

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



ANA CRISTINA CARIBÉ DOS SANTOS

**“SILENCIAMENTO GÊNICO POR RNAi EM  
*Moniliophthora perniciosa*”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Ana Cristina Caribé dos Santos e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microorganismos.

**Orientador: Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Júlio César de Mattos Cascardo**

Campinas, 2010

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

**Sa59s**

Santos, Ana Cristina Caribé dos  
Silenciamento gênico por RNAi em *Moniliophthora perniciosa* / Ana Cristina Caribé dos Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Michel Georges Albert Vincentz, Júlio César de Mattos Cascardo.

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

1. *Moniliophthora perniciosa*. 2. *Theobroma cacao*.  
3. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia). 4. RNAi. 5. Silenciamento gênico. I. Vincentz, Michel Georges Albert. II. Cascardo, Júlio César de Mattos. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

**Título em inglês:** Genic silencing by RNAi in *Moniliophthora perniciosa*.

**Palavras-chave em inglês:** *Moniliophthora perniciosa*; *Theobroma cacao*; Witches' broom disease; RNAi; Gene silencing.

**Área de concentração:** Genética de Microorganismos.

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

**Banca examinadora:** Michel Georges Albert Vincentz, Antonio Vargas de Oliveira Figueira, Maria Magdalena Rossi, Marcelo Menossi Teixeira, Marcelo Carnier Dornelas.

**Data da defesa:** 23/02/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

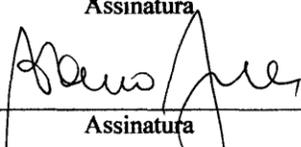
**Campinas, 23 de fevereiro de 2010**

**BANCA EXAMINADORA**

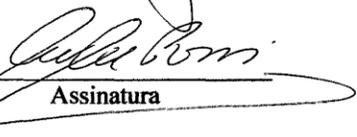
Prof. Dr. . Michel Georges Albert Vincentz.(Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Magdalena Rossi

  
Assinatura

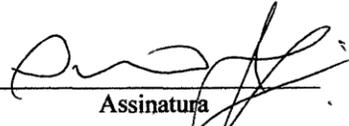
Profa. Dra. Anete Pereira de Souza.

Assinatura

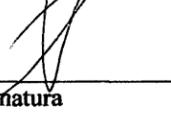
Prof. Dr. Marcelo C. Dornelas

  
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

  
Assinatura

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

  
Assinatura

Profa. Dra. Helaine Carrer

Assinatura

A meu Pai, Jorge Floriano dos Santos, *in memorium*,

A minha mãe, Judite Barreto Caribé dos Santos,

Ao meu marido e amigo Raúl Valle,

A minha filha Ana Beatriz,

Pessoas importantes na minha vida.

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela oportunidade e apoio.

Ao Programa de Qualificação Institucional (PQI) da CAPES pelo apoio financeiro.

A Universidade Estadual de Santa Cruz pela liberação das atividades acadêmicas e apoio.

Ao Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC/CEPLAC), na pessoa da Dra. Karina Gramacho pelo material biológico cedido.

Aos meus orientadores Michel Georges Albert Vincentz e Júlio César de Mattos Cascardo pela atenção e valiosa orientação durante o desenvolvimento do trabalho.

A pesquisadora Mariza Vieira de Queiroz da Universidade Federal de Viçosa e sua equipe pela orientação relativa a produção de protoplastos.

Aos pesquisadores e colegas Carlos Priminho Pirovani, Cristina Pungartnik e Stênio Santos pelas sugestões e contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

A todos os pesquisadores e colegas do Centro de Genética e Biotecnologia da UESC, especialmente a Acássia Pires e Fátima Alvim pela atenção, apoio e incentivo.

A Robson, Pelé, Joci, Dayane e Cristiano pela atenção e auxílio.

Aos estagiários de Iniciação Científica: Jailson, Livia, Felipe, Bonione e Jacilara pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Aos familiares e amigos que contribuíram com energia positiva.

A minha filha Ana Beatriz pelo incentivo, apoio e compreensão durante estes anos de doutorado.

Ao meu marido, o pesquisador Raúl Valle pelo incentivo, apoio, análises estatísticas e traduções dos artigos gerados a partir desta tese.

## RESUMO

O fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente causal da doença “vassoura-de-bruxa” (VB) do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) é responsável pela diminuição da produção de cacau no Brasil e em outras regiões da América do Sul e Central. Esse decréscimo está diretamente associado a graves problemas sociais e ambientais, particularmente nas regiões amazônica e Sul da Bahia. A interação cacau-*M. perniciosa* envolve mecanismos genéticos complexos e pouco estudados em nível molecular. Portanto, este trabalho objetivou estabelecer uma metodologia de silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) em *M. perniciosa*, visando análises funcionais de genes relacionados à sua patogenicidade. RNAi é uma eficiente ferramenta para reprimir a expressão gênica experimentalmente, portanto, uma alternativa tecnológica muito promissora. Devido ao fato de RNAi ser um mecanismo pós-transcricional que promove o silenciamento de genes com alta especificidade e de modo sistêmico é considerado uma ferramenta versátil para o estudo de fungos filamentosos heterocarióticos. O trabalho foi conduzido em três etapas integradas: 1) estabelecimento e avaliação das condições adequadas para eletroporação e regeneração de protoplastos de *M. perniciosa*, como método alternativo para a transfecção de DNA e de dsRNAs nos experimentos de transformação e de silenciamento do fungo, respectivamente; 2) produção de uma linhagem transgênica de *M. perniciosa* que expresse o gene heterólogo *gfp* e o estabelecimento da metodologia de silenciamento por RNAi, usando o gene *gfp* como modelo; 3) silenciamento mediado por dsRNAs de dois genes endógenos de *M. perniciosa*, vinculados a detoxificação de ROS e a produção de corpos de frutificação. Os parâmetros que promoveram a maior frequência de regeneração dos protoplastos eletroporados foram a aplicação de um pulso de 1.5 kV. Em relação à transformação de *M. perniciosa*, o gene repórter *gfp* foi estavelmente introduzido no genoma do fungo e posteriormente silenciado por transfecção de *gfp*dsRNA sintetizado *in vitro*, comprovando a operacionalidade do mecanismo de RNAi em *M. perniciosa*. Em adição, os genes endógenos MpPRX1 e MpHYD que codificam para peroxiredoxina e hidrofobina, respectivamente, foram silenciados, usando dsRNAs específicos e apresentaram níveis reduzidos de mRNAs que variaram de 18% a 98%

quando comparados aos controles. O silenciamento dos genes *gfp* e *MpPRX1* foi corroborado pela redução da fluorescência de GFP e da atividade da peroxidase, bem como da sobrevivência do micélio submetido a  $H_2O_2$ , respectivamente. O silenciamento de *gfp* e de *MpPRX1* persistiu por aproximadamente quatro meses, indicando silenciamento sistêmico. O estabelecimento da técnica de silenciamento gênico por RNAi em *M. pernicioso* abre novos caminhos para explorar funcionalmente o genoma deste fitopatógeno, bem como o desenvolvimento de mecanismos que bloqueiem ou diminuam a ação deste.

## ABSTRACT

The fungus *Moniliophthora perniciosa*, causal agent of cacao (*Theobroma cacao* L.) witches' broom (WB) disease, is responsible for the decrease in cacao production in Brazil and other regions of South and Central America. This decrease is directly associated to severe social and ecological problems, particularly in the Amazon and Southern Bahia regions. The cacao-*M. perniciosa* interaction involves complex genetic mechanisms little studied at the molecular level. Therefore, this study aimed to establish a methodology of gene silencing by RNA interference (RNAi) in *M. perniciosa*, aiming functional analyses of genes related to his pathogenicity. RNAi is a powerful tool to experimentally suppress or regulate gene expression, therefore, a very promising technological alternative. Because RNAi is a post-transcriptional event that promotes gene silencing with high specificity and in a systemic way, it is considered a versatile tool for the study of heterokaryotic fungi. The work was conducted in three integrated steps: 1) establishment and evaluation of appropriate conditions for electroporation and regeneration of *M. perniciosa* protoplasts, as an alternative method for transfection of transgenic DNA and dsRNAs in transformation and fungus silencing experiments, respectively; 2) production of a transgenic strain of *M. perniciosa* that expresses the heterologous gene *gfp* and the establishment of methodology for silencing by RNAi, using the *gfp* gene as a model; 3) silencing mediated by dsRNAs of two endogenous *M. perniciosa* genes linked to detoxification of ROS and the production of fruiting bodies. The parameters that promoted the highest frequency of regeneration of electroporated protoplasts were the application of one pulse of 1.5 kV. Regarding *M. perniciosa* transformation, the *gfp* reporter gene was stably inserted into the genome of the fungus and subsequently silenced by transfection of *gfp*dsRNA synthesized *in vitro*, demonstrating the operability of the RNAi mechanism in *M. perniciosa*. In addition, the endogenous genes MpPRX1 and MpHYD, coding for peroxiredoxin and hydrophobin, respectively, were silenced using specific dsRNAs showing reduced levels of mRNAs ranging from 18% to 98% when compared to controls. Silencing of *gfp* and MpPRX1 was validated by experiments that showed correlation between reduced levels of GFP fluorescence and peroxidase activity, as well as survival of mycelium subjected to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectively. The silencing

of *gfp* and Mp*PRX1* persisted for approximately four months, indicating systemic silencing. The establishment of the gene silencing technique by RNAi in *M. perniciosa* opens new paths to functionally explore the genome of this pathogen and the development of mechanisms that block or decrease his action.

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b>	vii
<b>Abstract</b>	lx
<b>Sumário</b>	xi
<b>1. Introdução</b>	1
<b>2. Revisão de literatura</b>	5
2.1. <i>Moniliophthora perniciosa</i> : Caracterização morfofisiológica e sua importância no contexto socioeconômico	5
2.2. Transformação genética em fungos	12
2.3. RNAi – Silenciamento gênico em fungos	16
2.3.1. Caracterização geral e importância do RNAi	16
2.3.2. Maquinaria Molecular do RNAi	20
2.3.3. Amplificação do silenciamento por RNAi	24
2.3.4. Vantagens associadas a RNAi	28
2.3.5. RNAi em fungos e oomicetos	28
2.3.6. Fatores que influenciam a eficiência de RNAi	31

<b>3. Genes alvos para o silenciamento por RNAi</b>	33
<b>4. Objetivos</b>	42
<b>5. Capítulo 1</b> – Artigo “Electroporation and regeneration of <i>Moniliophthora perniciosa</i> protoplasts	43
<b>6. Capítulo 2</b> – Artigo “dsRNA-induced gene silencing in <i>Moniliophthora perniciosa</i> , the causal agent of witches’ broom disease of cacao	59
<b>7. Conclusões gerais</b>	72
<b>8. Referências bibliográficas</b>	75
<b>9. Anexos</b>	94

## 1. INTRODUÇÃO

Existe uma diversidade de patógenos responsáveis por doenças que atingem plantas. O processo da interação planta-patógeno é complexo e envolve diferentes etapas como o reconhecimento genético, o processo de transdução de sinal e a ativação de genes específicos que induzem mecanismos de resistência local, que por sua vez podem produzir na planta uma resposta sistêmica.

Os fungos patogênicos empregam diversas estratégias para infectar e desenvolver doenças em plantas hospedeiras. Atualmente, essas estratégias estão sendo elucidadas utilizando técnicas de biologia molecular na análise genética da interação patógeno–hospedeiro.

O fungo *Moniliophthora perniciosa* (Aime, Phillips Mora, 2005) [Syn. *Crinipellis perniciosa* (Sthael) Singer], agente etiológico da doença “vassoura-de-bruxa” (VB) do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) foi identificado pela primeira vez na região sul da Bahia em 1989 (Pereira et al., 1989), provocando uma diminuição na produção de cacau com conseqüentes prejuízos econômicos, sociais e ambientais. Este basidiomiceto é hemibiotrófico, apresentando em seu ciclo de vida uma fase parasítica que coloniza qualquer tecido meristemático em crescimento da planta e uma fase saprofítica que culmina com a necrose generalizada e morte dos tecidos infectados. Nestes tecidos necrosados são formados os basidiomas e basidiósporos, estruturas reprodutivas, responsáveis pela disseminação e perpetuação do fungo (Evans, 1980, 1981; McGeary, Weeler, 1988).

Atualmente existe um sistema integrado de manejo da VB que visa o controle da doença. Este sistema consiste de: controle genético (plantio de genótipos

resistentes/tolerantes), controle cultural (remoção sistemática de material infectado), controle biológico (aplicação do biocontrolador *Trichoderma stromaticum*) e controle químico (aplicação de fungicidas protetores e sistêmicos) (Pereira, Valle, 2007). Estas práticas, apesar de efetivas quando aplicadas integralmente são de custo elevado, o que tem impossibilitado sua realização devido à descapitalização da maioria dos produtores. Por outro lado, o uso irracional de agentes químicos, como os fungicidas, cujo nível de especificidade em relação ao organismo patógeno nem sempre é adequado tem resultado em danos ao meio ambiente.

Apesar de nas últimas décadas ter se obtido progressos em relação ao desenvolvimento de medidas que visam o controle da VB é imprescindível a ampliação de conhecimentos da biologia do fitopatógeno e, mais especificamente, a elucidação dos mecanismos de interação planta-patógeno que fundamentem proposições de novas estratégias de controle dessa doença.

O silenciamento de genes essenciais para reprodução, desenvolvimento ou patogenicidade dos fungos é considerado uma estratégia importante para gerar conhecimentos e produtos vinculados ao controle de fitopatógenos. Dentre as metodologias utilizadas para bloquear a expressão dos genes, RNA interferente (RNAi) é uma poderosa ferramenta usada para reprimir a expressão gênica. Além disso, RNAi é considerada uma ferramenta versátil para o estudo de fungos patogênicos que freqüentemente resistem à manipulação por meio de técnicas de biologia molecular convencionais. Por exemplo, a análise genética de fungos filamentosos heterocarióticos, de modo geral é comprometida devido à necessidade do isolamento de transformantes homocarióticos, a partir de um único evento de

transformação (Vijn, Govers, 2003). As dificuldades encontradas para produzir transformantes a partir de hifas heterocarióticas podem ser contornadas utilizando a técnica de RNAi, uma vez que esse mecanismo atua sobre a degradação do mRNA, sem causar mutação no gene endógeno.

Nos últimos anos, a técnica de RNAi tem se tornado uma ferramenta alternativa, uma vez que, sua utilização evita os problemas associados aos eventos de *knockouts* de genes em geral. Por se tratar de um evento pós-transcricional que promove o silenciamento de genes com alta especificidade e de modo sistêmico, sua eficiência não é comprometida pela presença de núcleos não transformados ou de genes multicópias (Nakayashiki et al., 2005).

