilaru A, Hasenstein KH (2005) Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis pernicioso* on interaction with cacao leaves. *Phytopathology* 95:101–107
  17. Klose J, Sá MM, Kronstad JW (2004) Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 52:823–835
  18. Mandel M, Parrish FW, Reese ET (1962) Sophorose as an inhibitor of cellulase in *Trichoderma viride*. *J Bacteriol* 83:400–408
  19. Meinhardt LW, Bellato CM, Tsai SM (2001) SYBR green I used to evaluate the nuclei number of fungal mycelia. *BioTechniques* 31:42–46
  20. Meinhardt LW, Wulff NA, Bellato CM, Tsai SM (2002a) Genetic analyses of *Rhizoctonia solani* isolates from *Phaseolus vulgaris* grown in the Atlantic rainforest region of São Paulo, Brazil. *Fitopatol Bras* 27:259–267
  21. Meinhardt LW, Wulff NA, Bellato CM, Tsai SM (2002b) Telomere and microsatellite primers reveal diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil. *Fitopatol Bras* 27: 211–215
  22. Orchard JE, Hardwick K (1988) Photosynthesis, carbohydrate translocation and metabolism of host and fungal tissues in cacao seedlings infected with *Crinipellis pernicioso*. In: 10th International Cocoa Research Conference
  23. Purdy LH, Schmidt RA (1996) Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology and management. *Ann Rev Phytopathol* 34:573–594
  24. Resende MLV, Gutemberg BAN, Silva LHCP, Niella GR, Carvalho GA, Santiago DVR, et al. (2000) *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patogênico a *T. cacao*. *Fitopatol Bras* 25:88–91
  25. Rincones J, Meinhardt LW, Vidal BC, Pereira GAG (2003) Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycol Res* 107:452–458
  26. Scarpari LM, Meinhardt LW, Pereira GAG et al. (2005) Biochemical changes during the development of witches' broom: The most important disease of coca in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *J Exp Bot* 56:865–877
  27. Wei Y, Shen W, Dauk M, Wang F, Selvaraj G, Zou J (2004) Targeted gene disruption of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Colletotrichum gloeosporioides* reveals evidence that glycerol is a significant transferred nutrient from host plant to fungal pathogen. *J Biol Chem* 276:429–435
  28. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TH (eds) PCR protocols: A guide to methods and applications. 1st ed. San Diego, CA: Academic, pp 315–322