Recentemente foram publicados dados referentes ao seqüenciamento do genoma de *M. pernicioso* (Mondego et al., 2008). Foram identificadas e depositadas no banco de dados (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>) um grande número de sequências que precisam ser analisadas em relação às suas funções nesse organismo. Este conjunto de sequências pode estar envolvido em diversos processos biológicos, a exemplo de: manutenção do potencial de membrana da célula, síntese de enzimas, divisão celular, síntese da parede celular, metabolismo energético, sinalização celular, detoxificação de ROS (espécies reativas de oxigênio), produção do corpo de frutificação e esporulação, entre outros. A seleção destes genes como alvos para o silenciamento por RNAi é importante para o estudo funcional, devido à provável vinculação destes com processos de patogenicidade do fungo.

Inicialmente foram identificadas no banco de dados do genoma de *M. pernicioso* sequências que apresentam similaridade com genes de *N. crassa* (*qde-1*, *qde-2* e

*qde-3*) vinculados ao mecanismo de RNAi. A presença dessas sequências em *M. perniciosa* sugere que as proteínas requeridas para RNAi estão presentes e que este mecanismo de silenciamento de genes pode ser funcional neste basidiomiceto. Para testar essa hipótese foi usado como modelo experimental o gene repórter *gfp* e foram selecionados dois genes endógenos como alvos para estabelecer o procedimento do silenciamento gênico por RNAi no fungo, mediado por dsRNAs.

A seleção dos genes endógenos foi realizada com base em análises feitas no banco de dados do projeto genoma de *M. perniciosa*, bem como em estudos anteriores (Santos 2005). O primeiro gene (*MpHYD3*) integra uma família multigênica que codifica hidrofobinas. Estas proteínas participam da formação de estruturas aéreas (hifas aéreas, basidiomas e basidiósporos) que contribuem para o processo de reprodução, dispersão e sobrevivência do fungo (Wessels, 1997; Wösten, Wessels, 1997). O segundo gene selecionado, *MpPRX1* codifica uma 1-*cis* peroxiredoxina mitocondrial. Essa enzima participa do processo de detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas durante a respiração ou como resposta a vários agentes externos, protegendo as células contra o estresse oxidativo e conseqüente aceleração do envelhecimento e morte (Monteiro, Netto, 2004).

Portanto, este trabalho se reveste de importância, uma vez que o estabelecimento da técnica de silenciamento gênico por RNAi em *M. perniciosa* abre novos caminhos para explorar funcionalmente o genoma deste fitopatógeno, bem como o desenvolvimento de mecanismos que bloqueiem ou diminuam a sua ação, garantindo a integridade estrutural e funcional da planta. Isto contribuirá para eliminar

ou minimizar os graves problemas fitossanitários que comprometem a produtividade potencial do cacauero e a conservação do meio ambiente.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. *Moniliophthora perniciosa*: Caracterização morfofisiológica e sua importância no contexto socioeconômico**

O fungo *M. perniciosa* pertencente à classe Basidiomycota, ordem Agaricales, família Marasmiaceae é o agente etiológico da VB do cacauero. Em 1915 este fungo foi classificado como *Marasmius pernicius* (Stahel, 1915). Posteriormente, Singer (1942) transferiu esse fitopatógeno para o gênero *Crinipellis*, nomeando-o *Crinipellis perniciosa*. Em 2005 este basidiomiceto teve sua classificação novamente alterada, agora para *M. perniciosa*, uma vez que, Aime e Phillips-Mora (2005) demonstraram que esse fungo estava evolutivamente mais relacionado a *M. roreri*.

As espécies de *M. perniciosa* consistem de populações separadas geograficamente que infectam diferentes hospedeiros. De acordo com as características morfológicas do basidioma foram identificadas três diferentes variedades: *perniciosa*, *ecuatoriensis* e *citriniceps* (Pegler, 1978). Para a variedade *perniciosa* foram reconhecidos quatro diferentes biótipos (biótipo C, H, L, e S) com base na especificidade do hospedeiro. *Moniliophthora perniciosa* (biótipo C), objeto de nosso estudo, parasita, além do cacau, outras espécies relacionadas aos gêneros *Theobroma* e *Herrania*, a exemplo de *T. grandiflorum* (cupuaçu) e *H. albiflora*.

A vassoura-de-bruxa do cacauero tem sido alvo de muitas pesquisas, uma vez que esta doença vem diminuindo drasticamente a produção de cacau em muitos países da América do Sul, América Central e parte do Caribe. Endêmica da bacia amazônica, esta doença foi detectada pela primeira vez em 1895, no Suriname (Wheeler, Mepsted, 1988). Em 1989 foi constatada na região sul da Bahia, região responsável por 84,5% da produção brasileira de cacau, causando grande impacto econômico, social e ambiental (Pereira et al., 1989; Pereira, Valle, 2007). Recentemente a VB também foi detectada no Estado do Espírito Santo (Oliveira; Luz, 2007).

Vale destacar que, a severidade do patógeno, associada à elevada susceptibilidade das variedades de cacau cultivadas e ao clima da região cacauera da Bahia constituíram um ambiente extremamente favorável para a disseminação da doença, com reflexos acentuados não apenas na produtividade da lavoura, mas também na conservação do ecossistema Mata Atlântica. Este ecossistema tem sido mantido pelo sistema de produção de cacau em sub-bosque, conhecido localmente como *cacau-cabruca*, que propicia o sombreamento necessário a essa cultura (Lobão et al., 2007).

Por outro lado, esforços têm sido feitos pela comunidade científica no sentido de procurar soluções que modifiquem este cenário. Assim, pesquisas vêm sendo desenvolvidas pelo Centro de Pesquisa do Cacau – (CEPEC), da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC), pela Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), dentre outras instituições, visando ampliar os conhecimentos relativos à genética, fisiologia

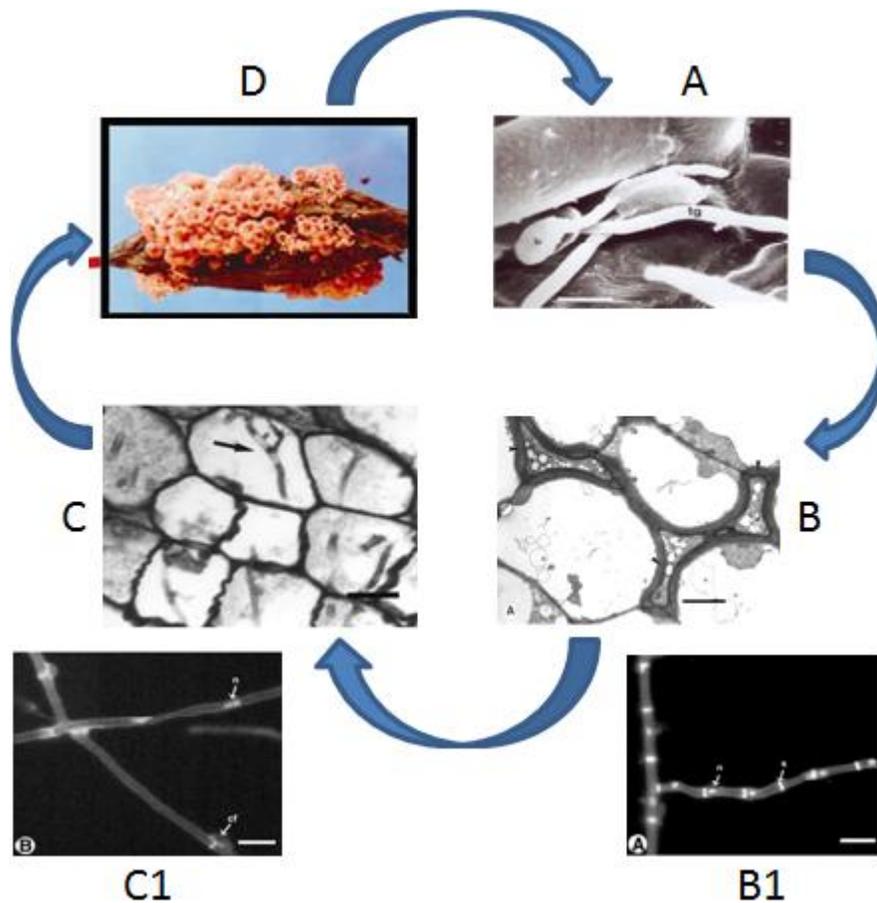
e ecologia desse fungo com o objetivo de subsidiar medidas de controle para a enfermidade.

O fungo *M. pernicioso* se reproduz por meio de basidiósporos produzidos na superfície de lamelas situadas na parte inferior do píleo ou “chapéu” dos basidiomas, em células especializadas denominadas basídias. A frutificação do fungo ocorre sob umidade relativa do ar maior que 90% e temperaturas entre 25 e 27°C, sendo necessários regimes alternados de chuva e seca (Rocha, 1983). Os basidiósporos, fontes infectivas do fungo (Bastos, 1986), têm vida curta, são sensíveis à dissecação e são liberados quando a umidade relativa do ar encontra-se entre 80 e 85% e a temperatura entre 20 e 25°C. (Rocha, Wheeler, 1985). A disseminação de basidiósporos na região sul da Bahia pode ocorrer o ano todo pelo ar e/ou água da chuva. A disseminação pela chuva depende, principalmente, da intensidade das precipitações que apresentam picos maiores nos meses de julho, agosto e setembro, e picos menores variando de época do ano e de ano para ano (Almeida, Luz, 1995).

O ciclo de vida de *M. pernicioso* tem início com a germinação dos basidiósporos e infecção de qualquer tecido meristemático da planta de cacau (Fig. 1A), incluindo extremidades de botões germinativos, flores que estão se abrindo, raiz, flores e frutos em desenvolvimento (Evans, 1980).

Por outro lado, tem sido reportado o processo de infecção a partir da penetração dos tubos germinativos de basidiósporos através dos ostíolos de estômatos (Suarez, 1977; Frias et al., 1991), bem como através de tricomas danificados (Frias et al., 1991).

Uma vez que *M. pernicioso* coloniza a planta, este fungo se comporta como hemibiótrofo, ou seja, na fase inicial da doença age como um parasita, retirando nutrientes do seu hospedeiro, sem matar as células. Em fases mais adiantadas da infecção age como saprófita, alimentando-se dos tecidos mortos do hospedeiro. Dois tipos de micélios distintos podem ser observados durante o ciclo de vida desse fungo e progressão da doença. O micélio monocariótico, encontrado em tecidos vivos infectados, é caracterizado por apresentar crescimento intercelular, hifas relativamente espessas (5-20  $\mu\text{m}$  de largura), sem grampos de conexão (Figs. 1B e B1). Já o micélio dicariótico, encontrado, geralmente em tecidos mortos e em meio de cultura é caracterizado por apresentar crescimento inter e intracelular, hifas menos espessas (1.5 – 3,0  $\mu\text{m}$  de largura) e grampos de conexão (Evans, 1980, 1981; McGearry, Weeler, 1988; Pegus, 1972; Calle et al., 1982) (Figs. 1C e C1). Na literatura, de modo geral o micélio monocariótico é associado à fase parasítica e o micélio dicariótico à fase saprófita, entretanto o momento de transição entre essas fases, bem como o mecanismo e fatores de sinalização ainda não estão bem esclarecidos.

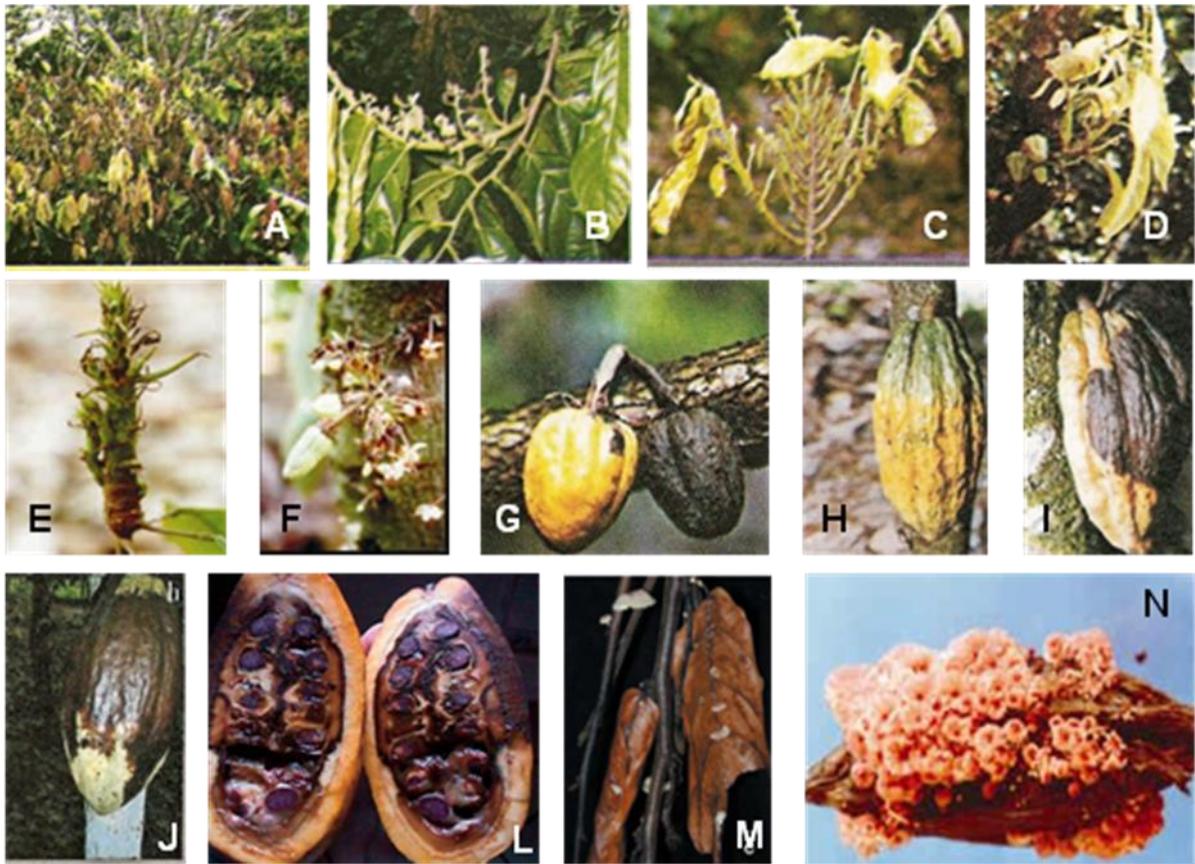


**Figura 1.** Ciclo de vida de *M. perniciosa*. A. Germinação de basidiósporos em tecidos meristemáticos do cacauzeiro. A foto ilustra a germinação de basidiósporos (b) com projeção do tubo germinativo (tg) na epiderme (e) da gema apical do cacauzeiro; B. Micélio monocariótico formado por hifas espessas com crescimento intercelular; B1. Imagens de epifluorescência mostrando um núcleo (n) por compartimento de hifa, separados por septos(s); C. Micélio dicariótico formado por hifas menos espessas, com grampo de conexão e crescimento intracelular; C1. Imagens de epifluorescência mostrando dois núcleos (n) por compartimento de hifa e a presença de grampos de conexão (cf); D. Formação de basidiomas em tecido necrosado do cacauzeiro, estruturas responsáveis pela produção de basidiósporos que após disseminação, germinarão iniciando um novo ciclo. Figuras A, B e C extraídas de Silva (1997). Figuras B1 e C1 extraídas de Kilaru e Hasenstein (2005). Figura D (CEPLAC/CEPEC/SEFIT).

O conjunto de sintomas da VB depende do cultivar, do tipo de tecido infectado e do estágio de desenvolvimento (Cronshaw, Evans, 1978). A Figura 2A mostra o aspecto geral de uma área de plantação de cacau severamente afetada pela doença.

De modo geral, na fase parasítica a doença é caracterizada por hipertrofia e hiperplasia dos tecidos infectados. Em lançamentos foliares, por exemplo, ocasiona perda da dominância apical, resultando na proliferação de gemas axilares, formando uma estrutura conhecida como *vassoura verde* (Evans, 1981. Figs. 2B e C). Almofadas florais infectadas podem produzir vassouras vegetativas (Fig. 2D) e flores anormais, que por sua vez produzem pequenos frutos partenocárpicos com formas atípicas, cenoura (Fig. 2F) e morango (Fig. 2G) (Oliveira; Luz, 2007). Os frutos ainda podem apresentar amadurecimento precoce (Fig. 2H). Esses sintomas são produzidos entre quatro a seis semanas após a inoculação.

Após um período que pode variar entre cinco a 12 semanas (Oliveira, Luz, 2007) ocorre necrose generalizada e morte dos tecidos infectados, formando uma estrutura conhecida como *vassoura seca* (Fig. 2M) correspondente a fase saprofítica. Os frutos também podem apresentar necrose parcial ou total, afetando as sementes (Fig. 2I, J e L). Os basidiomas são formados nesses tecidos necrosados (vassouras secas e frutos) após um período de dormência de quatro a 66 semanas, quando o ciclo recomeça (Figs. 1D, 2M e N).



**Figura 2.** Sintomas da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro causada por *Moniliophthora perniciosa*. A. Aspecto geral de uma área afetada pela doença; B e C. Vassoura verde em lançamento foliar; D. Vassoura vegetativa em almofada floral; E. Vassoura terminal em gema apical; F. Fruto partenocárpico (cenoura); G. Frutos partenocárpicos (morango); H. Fruto com amarelecimento precoce; I. Fruto deformado com a presença de lesão necrótica; J. Fruto quase totalmente necrosado; L. Sementes infectadas; M. Vassoura seca com desenvolvimento de basidiomas; N. Fruto necrosado com um grande número de basidiomas desenvolvidos. Figuras A, B, C, D, G, H, I, J extraídas de Lopes e Luz (2007). Figuras E, F e N (CEPLAC/CEPEC/SEFIT). Figura L extraída de Aime e Phillips-Mora (2005). Figura M extraída de Lindel et al. (2008).

## 2.2. Transformação genética em fungos

Estudos de genômica funcional em fungos filamentosos envolvem estratégias para manipulação genética que possibilitam correlacionar respostas *in vitro* com conseqüências biológicas *in vivo*. Muitas dessas estratégias dependem de um sistema de transformação bem caracterizado para o organismo de interesse e que resulte na produção de transformantes estáveis. Desta forma, importantes avanços no desenvolvimento de vários sistemas de transformação contribuíram para a ampliação do número e da variedade de fungos filamentosos viáveis para a manipulação genética.

O marco da genética molecular fúngica é representado pelo desenvolvimento de um sistema de transformação em *Saccharomyces cerevisiae* usando marcadores auxotróficos, bem como de vetores para este organismo (Beggs, 1978; Hinnen et al., 1978). Ainda na década de 1970, Case et al. (1979) desenvolveram técnicas de transformação genética para o fungo filamentoso *Neurospora crassa*, seguidos dos trabalhos com *Aspergillus nidulans* (Ballance et al., 1983; Tilburn et al., 1983; Yelton et al., 1984). A partir destes relatos, um número crescente de trabalhos sobre transformação, envolvendo diferentes fungos filamentosos, vem sendo publicados (Chakraborty et al., 1991; Ruiz-Díez, Martínez-Suárez, 1999; Sánchez, Aguirre, 1996; Riach e Kinghorn, 1996; Gomes-Barcellos et al., 1998; Hazel et al., 2000; Davidson et al., 2000; Fitzgerald et al., 2003).

A transformação é um aspecto essencial para a tecnologia do DNA recombinante e uma importante ferramenta para a caracterização genética e compreensão das vias biológicas de diversos organismos. Segundo Weld et al. (2006) existem muitas

possibilidades de combinações de sistemas de transformação e de estratégias de genômica funcional viáveis, entretanto nem todas são práticas padrões em fungos filamentosos, uma vez que, existem muitas variáveis a serem consideradas, dependendo da especificidade de cada organismo.

Atualmente existem diversos sistemas de transformação viáveis que devem ser otimizados para cada organismo, considerando a escolha do DNA transformante e a fisiologia e bioquímica do organismo alvo. Transformações bem sucedidas em fungos filamentosos têm sido alcançadas, utilizando diferentes estratégias:  $\text{CaCl}_2$ /polietilenoglicol (PEG) (Fitzgerald et al., 2003; Lopes et al., 2004; Lima et al., 2003), eletroporação (Chakraborty et al., 1991; Ruiz-Díez, Martínez-Suárez, 1999; Sánchez, Aguirre, 1996), biobalística (Riach, Kinghorn, 1996; Gomes-Barcellos et al., 1998; Hazel et al., 2000; Davidson et al., 2000) e Transformação Mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) (Fitzgerald et al., 2003; Chen et al., 2000, revisado por Michielse et al., 2005).

Em relação específica ao basidiomiceto *M. pernicioso* foi desenvolvido um sistema de transformação baseado na técnica de  $\text{CaCl}_2$ /PEG (Lima et al., 2003). Esse método de transformação se baseia no aumento da permeabilidade da membrana plasmática pela interação das cargas positivas dos polícatíons ( $\text{CaCl}_2$  e PEG) com as cargas negativas do DNA e da membrana, permitindo a passagem passiva do DNA para o interior da célula. Segundo Lima et al. (2003) a eficiência de transformação para *M. pernicioso* usando esse método foi baixa (cerca de dois transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial), detectando-se um elevado número de inserções plasmidiais. Posteriormente, Lopes et al. (2008) obtiveram um aumento da eficiência desse

sistema de transformação e uma redução das integrações plasmidiais no genoma, usando algumas enzimas de restrição na mistura de transformação, com base na técnica REMI.

Considerando que na última década, a eletroporação tem sido usada como um método alternativo de transformação para células animais, leveduras, bactérias, protoplastos de plantas e de fungos (Chakraborty et al., 1991; Riach, Kinghorn, 1996), neste trabalho foi proposto o uso dessa estratégia para a transformação de *M. pernicioso*. Essa técnica se baseia na permeabilização reversível de biomembranas induzidas por um campo elétrico de alta amplitude e curta duração. A alteração no potencial de membrana que ocorre durante um pulso elétrico permite a formação de poros transientes e conseqüente passagem de DNA exógeno. *N. crassa*, *A. oryzae* (Chakraborty et al., 1991), *Metarhizium anisopliae* (Leger et al., 1995) e *A. nidulans* (Sánchez, Aguirre, 1996) são exemplos de fungos filamentosos transformados por meio de eletroporação.

Estudos comparativos entre estratégias de transformação em fungos filamentosos têm apontado diferentes freqüências de transformação em relação a eventos de integração e estabilidade mitótica, bem como vantagens e desvantagens desses métodos (Ruiz-Diéz, 2002; Weld et al., 2006; Meyer, 2008), entretanto comparações diretas não são adequadas devido às diferentes estruturas alvos, gênero fungal e otimização do protocolo.

Um problema potencial na análise genética de fungos filamentosos é a natureza multinucleada destes organismos. A presença de múltiplos núcleos pode interferir na eficiência de métodos (como mutagênese insercional) que dependem do isolamento

de transformantes homocarióticos derivados a partir de um único evento de transformação para estudo de mutantes por perda de função (Vijn, Govers, 2003).

De modo geral, a eficiência de transformação em basidiomicetos é baixa. Este fato está vinculado à baixa regeneração de protoplastos devido, possivelmente, ao pequeno número de núcleos por compartimento hifal. Em *M. perniciososa*, por exemplo, cerca de 60% dos protoplastos produzidos são anucleados (Santos, 2001), o que implica em uma redução significativa da eficiência de regeneração.

Dentre os materiais biológicos usados como substrato no processo de transformação, os protoplastos são considerados como uma importante ferramenta. Estas células, desprovidas de parede celular, permitem manipulações, como a transferência de ácidos nucléicos através da membrana plasmática que fica exposta (Kim et al., 2000). Entretanto, algumas limitações apresentadas durante o processo de produção e de regeneração dos protoplastos influenciam na eficiência da transformação. As condições fisiológicas da cultura, a idade e a natureza do meio de cultura são os principais fatores na determinação da protoplastização, processo que requer a ação de enzimas líticas sobre a parede celular. Por outro lado, levando-se em consideração que o mecanismo de regeneração de protoplastos envolve a síntese de nova parede celular e reversão para a forma micelial (de Vries, Wessel, 1975), este processo também depende de alguns fatores, entre os quais, a espécie do fungo, o meio de regeneração e os parâmetros físicos e químicos associados com os métodos de transformação. Mesmo com os avanços relativos ao desenvolvimento de novas estratégias de transformação, quando consideramos sistemas biológicos individuais, as variáveis têm que ser otimizadas.

## **2.3. RNAi – Silenciamento gênico em fungos**

### **2.3.1. Caracterização geral e importância**

O silenciamento de genes pode ocorrer no nível transcricional – silenciamento transcricional de genes (TGS) – que envolve alterações no DNA, por exemplo, metilação do DNA (Voinnet et al., 1999; Agrawal et al., 2003), bem como no nível pós-transcricional – silenciamento pós-transcricional de genes (PTGS) – no qual transcritos são produzidos, mas são rapidamente degradados no citoplasma (Nakayashiki, 2005; Aigner, 2006; Rana, 2007).

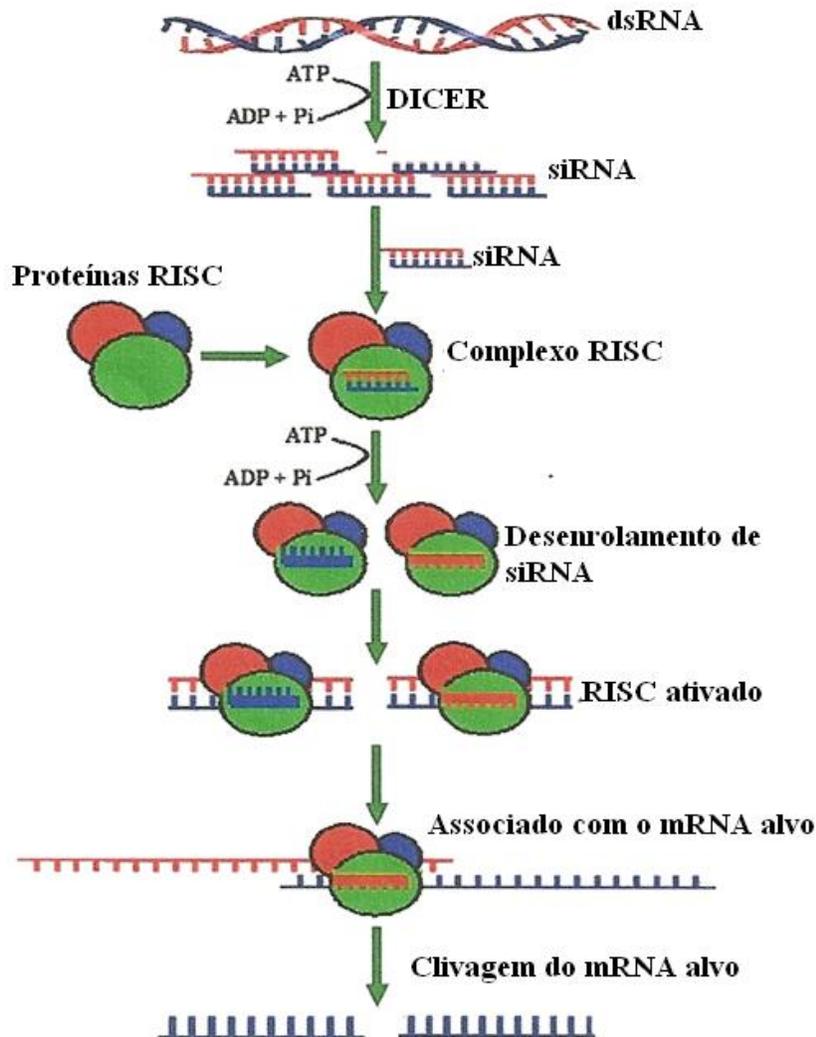
O PTGS mediado por RNAi é um mecanismo evolutivamente conservado, encontrado em uma ampla gama de organismos eucarióticos, incluindo fungos (Kadotani et al., 2003; Goldoni et al., 2004; Tanguay et al., 2006; Heneghan et al., 2007; Meyer, 2008; Eastwood et al., 2008), plantas (Vance, Vaucheret, 2001; Tenllado et al., 2004; Herr et al., 2005) e animais (Lee, Rossi, 2004; Ashrafi et al., 2003; Haley et al., 2003; Pereira et al., 2008). Este mecanismo de silenciamento protege o genoma de elementos exógenos (patógenos) e endógenos (elementos de transposição) e participa da regulação do programa celular de expressão gênica e desenvolvimento (Bernstein et al., 2001), bem como da prevenção do acúmulo de RNAs mensageiros não funcionais (Matzke et al., 2000).

A visão emergente é que o silenciamento de RNA integra uma rede sofisticada de rotas interconectadas para defesa celular, vigilância de RNA e desenvolvimento. Portanto, este mecanismo pode se tornar uma ferramenta poderosa para manipular a expressão gênica experimentalmente (Vance, Vaucheret, 2001).

O silenciamento de RNA foi observado pela primeira vez em plantas transgênicas de petúnias, contendo cópias extras do gene que codifica pigmentos “dihidroflavonol 4-redutase”. RNAs resultantes dos transgenes e dos genes endógenos homólogos foram degradados, tendo como consequência a perda do fenótipo pigmentado (Napoli et al., 1990). Esse fenômeno foi chamado de cosupressão ou PTGS.

Com base em estudos bioquímicos e genéticos foi proposto um modelo que explica o mecanismo de RNAi (revisado por Cerutti, 2003; Aigner, 2006; Weld et al., 2006; Rana, 2007). Nesse modelo (Fig. 3), o mecanismo de silenciamento é iniciado por um longo RNA dupla fita (dsRNA) produzido pelo organismo ou sintetizado *in vitro* e introduzido na célula de interesse, sendo o mesmo homólogo ao gene alvo para o silenciamento. Inicialmente o dsRNA é processado em pequenos RNAs de interferência (siRNAs) com cerca de 21-23 nucleotídeos em animais (Zamore et al., 2000) ou 25 nucleotídeos em plantas e fungos (Hamilton, Baulcombe, 1999; Catalanotto et al., 2002), por ação de uma RNase III chamada de DICER (Bernstein et al., 2001; Forrest et al., 2004; Meister, Tuschl, 2004; Kim et al., 2005). Em seguida, os siRNAs dupla fita são incorporados ao complexo multiprotéico RISC – *RNA-induced silencing complex* (Hammond et al., 2000, 2005; Maiti et al., 2007), onde são desenrolados em fitas simples. Por sua vez, os siRNAs fita simples antisense são usados como guia pelo complexo RISC para identificar por complementaridade de bases o mRNA alvo, o qual é finalmente degradado por clivagem endo e exonucleolítica (Rana, 2007). A clivagem ocorre entre os nucleotídeos 10 e 11 *upstream* da extremidade 5' da fita guia, portanto quando existe uma perfeita

complementaridade entre a cadeia guia e a cadeia alvo, próximo ao sítio de clivagem, o RNA alvo é clivado e degradado (Rana, 2007).



**Figura 3.** Mecanismo de RNAi. O processo é iniciado por um longo RNA dupla fita (dsRNA) que é processado pela enzima DICER em pequenos fragmentos (siRNAs). Os siRNAs são incorporados ao complexo enzimático RISC, que então é ativado. Os siRNAs dupla fita são desespiralizados, convertendo-se em fitas simples. O complexo RISC se liga ao mRNA, usando a fita simples do siRNA como guia para encontrar a sequência alvo. O mRNA é clivado por uma endoribonuclease e degradado por uma exoribonuclease, resultando na perda de função do gene. Figura extraída de Mahmood-ur-Rahman et al. (2008).

Vale ressaltar que estes dois complexos protéicos têm papéis centrais e atuam de forma integrada, como parte de uma rota de silenciamento perfeitamente coordenada.

Como mencionado anteriormente, o silenciamento de RNA integra uma rede complexa de rotas interconectadas, portanto, embora RNAi seja geralmente associado com siRNAs, este processo também pode ser mediado por microRNAs (miRNAs), uma classe de RNA que participa de mecanismos de regulação da expressão gênica (Bernstein et al., 2001; Bartel, 2004; Rana, 2007). Estes miRNAs têm papel importante na regulação pós-transcricional de genes vinculados a diversas funções biológicas em organismos metazoa, de nematodos a mamíferos (Bartel, 2004), em plantas (Baulcombe, 2004) e vírus (Bartel, 2004). Nesta rota de silenciamento, os miRNAs também são incorporados ao RISC, entretanto o complexo miRISC formado não apresenta uma perfeita complementaridade com a molécula alvo de RNA, se ligando a região 3'UTR do mRNA. Desta forma, o RNA alvo não é clivado, mas sua tradução é reprimida. Como consequência, o RNA mensageiro pode ser estocado ou entrar na rota de destruição celular. A depender das condições e estímulos celulares o mRNA pode retornar a rota de tradução (Rana, 2007). Outra rota de RNAi envolve o silenciamento por meio de modificações da heterocromatina e metilação do DNA pelos siRNAs, entretanto esta ainda não foi bem elucidada (revisado por Lippman, Martienssen, 2004).

### 2.3.2. Maquinaria Molecular do RNAi

A investigação genética do PTGS, particularmente em *N. crassa*, *Arabidopsis thaliana* e *Caenorhabditis elegans*, tem propiciado a identificação de muitos genes homólogos requeridos para este tipo de silenciamento. Este fato corrobora com a idéia de que a base molecular do PTGS é similar em diferentes organismos.

Alguns genes que participam do silenciamento de RNA em *N. crassa* foram identificados em outros organismos. O gene *QDE-1* (Cogoni, Macino, 1999) que codifica uma provável RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) é similar aos genes *SGS2/SDE1* de *Arabidopsis* (Dalmay et al., 2000; Mourrain et al., 2000) e ao gene *EGO-1* de *C. elegans* (Smardon et al., 2000). Esta enzima é responsável pela amplificação do silenciamento, uma vez que, gera novos dsRNAs, usando os siRNAs como *primers*, retroalimentando assim o processo. O gene *QDE-2* que codifica uma proteína contendo os domínios PAZ/PIWI está relacionado com os genes *AGO1* de *Arabidopsis* (Fagard, et al., 2000; Dalmay et al., 2001) e *RDE-1* de *C. elegans* (Tabara et al., 1999). O gene *QDE-3* codifica uma provável Rec-Q DNA helicase (Cogoni, Macino, 1999) e está relacionado ao *SDE3* de *Arabidopsis* e ao *SMG-2* de *C. elegans*.

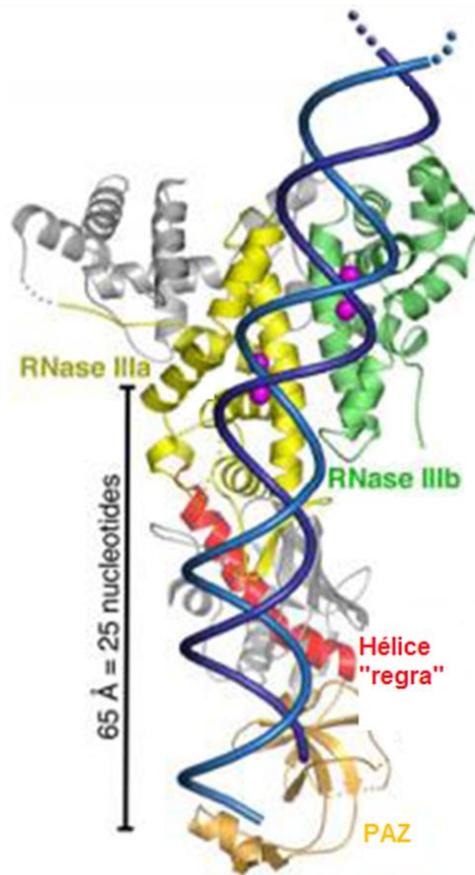
Estudos *in vitro* em *C. elegans* e em *Drosophila* identificaram duas ribonucleases envolvidas em sistema de silenciamento de RNA naqueles organismos. O gene *MUT-7* de *C. elegans* (Ketting et al., 1999) codifica uma proteína semelhante à RNase D (que exibe atividade de exonuclease), enquanto o gene *DICER* de *Drosophila* (Bernstein et al., 2001) codifica uma proteína semelhante à RNase III (que exibe atividade de endonuclease).

Dicer é evolucionariamente bem conservada nos organismos, entre os quais se encontram os fungos (*N. crassa* e *Saccharomyces pombe*), plantas (*Arabidopsis*) e animais (*C. elegans*, *Drosophila* e mamíferos). Pertence a uma família de proteínas que atua no processamento de dsRNA em siRNA. É caracterizada por conter dois domínios catalíticos (RNase III a e b) envolvidos em reações de endonuclease que resulta na clivagem de dsRNAs em siRNAs e um domínio PAZ (PIWI/Argonaute/Zwille), também encontrado na família de proteínas Argonaute, que se liga ao dsRNA para clivagem, bem como aos seus produtos (siRNAs), provavelmente, visando a orientação do processo de incorporação destes ao complexo RISC (Bass, 2000; MacRae et al. (2006); Rana, 2007). MacRae et al. (2006) apresentaram um modelo para a estrutura de DICER, a partir de estudos desta molécula no protozoário *Giardia* e propuseram que a DICER atua como uma régua molecular que cliva os dsRNAs em pequenos fragmentos, cujo tamanho depende da distância entre os domínios PAZ e RNase III (Fig. 4).

Já os genes com domínios PAZ/PIWI que pertencem à família Argonaute foram conservados durante o processo de evolução e têm papéis chaves no silenciamento. Muitos membros desta família participam do silenciamento em diferentes sistemas biológicos, sendo essenciais para diversas rotas do silenciamento mediado por RNA. Estas proteínas integram o complexo RISC e são caracterizadas por conter dois domínios, PAZ e PIWI (Liu et al., 2004; Rana, 2007).

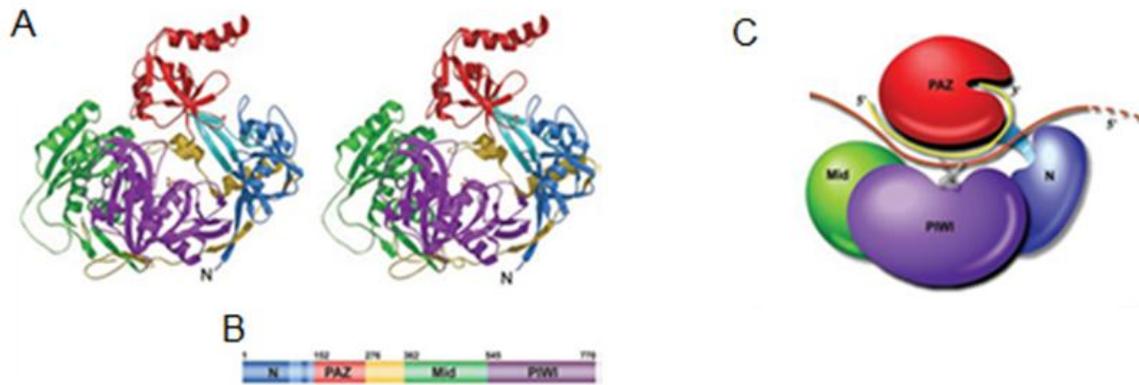
No modelo estrutural de Argonaute (Fig. 5) apresentado por Song et al. (2004), baseado em estudos desta proteína em *Pyrococcus furiosus*, os domínios N terminal, médio e PIWI compõem uma base. O domínio PAZ é mantido acima desta base por

uma região similar a uma “haste”. Análises estruturais e bioquímicas revelaram que o domínio PAZ interage diretamente com o siRNA, uma vez que contém um sulco central com resíduos aromáticos conservados que se ligam especificamente a extremidade 3' do siRNA fita simples, provavelmente, orientando o reconhecimento e clivagem do substrato (mRNA).



**Figura 4.** Visão frontal da representação em fita da Dicer mostrando o domínio PAZ, um módulo que se liga a uma extremidade do dsRNA, separado dos dois domínios catalíticos da ribonuclease III (RNase III a e b) por uma superfície plana, com carga positiva. Os 65 Å de distância entre os domínios PAZ e RNase III funcionam como uma “régua molecular” usada para medir segmentos de 25 nucleotídeos (bases) de comprimento. Um segmento de RNA de fita dupla (azul) é mostrado passando através da enzima. Figura extraída de MacRae et al. (2006).

Enquanto o domínio PIWI é similar a ribonuclease H (RNase H), com sítio ativo conservado (aspartato-aspartato-glutamato) e relacionado a sua atividade nuclease, responsável pela clivagem do mRNA alvo (Song et al., 2004).



**Figura 5.** Estrutura cristalizada da Argonaute de *P. furious*. A. Vista da representação em fita da Argonaute mostrando o domínio N-terminal (azul), a “haste” (azul claro), o domínio PAZ (vermelho), o domínio do meio (verde), o domínio PIWI (roxo) e o conector entre domínios (amarelo). B. Representação esquemática das fronteiras dos domínios. C. Modelo esquemático da clivagem de mRNA guiado por siRNA. Os domínios estão coloridos como em A. O siRNA (amarelo) se liga pela extremidade 3’ na fenda do domínio PAZ e a extremidade 5’ interage com a outra extremidade da fissura. O mRNA (marrom) entra pelo sulco de ligação pela sua extremidade 5’, entre os domínios PAZ e N-terminal e os domínios PIWI e do meio. O sítio ativo no domínio PIWI (mostrado como tesouras) cliva o mRNA. Figura extraída de Song et al. (2004).

Os princípios básicos deste mecanismo de silenciamento foram conservados em muitas espécies de fungos, contudo existem algumas exceções. Por exemplo, pesquisas relativas aos componentes da maquinaria envolvida no silenciamento por RNA realizadas no banco de dados público do genoma de fungos resultaram na identificação de RdRP, domínios PAZ/PIWI (PPD) e proteínas similares a Dicer em

vários fungos pertencentes às divisões Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota. Entretanto estas não foram identificadas em outros fungos, incluindo o ascomiceto *S. cerevisiae* e o basidiomiceto *Ustilago maydis*.

A perda desta maquinaria ao longo do processo evolutivo foi observada em fungos taxonomicamente distantes (Nakayashiki, 2005). Em basidiomicetos, pelo menos duas classes distintas de *Dicer*, três de RdRP e duas de proteínas similares a PPD foram identificadas. Em alguns casos foi verificada uma relação evolutiva entre os grupos de proteínas dos basidiomicetos e ascomicetos, entretanto o ganho de genes e uma maior diversidade de proteínas relacionadas ao silenciamento são observados nos basidiomicetos.

### **2.3.3. Amplificação do silenciamento por RNAi**

Um dos aspectos mais fascinantes do silenciamento mediado por RNAi é o fato de este ser induzido localmente e depois ser propagado para sítios distantes no organismo (Palauqui et al., 1997; Voinnet, Baulcombe, 1997; Fire et al., 1998; Winston et al., 2002). A propagação sistêmica do silenciamento está vinculada a um sinal móvel como componente integrante da rota de silenciamento por RNA (Winston et al., 2002). Considerando a especificidade do silenciamento, em princípio, o sinal móvel é um ácido nucléico, como os siRNAs e os dsRNAs. Ambos estão envolvidos com o mecanismo de silenciamento de RNA, sendo que os siRNAs além de serem suficientemente longos para prover a especificidade da seqüência são pequenos o suficiente para se mover facilmente através das células, especificamente através dos plasmodesmatas, no caso de plantas (Hamilton, Baulcombe, 1999).

Embora o estabelecimento do silenciamento sistêmico em resposta ao sinal móvel, ainda não seja bem compreendido, uma hipótese corrente é que a amplificação do sinal é imprescindível para um eficiente silenciamento sistêmico (Palauqui, Vaucheret, 1998; Voinnet et al., 1998; Rana, 2007).

Em plantas, o silenciamento de RNA é considerado um mecanismo geral de defesa antiviral, podendo ser ativado localmente e propagar-se via um sinal de silenciamento móvel célula-a-célula, até alcançar o tecido vascular e estender-se a outras partes da planta (Mlotshwa et al., 2002). Assim, se o vírus encontra o silenciamento de RNA já estabelecido em tecidos de forma sistêmica o processo de infecção será abortado (Baulcombe, 1997; Palauqui et al., 1996; Voinnet, Baulcombe, 1997).

Segundo Mlotshwa et al. (2002) o padrão de silenciamento sistêmico sugere que o sinal móvel célula-a-célula e através do floema é similar ao padrão de movimento viral através da planta. Experimentos apontaram evidências de que o sinal móvel célula-a-célula se propaga através dos plasmodesmatas em plantas (Voinnet et al., 1998).

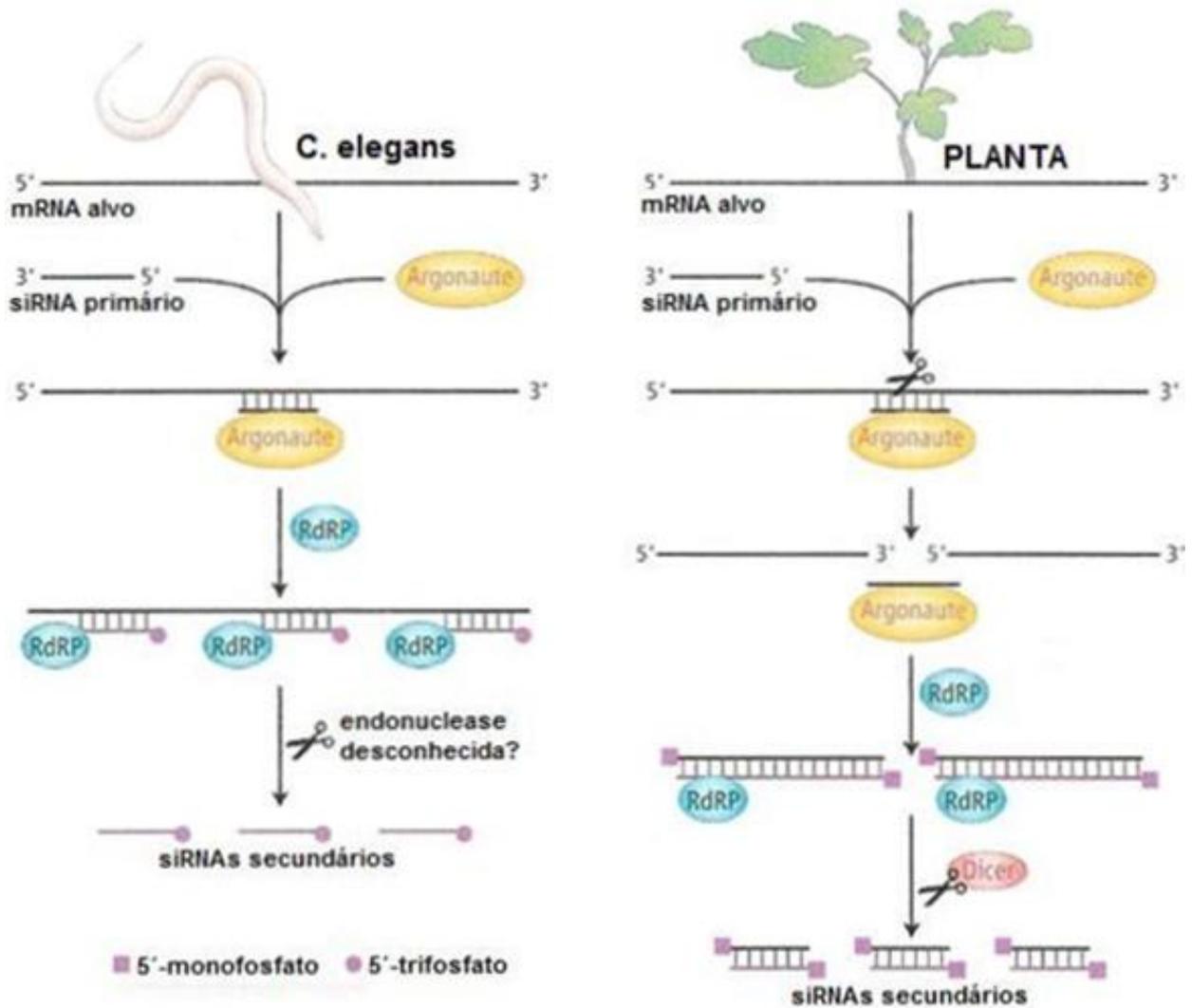
Recente trabalho demonstrou a existência de duas classes de siRNA em plantas (Hamilton et al., 2002), sendo que o siRNA longo (24 a 26 nucleotídeos) está correlacionado com o silenciamento sistêmico e com a metilação de DNA homólogo que conduz ao TGS, enquanto que o siRNA curto (21 a 22 nucleotídeos) está relacionado com a degradação de seqüências específicas de mRNA (PTGS). Zamore e colaboradores mostraram que cada classe de siRNA em plantas é produzida por diferentes enzimas do tipo Dicer (Tang et al., 2003).

Em *C. elegans* o silenciamento efetivo pode se propagar e passar para as gerações futuras (Fire et al., 1998; Melo, Conte, 2004). Neste caso é requerida especificamente uma proteína com múltiplos domínios transmembrana (Whinston et al., 2002). Esta proteína provavelmente atuaria como um receptor ou um canal transmembrana para o sinal móvel.

O aspecto sistêmico do silenciamento também ocorre em outros organismos e foi demonstrado em fungos (*Mucor circinelloides*) pela primeira por Nicolás et al. (2003). Nesse trabalho foram identificadas duas classes de siRNA antisense que se acumulam diferencialmente ao longo do crescimento vegetativo. Fazendo uma comparação com o silenciamento sistêmico em plantas o siRNA longo (25 nucleotídeos) poderia estar envolvido na propagação do silenciamento através das hifas cenocíticas do fungo, enquanto que o siRNA curto (21 nucleotídeos) estaria vinculado a degradação do mRNA alvo.

A amplificação do silenciamento por RNAi está vinculada à presença de seqüência similar ao gene *QDE-1* de *N. crassa* que codifica para a enzima RNA-polimerase dependente de RNA (RdRP). Esta enzima é responsável pela retroalimentação da produção de novos siRNAs (siRNAs secundários) por meio de diferentes rotas, a depender do organismo (Axtell et al., 2006; Sijen et al., 2001, 2007; Alder et al., 2003; Aoki et al., 2007; Baulcombe, 2007). Em *C. elegans*, por exemplo, RdRP opera diretamente na síntese de siRNAs secundários, a partir de fragmentos de mRNAs degradados que são usados como moldes (Pak, Fire, 2007; Sijen et al., 2007).

Por outro lado, em plantas a RdRP usa os fragmentos de mRNAs alvos como fonte para produzir novos dsRNAs, os quais por sua vez são clivados pela Dicer, gerando os siRNAs secundários (Fig. 6).



**Figura 6.** Mecanismo de amplificação do silenciamento por RNAi. Produção de siRNA em plantas e animais. siRNAs secundários são sintetizados pela ação da enzima RdRP, a partir de fragmentos de mRNA degradados. Figura extraída de Baulcombe (2007).

#### **2.3.4. Vantagens associadas à RNAi**

O silenciamento por RNAi é uma ferramenta da genética reversa que apresenta vantagens quando comparada aos métodos convencionais de *knockout* de genes. A principal delas é sua aplicação na regulação da expressão gênica sem alterar a estrutura do gene alvo, devido ser um mecanismo pós-transcricional que atua na degradação do mRNA. Por se tratar de um mecanismo de silenciamento locus-independente, transmitido por um sinal móvel através do citoplasma de cada célula, pode ser aplicado com sucesso, por exemplo, em fungos compostos por hifas multicelulares e multinucleadas ou que apresentam dois ou mais núcleos geneticamente diferentes em um citoplasma comum. A eficiência do RNAi não é comprometida pela presença de núcleos não transformados.

Além disso, pode promover o silenciamento simultâneo de genes homólogos, pois os alvos neste mecanismo são seqüências conservadas dentro de uma família de genes, ou seja, induz a supressão gênica em uma seqüência específica e não de maneira locus-específica, como mencionado anteriormente (Nakayashiki et al., 2005). Desta forma, uma construção de RNAi pode ser usada para silenciar uma família inteira de genes. Esta característica pode ser especialmente útil onde existe redundância de genes que poderiam mascarar o fenótipo do gene silenciado.

#### **2.3.5. RNAi em fungos e oomicetos**

Muitas pesquisas têm investigado o silenciamento por RNAi em fungos e oomicetos. No fungo modelo *N. crassa* foi demonstrado que siRNAs com 25 nucleotídeos estão

envolvidos na rota de silenciamento (Catalanotto et al., 2002). Para fungos fitopatogênicos, o primeiro relato sobre o mecanismo de RNAi foi descrito para o ascomiceto *M. oryzae*, agente causal da doença do bruzone do arroz. Esta doença causa perdas de importância econômica na produção mundial de arroz. O trabalho conduzido por Kadotani et al. (2003) apresentou uma análise detalhada do mecanismo molecular do silenciamento por RNAi em *M. oryzae*, usando a proteína fluorescente (eGFP), como modelo. Eles desenvolveram construções plasmidiais expressando RNAs em três orientações: senso-senso, antisenso-antisenso e senso-antisenso, cada uma contendo uma seqüência parcial do gene *gus* como espaçador interno. Essas construções foram introduzidas em um transformante expressando eGFP. A fluorescência de eGFP nos transformantes foi silenciada com maior eficiência pelo dsRNA (*hairpin*). Além da medida da atividade de eGFP nos transformantes silenciados foi detectada uma redução na concentração do mRNA relativo ao eGFP e um acúmulo de siRNAs de três tamanhos diferentes que variou entre 19 e 23 nucleotídeos. Os trabalhos conduzidos por Nicolás et al. (2003) demonstraram a existência de um mecanismo de silenciamento pós-transcricional no fungo filamentosso *Mucor circinelloides*, usando o gene *carB* como marcador. Esse mecanismo está associado com pequenos RNAs de interferência (siRNAs) senso e antisenso, sugerindo que os transcritos são convertidos para dsRNAs, os quais por sua vez são clivados em siRNAs.

Whisson et al. (2005) descreveram a primeira aplicação de silenciamento transiente de gene mediado por dsRNA no oomiceto *Phytophthora infestans*. Em *Schizophyllum commune* o gene *SC15*, que codifica uma proteína estrutural, foi silenciado a uma

freqüência de 80%, usando uma construção em *hairpin* (de Jong et al., 2006). Silenciamento simultâneo em cerca de quatro grupos de genes foi detectado em *M. oryzae* usando o vetor pSilent-Dual 1 (Nguyen et al., 2008). Análises por RT-qPCR detectaram que transcritos de dois genes de *Agaricus bisporus* (*URA3* e *CBX*) silenciados com construções em *hairpin* foram significativamente reduzidos (Costa et al., 2009).

Nakayashiki et al. (2005) desenvolveram um vetor versátil (pSilent-1) para fungos ascomicetos que carregam um cassete de resistência a higromicina e uma unidade transcricional para expressão de RNA *hairpin*, com múltiplos sítios de clonagem e um espaçador composto por uma seqüência intrônica. Os experimentos com este vetor demonstraram que o gene endógeno *mpg1* de *M. oryzae* foi silenciado, apresentando diferentes graus de intensidade para o silenciamento. Entre os 70 a 90% de transformantes, 10 a 15% apresentaram fenótipo quase nulo. Este vetor também foi eficiente no silenciamento do gene repórter *gfp* do fungo ascomiceto *Colletotrichum lagenarium*.

Outros trabalhos demonstraram o envolvimento de complexos protéicos no mecanismo de RNAi, como *Dicer* que foi detectado em *A. nidulans*, *M. oryzae* e *N. crassa* (Hammond et al., 2005; Kadotani et al., 2004; Catalanotto et al., 2004). A biogênese dos siRNAs foi demonstrada em *A. nidulans*, *M. oryzae*, *Mucor circinelloides* e *N. crassa* (Hammond et al., 2005; Kadotani et al., 2003; Catalanotto et al., 2002).

### 2.3.6. Fatores que influenciam a eficiência de RNAi

Vale ressaltar que para que a tecnologia do RNAi seja implementada com sucesso, a seleção apropriada da seqüência dos dsRNAs em relação à região específica do gene alvo é um fator crucial. Análises em células HeLa sugeriram que os siRNAs que mediam o silenciamento gênico podem afetar outros genes que compartilham seqüências similares com o gene alvo (Jackson et al., 2003).

Cui et al. (2004) desenvolveram o programa computacional OptiRNAi que utiliza os critérios estabelecidos por Elbashir et al. (2002) para identificar adequadamente as seqüências alvos, a partir das quais serão feitos os desenhos dos siRNAs. Esses critérios envolvem, dentre outros fatores, a exclusão de íntrons; a exclusão das regiões não traduzidas (UTRs), uma vez que elas podem se ligar a proteínas regulatórias e tornarem-se inacessíveis para os siRNAs ou para o complexo RISC; a exclusão de seqüências muito ricas em GC, devido à tendência para formar estruturas quadruplex, bem como a exclusão de seqüências ricas em AT, por estas apresentarem baixa estabilidade termal.

Outros requisitos que aumentam a eficiência do silenciamento são a escolha da seqüência alvo para a produção do dsRNA com pelo menos 500 pb separadas por uma seqüência espaçadora de cerca de 250pb (Mouyana et al., 2004), bem como a inclusão de um íntron na região espaçadora (Goldoni et al., 2004).

Com a finalidade de contribuir para a discussão e decisão em relação às estratégias mais adequadas de RNAi, Pauls e Esté (2004) apresentaram uma comparação das principais tecnologias de RNAi que têm sido utilizadas *in vivo* e *in vitro*. Entre estas pode ser citada a introdução de siRNAs sintetizados *in vitro* diretamente nas células.

Esta técnica tem sido muito utilizada em mamíferos e apresenta a vantagem de ser rápida e de ter muitos *kits* disponíveis no mercado, contudo tem um custo alto e promove um silenciamento transiente.

Outra técnica a ser destacada refere-se ao sistema baseado em DNA plasmidial que expressam siRNAs e envolve três estratégias de construção. Na primeira as cadeias senso e antisenso de siRNAs são sintetizadas separadamente; na segunda as cadeias senso e antisenso são transcritas como um pré-siRNAs, ligados por um pequeno espaçador que formará um *loop* de 19 pares de base, conhecido como pequeno RNA *hairpin* (shRNA) e, uma terceira estratégia permite codificar simultaneamente dois siRNAs contra diferentes alvos. Este sistema oferece estratégias de baixo custo e mais eficientes para criar uma linhagem de células silenciadas estáveis, que são selecionadas por gene de resistência a antibióticos co-expressados pelo mesmo plasmídeo. O problema apontado para esse sistema está relacionado a transfecção do DNA. Outros sistemas como o viral, o de peptídeos e o de bibliotecas de siRNAs são mais onerosos e tem tido uma utilização maior na terapia gênica.

Como alternativa mais econômica e eficiente para a construção de um vetor para RNAi, Chang (2004) desenvolveu uma técnica para produzir os pequenos RNAs *hairpin* (shRNAs) a partir da síntese de dois oligonucleotídeos (shRNA-F e shRNA-R) contendo seqüências complementarmente parciais de shRNA com uma região sobreposta para formação do *loop*. Este cassete é clonado em um vetor de expressão e introduzido em *Escherichia coli*. Os resultados dessa técnica apontam para uma redução dos custos, dos esforços e dos potenciais erros que acompanham

o uso de longos oligonucleotídeos (cerca de 60 pb) que codificam as seqüências de shRNA e é inserido em um vetor de expressão sob o controle de um promotor específico.

### **3. Genes alvos para o silenciamento por RNAi**

Os projetos de seqüenciamento genômico geram uma quantidade enorme de sequências que necessitam ser correlacionadas às funções biológicas. O estudo das funções dos genes, tradicionalmente tem sido realizado por meio de análises do fenótipo ou de alterações bioquímicas de organismos provocadas por mutação em um gene de interesse. Este processo é considerado muito trabalhoso e consome muito tempo. Neste sentido, RNAi, se constitui em uma ferramenta alternativa e poderosa para a genômica funcional.

O Projeto Genoma de *M. perniciosus* foi desenvolvido por um consórcio formado pela UESC, UNICAMP, CEPLAC, EMBRAPA, UEFS, UCSAL e UFBA. Nesse projeto foi realizado o seqüenciamento do genoma do fungo, como subsídio para a análise funcional, isto é, para a compreensão das funções dos genes individuais e como eles interagem entre si. Até o momento o tamanho estimado do genoma foi de 39 Mbp, com 14.072 genes preditos. Foram identificados genes que codificam proteínas envolvidas na resistência a ROS e degradação da parede celular, dentre outros. O grande número de genes codificando citocromo P450 monooxygenases (1.15% de genes modelos) indica que *M. perniciosus* tem um grande potencial para detoxificação e produção de toxinas e hormônios. Isto pode conferir uma grande capacidade adaptativa a esse fungo (Mondego et al., 2008).

A partir do banco de dados do projeto Genoma de *M. pernicioso*, do banco de dados da Biblioteca de *ESTs* do desenvolvimento de *C. pernicioso* em Sistema *in vitro* e do banco de dados na Biblioteca de *ESTs* correspondente a interação *T. cacao-C. pernicioso* foram selecionados dois genes endógenos MpPRX1 e MpHYD, como alvos para o silenciamento por RNAi, devido aos seus importantes papéis biológicos, bem como pelo fato do seu silenciamento poder ser validado fenotipicamente.

O gene MpHYD3 integra uma família multigênica caracterizada por Santos (2005). Inicialmente foram identificadas quatro seqüências de nucleotídeos, correspondentes a fragmentos de genes de hidrofobinas (Santos, 2005). Recentemente foi identificado um quinto membro nesta família (Santos, 2009. Comunicação pessoal).

As hidrofobinas são pequenas proteínas com baixo peso molecular (7 a 9 kDa) que apresentam propriedades biofísicas especiais, ou seja, são moléculas surfactantes que podem se polimerizar em uma interface ar-água ou ar-óleo, formando uma camada polimérica capaz de reverter a hidropaticidade de superfícies, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Wösten, Welssels, 1997).

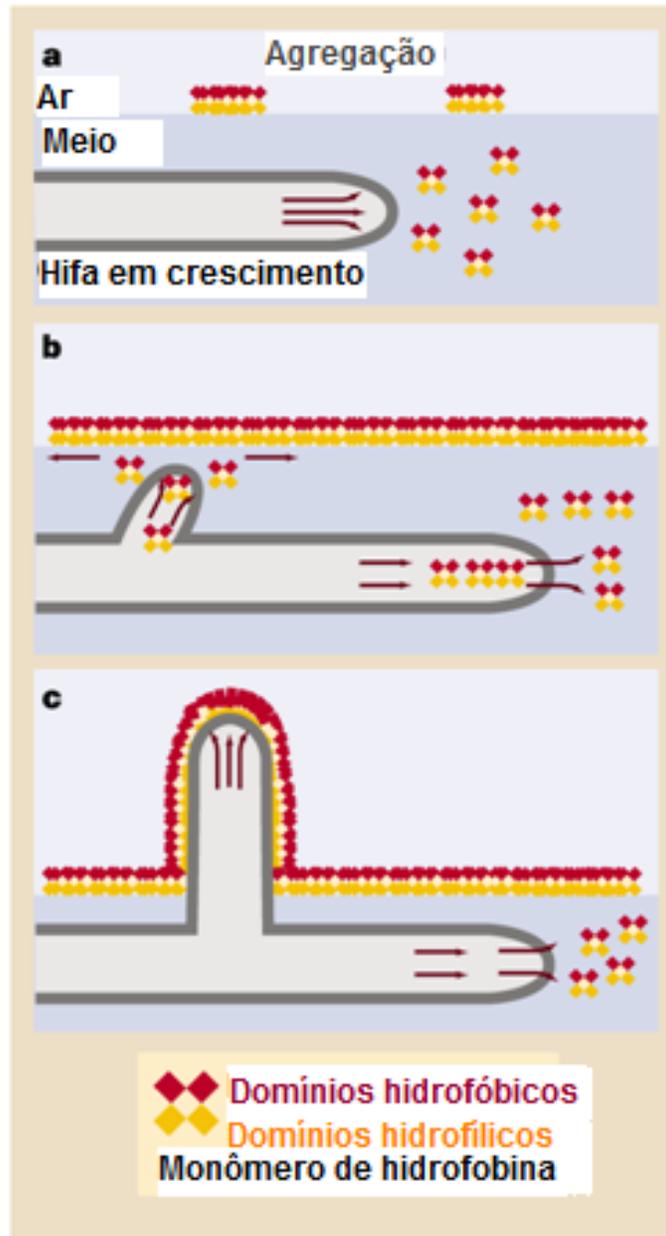
Essas proteínas são produzidas por fungos filamentosos e estão entre as proteínas de superfície mais ativas até hoje conhecidas. São transcritas em diferentes estágios da vida do fungo, por exemplo, durante a formação do corpo de frutificação, esporulação e infecção de plantas e insetos (Linder et al., 2005) e formam uma cobertura hidrofóbica que protege suas estruturas evitando a perda de água (Talbot, 1997). Durante o desenvolvimento do fungo, as hidrofobinas desempenham papéis cruciais que ajudam o fungo a se adaptar ao ambiente e sobreviver. Essas proteínas participam da formação de estruturas aéreas (hifas aéreas, basidiomas e esporos)

que propiciam a saída do fungo do meio aquoso para o ambiente hidrofóbico (ar), visando a sua preservação (Wessels, 1997; Wösten, Wessels, 1997). Propiciam a formação de canais hidrofóbicos em basidiomas que permitem trocas gasosas quando o fungo se encontra em ambiente aquoso (Lugones et al., 1999; van Wetter et al., 2000). Adicionalmente, estas contribuem para fixação das hifas do patógeno a superfície hidrofóbica do seu hospedeiro, passo imprescindível para ocorrência dos processos de penetração e de infecção (Talbot et al., 1996; van Watter et al., 2000).

As hidrofobinas são caracterizadas por possuírem oito resíduos de cisteína conservados que formam quatro pontes de dissulfeto intramoleculares e um padrão de hidropatia típico (Wösten, Wessels, 1997; Wessels, 1997). De acordo com as diferenças de hidrofobicidade, bem como das propriedades químicas, as hidrofobinas são classificadas em classe I e classe II (de Vries et al., 1993; Wessels, 1994). As membranas formadas pelas hidrofobinas da classe II são pouco estáveis, podendo ser dissociadas quando submetidas a tratamentos com dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2% ou com etanol a 60%. As membranas formadas pelas hidrofobinas da classe I, hidrofobinas identificadas em *M. pernicioso*, se caracterizam por sua alta insolubilidade e capacidade de suportar tratamentos com SDS a 2% e temperaturas de 100°C, sendo dissociada apenas pela ação do ácido fórmico ou ácido trifluoroacético (Russo et al., 1982). Estas características conferem as membranas de hidrofobina que revestem as hifas, resistência a tratamentos químicos e enzimáticos, propiciando proteção dessas estruturas contra condições adversas do meio ambiente (Wösten et al., 1993).

Por outro lado as hidrofobinas da classe I parecem ser funcionalmente relacionadas, isto é, essas podem substituir parcialmente a função uma da outra (van Wetter et al., 2000).

É interessante considerar que os fungos, para formar estruturas aéreas e interagir com as superfícies, são capazes de baixar a tensão superficial do meio aquoso e crescer em direção ao ar (Talbot, J. N., 1997). A formação de estruturas aéreas (Fig. 7) como os corpos de frutificação em fungos filamentosos foi descrita por Wösten et al. (1999) e van Wetter et al. (2000). O primeiro passo para o desenvolvimento do corpo de frutificação é a agregação de hifas aéreas por embebição em uma mucilagem que as mantém unidas. Em um segundo passo a tensão superficial do ambiente aquoso é baixada para permitir que a hifa rompa a barreira representada pela interface meio aquoso-ar. Para que esse fenômeno ocorra, monômeros de hidrofobina são secretados pelos ápices das hifas submersas. Esses monômeros possuem dois domínios hidrofóbicos e dois hidrofílicos que se polimerizam ao alcançar a superfície água-ar, formando uma membrana anfipática que quebra a tensão superficial do meio aquoso e permite que a hifa emerja envolta nessa membrana. A face interna da membrana é hidrofílica e fica voltada para a parede celular da hifa, enquanto a face externa é altamente hidrofóbica e fica em contato com o ar e com a superfície do hospedeiro, prevenindo a perda excessiva de água, assegurando assim a produção e dispersão de esporos. Em ambos os casos a interação entre as superfícies, provavelmente é estabelecida devido à atividade de lecitinas (Wösten, Vocht, 2000).



**Figura 7.** Modelo de emergência das hifas aéreas baseado nos experimentos de Wösten et al. (1999) com o fungo *S. commune*. **a.** Durante o crescimento a hifa secreta hidrofobina em abundancia. Os monômeros de hidrofobina têm dois domínios hidrofóbicos e dois domínios hidrofílicos que se agregam na interface ar-água, formando uma membrana anfipática. **b.** Isto causa uma redução na tensão superficial permitindo que a hifa cresça em direção ao ar. **c.** A hifa emerge envolta nessa membrana, sendo que a sua face hidrofílica fica em contato com a parede da hifa e a face hidrofóbica fica voltada para o ar. Figura extraída de Talbot (1999).

Relatos de silenciamento de genes que codificam para hidrofobinas em fungos filamentosos elucidaram a função dessas proteínas. O silenciamento do gene *SC3* em *S. commune*, por exemplo, demonstrou que a inibição da sua expressão afetou a formação e a fixação de hifas aéreas a superfícies hidrofóbicas (Wösten et al., 1994; van Wetter et al., 1996). Entretanto esses processos não foram completamente excluídos, uma vez que outras proteínas de superfície estão envolvidas nos mesmos. O silenciamento do gene *rodA* de *A. nidulans* produziram mutantes com esporos que foram facilmente dessecados, devido a falta da cobertura hidrofóbica (Stringer et al., 1991). Por outro lado, mutantes de *S. commune* ( $\Delta SC3$ ) tiveram a composição da parede celular modificada.

Considerando que a função das hidrofobinas está relacionada à formação de um filme anfipático que protege as estruturas aéreas do fungo, é esperado que o silenciamento dos genes *MpHYDs* em *M. perniciosus* propicie a inibição ou redução dos níveis de transcritos. Isto provocaria uma conseqüente redução ou total inibição da produção de basidiomas. Contudo, havendo formação de basidiomas, se espera que estes apresentem morfologia atípica ou ainda, que seja reduzido o percentual de formação e/ou a viabilidade dos basidiósporos formados. Esse fato pode promover a interrupção do ciclo de vida do fungo ou interferir na sua eficiência.

Em relação a *MpPRX1*, segundo gene endógeno selecionado como alvo para o silenciamento via RNAi, este codifica para a enzima mitocondrial 1-*cis* peroxiredoxina. A função desta enzima é vinculada a detoxificação de ROS (espécies reativas de oxigênio) gerados durante o processo respiratório ou como resposta a muitos agentes externos, tais como compostos químicos, radiações ionizantes e UV

e alta pressão de oxigênio (Monteiro, Netto, 2004), protegendo as células contra o estresse oxidativo que induz ao envelhecimento e morte.

O envolvimento do oxigênio nos processos metabólicos dos organismos vivos, incluindo os fungos está associado à formação e ativação de um número de compostos altamente reativos, dentre estes: radical superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^-$ ), radical peróxido ( $HO_2$ ), íon peróxido ( $HO_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nítrico (NO) (Gessler et al., 2007). Em baixas concentrações, ROS têm um papel importante na sinalização celular vinculada à iniciação da diferenciação celular (Aguirre et al., 2005). Entretanto quando presente em altas concentrações, ROS desencadeia estresse oxidativo que pode causar danos ao DNA, proteínas e membranas lipídicas (Storz et al., 1987), bem como pode induzir a proliferação celular descontrolada e a morte celular programada (Cerutti, 1985).

Por outro lado, um dos mecanismos de defesa da planta contra fitopatógenos consiste em uma resposta localizada e freqüentemente associada com uma explosão oxidativa que gera ROS (Gesteira et al., 2007), formando uma barreira tóxica contra a invasão do patógeno. Para neutralizar o sistema de defesa da planta, patógenos fúngicos, incluindo *M. perniciosus*, têm desenvolvido estratégias que limitam a formação ou inibem diretamente os efeitos gerados por ROS (Ceita et al., 2007), conduzindo ao sucesso da infecção. Desta forma, o estresse oxidativo induz a sinalização e ativação de genes envolvidos na produção de proteínas que atuam na remoção ou neutralização de ROS, tais como superóxido dismutases, catalases, peroxidases e glutathione.

As peroxiredoxinas (Prxs) integram uma família de enzimas antioxidantes que atua como peroxidases na redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos para água ou álcool correspondente, respectivamente (Gessler et al., 2007). A atividade catalítica de Prxs depende de uma cisteína peroxidática (Cp) conservada, na região N-terminal da proteína. Os resíduos circunvizinhos a Cp e o sítio catalítico parece que também foram bem conservados (Knoops et al., 2007).

Em eucariotos, diferentes isoformas de peroxiredoxinas são endereçadas para diferentes compartimentos celulares (citossol, mitocôndria, cloroplastos) e também podem estar associadas às membranas plasmática e nuclear (Gessler et al., 2007). Dentre essas, a enzima 1-*cis*-peroxiredoxina atua especificamente na mitocôndria e pertence ao subgrupo, 1-*cis*-Prx, devido a presença de um único resíduo de cisteína conservado e envolvido diretamente na catálise. A primeira etapa relativa ao mecanismo da reação peroxidase é similar para todas as peroxiredoxinas e consiste na oxidação da cisteína (*cis*-SpH) para ácido sulfênico (*cis*-SOH) com redução simultânea do substrato peróxido (Wood et al., 2003). Entretanto a segunda etapa da reação peroxidase, ou seja, a resolução do ácido sulfênico é distinta para as três classes de peroxiredoxina existentes.

Uma das principais fontes de superóxido anion na célula é a redução parcial do oxigênio, usado na mitocôndria (2 a 5%), durante o processo respiratório (Selozerkaya, Gessler, 2007). A detoxificação de ROS formado nesse processo é, provavelmente, a principal função da peroxiredoxina mitocondrial. A expressão de *PRIX1* é induzida pelo aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos, bem como pelas baixas concentrações de glicose (Monteiro, Netto, 2004). De acordo com

Belozerskaya e Gessler (2007), em leveduras, a atividade dessa peroxiredoxina é dependente do pH e aumenta sob pH ácido, o qual é detectada na ativação da respiração com redução de glicose no meio, durante a transição para a fase estacionária do crescimento da levedura.

Segundo Pedrajas et al. (2000) a sensibilidade de células de leveduras silenciadas para o gene *Prx1* em condições oxidantes demonstra a importância dessa peroxidase para proteção contra exposição a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que seu crescimento foi reduzido em relação a linhagem controle. Entretanto a função peroxidativa de Prxs provavelmente é compensada em parte, pela peroxidase glutationa e catalases (Woode et al., 2003).

Considerando que o silenciamento de *MpPRX1* pode promover uma inibição ou redução dos níveis de expressão desse gene é esperado um decréscimo da atividade da enzima 1 *cis*-peroxiredoxina, o que implicaria em maior sensibilidade de *M. perniciosus* a exposição de peróxido de hidrogênio, refletindo numa menor taxa de sobrevivência deste fungo.

Além destes dois genes endógenos, o gene heterólogo *gfp*, foi escolhido como modelo visando verificar a operacionalidade do silenciamento por RNA interferente em *M. perniciosus* e sua aplicação para o estudo funcional de genes desse basidiomiceto.

#### 4. OBJETIVOS

1. Estabelecer um sistema de eletroporação e regeneração de protoplastos de *M. perniciososa* como método alternativo para a transfecção de DNA e de dsRNAs nos experimentos de transformação e de silenciamento do fungo, respectivamente;
2. Produzir uma linhagem transgênica de *M. perniciososa* que expresse o gene heterólogo *gfp* e verificar a operacionalidade do silenciamento gênico por RNAi, usando o gene *gfp*, como modelo;
3. Estabelecer uma metodologia de silenciamento gênico por RNAi em *M. perniciososa*, a partir de genes endógenos, visando análises funcionais de genes vinculados ao desenvolvimento e patogenicidade do fungo.

**5. CAPÍTULO I. Electroporation and regeneration of *Moniliophthora perniciosa* protoplasts**

**Caribé, Ana Cristina; Gudinho, Felipe, G; Carneiro, Bonione S; Valle, RR; Cascardo, JC;. Vincentz, Michel G.**

# ELECTROPORATION AND REGENERATION OF *Moniliophthora perniciosa*

## PROTOPLASTS

Ana Cristina Caribé<sup>1</sup>, Felipe G. Gudinho<sup>2</sup>, Bonione S. Carneiro<sup>2</sup>; Valle, R.R.<sup>3</sup>;

Julio C. Cascardo<sup>4</sup>; Michel Vincentz<sup>5</sup>

<sup>1,2,3,4</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-Itabuna, Ilhéus, BA, Brasil

<sup>3</sup>Centro de Pesquisas do Cacau, CEPLAC, Ilhéus, BA, Brasil

<sup>5</sup>Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

### ABSTRACT

Protoplasts are important tools for genetic manipulation of fungi. The efficiency of mycelia regeneration from protoplasts is highly dependent on the fungus species, the regeneration medium and the physicochemical parameters of the method used. The electroporation-induced pore formation, crucial for transformation, is determined by the intensity and duration of the electric pulse. To optimize the conditions for electroporation and frequency of protoplasts regeneration of *Moniliophthora perniciosa*, protoplast suspensions were electroporated with a range of voltages and different number of pulses. Increasing the voltage and number of pulses during electroporation decreased the regenerative capacity of *M. perniciosa* protoplasts. The condition that promoted higher regeneration frequency was the application of a single 1.5 kV electric pulse.

**Key-words:** *Moniliophthora perniciosa*, witches' broom, regeneration of protoplasts, electroporation.

## INTRODUCTION

The genetic manipulation of filamentous fungi, including transformation, uses biological substrates like protoplasts, osmotically sensitive spherical cells devoided of cell wall. Several processes of fungi protoplastization have been reported (de Vries and Wessels, 1975; Yanagi; Takebe, 1983; Bok et al., 1994; Kim et al., 2000; Marchi et al., 2006). In general, protoplasts are obtained from spores or young mycelium submitted to the action of lytic enzymes in osmotically balanced medium. The mechanism of protoplast regeneration has been studied by many researchers. Peberdy (1972) and Tanaka et al. (1981) characterized its initial stage as the synthesis of new cell wall and subsequent return to the hyphal form. Furthermore, de Vries; Wessel (1975) considered the formation of new cell wall as a process of regeneration and the subsequent protrusion of the germ tube-like hyphae as reversion. This process depends, among other factors, of the fungus species, the physiological stage of the culture, the regeneration medium, and the physical and chemical parameters associated with the transformation methods.

Several protocols to obtain protoplasts from *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of cacao (*Theobroma cacao*) witches' broom disease, have been described establishing efficient and reproducible protocols for protoplasts isolation and regeneration (Thompson et al., 1986; Santos, 2001; Lima et al., 2003; Lopes et al., 2008). Successful transformation and subsequent regeneration of *M. perniciosa* protoplasts using polyethylene glycol (PEG)-mediated methods were reported by Lima et al. (2003) and Lopes et al. (2008). More recently, protoplasts were used to

prove that RNAi-mediated gene silencing is an effective approach to challenge *M. pernicioso* gene function (Caribé dos Santos et al., 2009).

Electroporation is an alternative system for direct gene delivery and has been used for many filamentous fungi, including *Neurospora crassa*, *Aspergillus oryzae* (Chakraborty et al., 1991), *Metarhizium anisopliae* (Leger et al., 1995) and *A. nidulans* (Sánchez; Aguirre, 1996). This technique is based on the reversible permeabilization of the plasma membrane induced by an electric field of high amplitude and short duration. The change in transmembrane potential promoted during the application of an electrical pulse allows the transient formation of pores (Kinosita; Tsonga, 1977; Neumann et al., 1982; Neumann et al., 1996) and consequent migration of macromolecules, like DNA fragments, loaded through these pores. These macromolecules eventually reach the nucleus and can be integrated to the genome promoting genetic transformation (Ruiz-Diez, 2002). However, depending on the intensity of the electric field applied an irreversible electroporation can be produced, with permanent rupture of membranes and subsequent cells death (Zimmermann, 1986; Langridge et al., 1987; Shillito et al., 1985). Therefore, when parameters for protoplasts electroporation of a given species are not known, it is necessary to primarily determine and optimize the intensity of the voltage and the number and duration of the pulse.

To establish the relationship between the conditions for electroporation and the frequency of *M. pernicioso* protoplasts regeneration, an evaluation of the physical parameters influencing electroporation was done. The evaluation of these parameters

supports the establishment of an efficient protocol of *M. pernicioso* protoplasts transformation by electroporation as an alternative to other transformation methods.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Fungus strains and culture conditions**

The wild type CP02 strain of *M. pernicioso* (biotype C) used in this study was isolated from cacao branches and kindly provided by Dr. Karina Gramacho (CEPLAC/CEPEC, Bahia, Brazil). The fungus was maintained in the saprophytic phase at 25°C in darkness on potato-dextrose-agar media - PDA (Acumedia ®) modified by addition of 0.15% casein hydrosylate, 0.2% yeast extract and 0.2% peptone.

### **Protoplast production**

Protoplasts of strain CP02 were obtained from mycelia grown on Potato Dextrose Grow - PDG (Acumedia ®) with agitation in darkness at 25°C for 8 d. The procedure for protoplasts production was carried out according to Lima et al. (2003). The obtained protoplasts were washed three times with sorbitol 1.0 M by centrifugation at 5000 rpm and 4°C for 10 min. After that they were resuspended in 1.0 mL sorbitol 1.0 M/PEG 6000 1% for a concentration of  $10^7$  protoplasts/mL (Fig. 1) Protoplast counting was performed in a Neubauer chamber, with the aid of an optical microscope. The calculation of the total number of protoplasts was done using the formula: Number of protoplasts/mL= average of protoplasts counted (5 fields) X total number of fields of a Neubauer-counting chamber (25) X dilution factor of the sample (1 mL) x  $10^4$ .

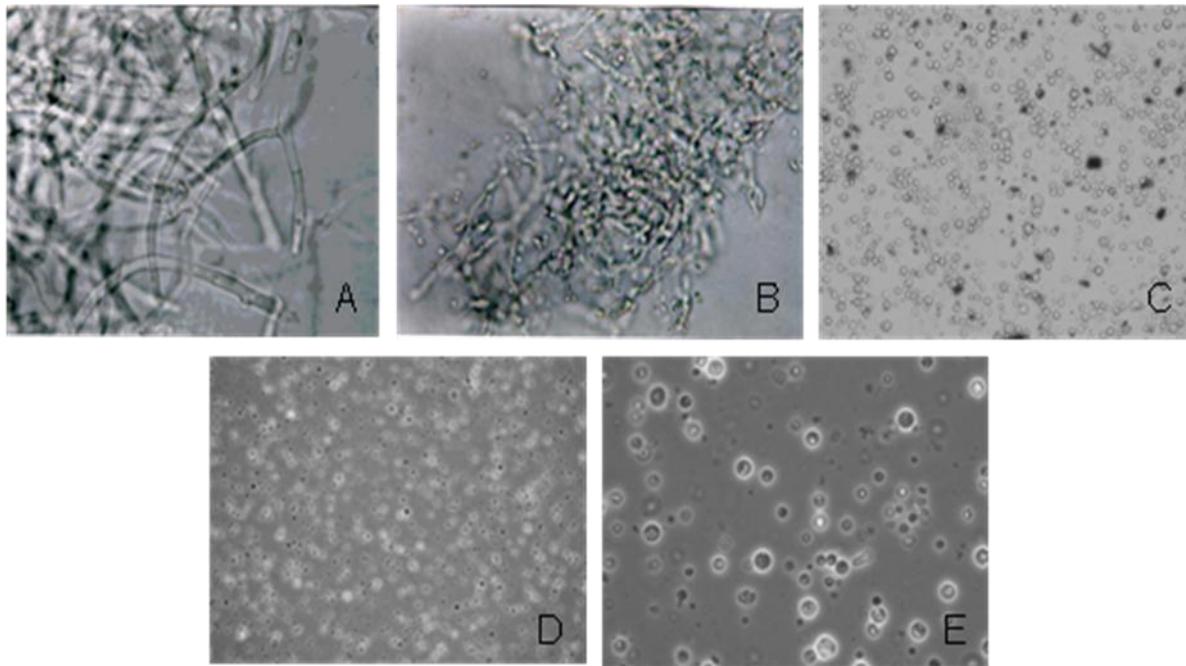


Figure 1. Protoplastization from hyphae of *M. perniciosus*. A. Intact hyphae. B. Partially digested hyphae. C. Produced protoplasts (white light) 200X. D. Protoplasts, phase contrast micrograph, 200X. E. Protoplasts, phase contrast micrograph 400X.

### **Protoplast Electroporation**

The experiment designed to evaluate the regenerative capacity of electroporated protoplasts consisted of three repetitions of nine different treatments and one control. For each treatment 400  $\mu\text{L}$  of a  $10^7$  protoplasts/mL were electroporated in 0.2 cm cuvettes using three voltages, 1.5, 2.0 and 2.5 kV/4.0 ms and varying number of pulses (1, 2 and 3) using a Bio-Rad MicroPulse Electroporator.

### **Hyphal regeneration from protoplasts**

The suspension of electroporated protoplasts was diluted in 5 mL of PDG medium with 0.5 M sucrose and after two hours of incubation an aliquot (200  $\mu\text{L}$ ) was plated in

triplicate in PDA regeneration medium with 0.5 M sucrose, and incubated in dark room BOD at 25°C for 10 d. The control experiment was done with non-electroporated protoplasts and incubated under the same treatment conditions. After 10 d of incubation the new mycelia were counted and the frequency of regeneration was calculated, using the formula: regeneration percentage=  $A/B \times 100$  where: A= number of colonies grown and B= number of protoplasts per mL. The level of significance was determined by Tukey test at 5% probability level.

In parallel to this experiment, an aliquot of protoplast suspension diluted in PDG medium with 0.5 M sucrose was incubated under the same conditions for 5 d to monitor, by optical microscope (white light and phase contrast), the regeneration process and reversal to the mycelial form.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The use of fungal protoplasts for molecular studies and transformation experiments depends on their successful regeneration to a mycelial form. On the other hand the frequency of protoplast regeneration is associated, among other factors, to the methods used for transformation. Thus to evaluate the influence of the conditions of electroporation on the frequency of regeneration of *Moniliophthora* protoplasts, suspensions of protoplasts were electroporated with a range of voltages and different number of pulses. Protoplast viability was checked based on the regeneration and consequent reversion of the protoplasts in osmotically stabilized agar medium. Additionally, it was observed by optical microscopy the pattern of regeneration of the fungus hyphae, using a diluted aliquot of protoplast suspension in PDG medium with

0.5 M sucrose and incubated by 5 d.

The pattern of hyphal regeneration of *M. pernicioso* protoplasts was similar to type 3 regeneration pattern observed in other filamentous fungi like *Pyricularia oryzae* (Tanaka et al., 1981), *Agaricus bisporus* (Maeta et al., 1990), *Trichoderma harzianum* and *T. viride* (Balasubramanian; Lalithakumari, 2008). This pattern is characterized by the protrusion of a germ-tube like hyphae directly from the single spherical protoplast cell, after synthesis of a new cell wall. This was observed in *M. pernicioso*, that is, a germ-tube emerged from a single protoplast and normal hyphal growth was restored (Fig. 2). The first mycelia forms emerged after 5 to 7 d of incubation in PDA regeneration medium with 0.5 M sucrose.

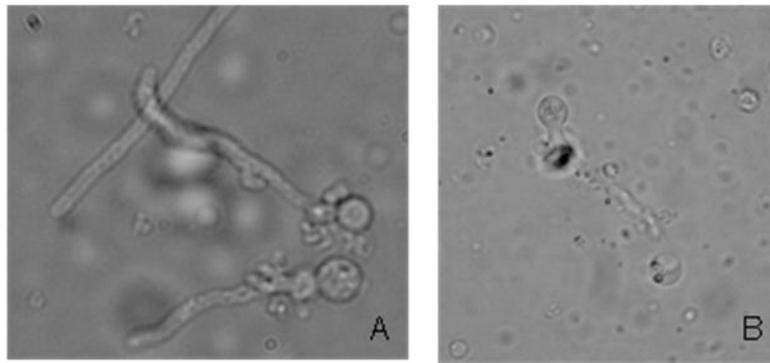


Figure 2. Reversion of *M. pernicioso* protoplasts to hyphal form. A and B a germ-tube like hypha protruded directly from the single spherical cell.

It is noteworthy to point out the difficulty to exactly determine regeneration percentages in *M. pernicioso* due to the clustering of regenerated protoplasts (Fig. 3). Similar difficulties were raised in *P. oryzae* (Tanaka et al., 1981) and in *Lentinus lepideus* (Kim et al., 2000).

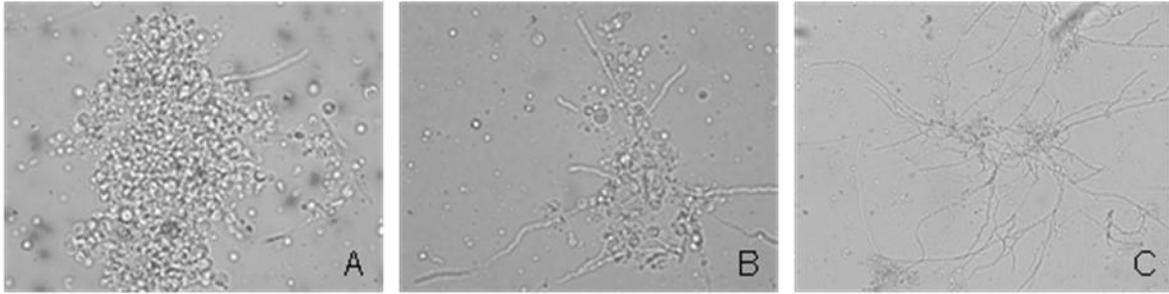


Figure 3. Clustering of the regenerated mycelium from protoplasts. A. Clustered protoplasts. B. Several aggregated protoplasts in process of regeneration contributing to the formation of mycelia. C. Development of hyphae in a more advanced stage.

Protoplast aggregation contributes to the formation of chimerical mycelium from several protoplasts in process of regeneration. This fact will probably influence the results of transformation events in *M. perniciosus*, since hyphae may be formed from transformed and untransformed protoplasts.

The frequency of regeneration varies greatly between fungal species, ranging from 0.1 to 50% (Peberdy, 1991), not reaching 100% (Aguilar, 1991). For *M. perniciosus*, Santos (2001) obtained a frequency of protoplast regeneration of 1.54%, using 1.0 M sorbitol as osmotic stabilizer. This value is consistent with the regeneration frequency of 1.04% obtained in our experiments on protoplasts used as control and incubated in medium with 1.0 M sorbitol and 1% PEG (Fig. 4A e B).

Importantly, the regeneration frequency of electroporated *M. perniciosus* protoplasts was found to be inversely proportional to voltage and number of pulses applied during electroporation (Figs. 4A e B). The increase in voltage intensity associated with increased number of pulses consistently resulted in reduction of the regenerative capacity of protoplasts. Even though, electroporation is a fast and simple technique,

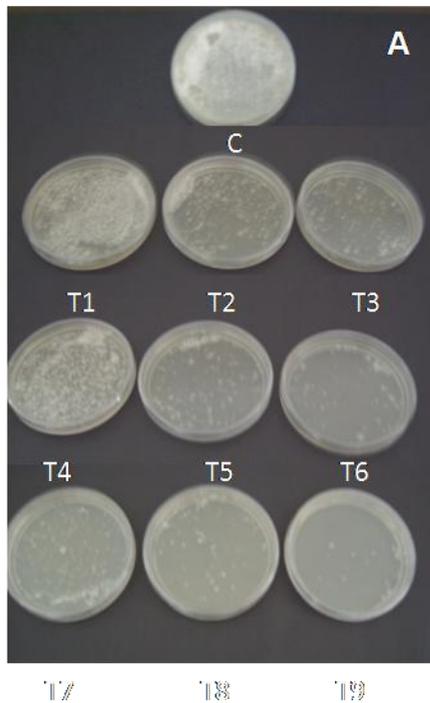
done without the addition of toxic agents to the cell, the electrical pulses can have deleterious effects on protoplast survival and subsequent regeneration.

The highest percentage of regeneration (0.71%) was obtained from protoplasts electroporated with the application of one pulse with an intensity of 1.5 kV (Fig. 4B). Among the treatments in which 2.0 and 2.5 kV were applied with one, two or three pulses, the frequency of protoplast regeneration was smaller than the regeneration obtained with one or two 1.5 kV pulses and not significantly different among them according to Turkey's test (Fig.4B).

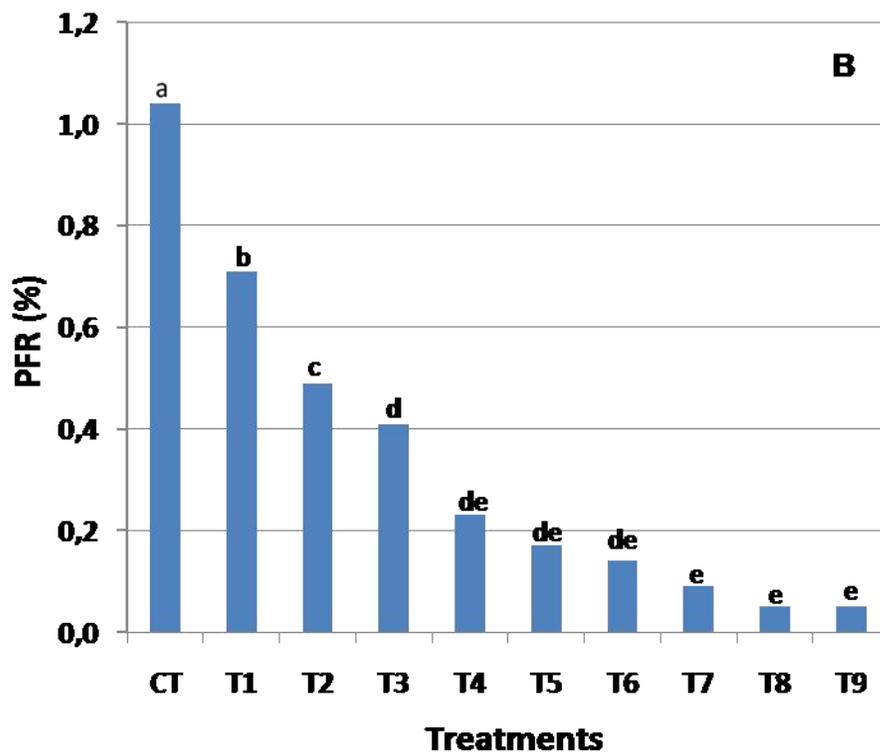
In *M. pernicioso* the decrease in the frequency of protoplast regeneration caused by the increase in voltage intensity and number of applied pulses, decreased protoplast viability. This was probably due to membrane rupture caused by the pressure resulting from the interaction between accumulated charges on the membrane surface when 2.0 or 2.5 kV pulses were applied (Zimmermann, 1986). Similar results were also obtained for the fungus *Candida albicans* (Mazurek; Lubicki, 1995) and protoplasts of *Stylosanthes guianensis* (Quecini et al., 2002) in which electric fields higher than  $250 \text{ V.cm}^{-1}$  promoted the formation of irreversible pores in the plasma membrane, causing extensive cell death and almost no transformation.

Overall, a low regeneration frequency was obtained. This limitation may be related to the fact that *M. pernicioso*, as well as basidiomycetes like *L. lepideus* (Kim et al., 2000), produce a small number of nuclei per hyphal compartment, which leads to formation of a great proportion of anucleated protoplasts (up to 58% according to Lima et al., 2003) that are unable to regenerate mycelium. The low regeneration

attributed to anucleated protoplasts was also observed in *Trichoderma* sp by Mrinalini; Lalithakumari (1998) and Tschen; Li (1994).



**Figure 4. Regeneration and reversion to mycelial form of electroporated protoplasts. A.** Mycelia from *M. perniciosa* protoplast after 10 d of incubation in PDA/sucrose 0,5M. **B.** Percentage of regeneration frequency (PFR) of *M. perniciosa* electroporated protoplasts. PFR was inversely proportional to voltage and number of applied pulses during electroporation. C= Control; T1, T2, T3= application of 1, 2 and 3 electric pulses of 1,5 kV, respectively. T4, T5, T6= application of 1, 2 and 3 electric pulses of 2,0 kV, respectively. T7, T8 and T9= application of 1, 2 and 3 electric pulses of 2.5 kV, respectively. Means followed by the same letter are not significantly different from each other according to Tukey's test ( $p=0.05$ ).



Therefore, this implies in the existence of correlation between the number of nuclei per hyphal compartment and the frequency of regenerated protoplasts. Thus, the dikaryotic nature of *M. pernicioso* hyphae provides the formation of near 60% of anucleated protoplasts, which *per se* reduces by that much the frequency of regeneration of this fungus.

Another significant factor that may affect the ability of regeneration and reversion is the source of protoplasts in the hyphal organization (Peberdy, 1979). Currently, it is well established that the deposit of fungal cell wall materials occurs more actively at the hyphal apex. Therefore, protoplasts from regions near the hyphae apex, that is, from younger parts, exhibit greater capacity for synthesis of new cell wall. Protoplasts released from the distal regions of the apex have less potential for reversion due to less ability to synthesize cell wall (Kim et al., 2000).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Dr. Karina Gramacho for kindly providing the *M. pernicioso* CPO2 strain. Research supported by Programa de Qualificação Institucional – PQI-CAPES and the UNICAMP Genetics Post-Graduation Program.

## **REFERENCES**

- Aguilar, M.B.D. 1991. Atividade celulítica e protoplastização em *Humicola* sp. e *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai*. Piracicaba. Tese, Esalq, USP, 112p.
- Balasubramanian, N., Lalithakumari, D. 2008. Characteristics of protoplast inter, intra-fusant and regeneration of antagonistic fungi *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride*. African J. Biotech. 7(18):3235-3243.

- Bok, J.W., Kim, J.P., Jin, M.R., Choi, E.C. Kim, B.K. 1994. Studies on protoplast formation and regeneration of *Lyophyllum decastes*. Korean J. Mycology 22, 130-137.
- Caribé dos Santos, A.C., Sena, J.A.L, Santos, S.C., Dias, C.V. Pirovani, C.P., Pungartnik, C., Valle, R.R., Cascardo, J.C.M., Vincentz, M. 2009. dsRNA-induced gene silencing in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. Fungal Genetics and Biology 46(11):825-836.
- Chakraborty, B.N., Patterson, N.A., Kapoor, M. 1991. An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. Can. J. Microbiol. 37, 858-863.
- de Vries, O.M.H., Wessels, J.G.H. 1975. Chemical analysis of cell wall regeneration and reversion of protoplasts from *Schizophyllum commune*. Arch. Microbiol. 102, 209.
- Kim, B.K., Kang, J.H., Jin, M., Kim, H.W., Shim, M.J., Choi, E.C. 2000. Mycelial protoplast isolation and regeneration of *Lentinus lepideus*. Life Sci. 66, 1359-1367.
- Kinosita, K., Tsong, T.Y. 1977. Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes. Biochem. Biophys. Acta 471, 27-242.
- Langridge W.H.R., Li, B.J., Szalay, A.A. 1987. Uptake of DNA and RNA into cells mediated by electroporation. Methods Enzymol. 153, 336-350.
- Leger, R.J.St., Shimizu, S., Joshi, L., Bidochka, M.J., Roberts, D.W. 1995. Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using the gene gun to produce stable GUS transformants. FEMS Microbiology Letters 131, 289-294.

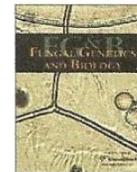
- Lima, J.O., Santos, J.K. dos, Pereira, J.F., Rezende, M.L.V. de, Araújo, E.F. de, Queiroz, M.V. de. 2003. Development of a transformation system for *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants. *Current Genetics* 1-11.
- Lopes, F.J.F., Queiroz, M.V., Lima, J.O., Silva, V.A.O., Araújo, E.F. 2008. Restriction enzyme improves the efficiency of genetic transformations in *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease in *Theobroma cacao*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 51(1):27-34.
- Maeta, Y., Nakai, Y., Komatsu, M., Sato, F., Yamada, Y. 1990. Production and regeneration of mycelial protoplasts of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Rept. Tottori Mycol. Inst.* 28, 205-214.
- Marchi, C.E., Brommonschenkel, S.H., Queiroz, M.V. de, Mizubuti, E.S.G. 2006. Obtenção e regeneração de protoplastos de *Magnaporthe grisea*. *Summa Phytopathologica* 32, 232-238.
- Mazurek, B., Lubicki, P. 1995. Effect of short HV pulses on bacteria and fungi. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* 2(3), 418-425.
- Mrinalini, .C, Lalithakumari, D. 1998. Integration of enhanced biocontrol efficacy and fungicide tolerance in *Trichoderma* spp. by electrofusion. *J. Plant Dis. Protect.* 105, 34-40.
- Neumann, E., Kakorin, S., Tsoneva, I. 1996. Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation by electroporation. *Biophys. J.* 71, 868-877.

- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, M., Hofschneider, P.H. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1, 841-845.
- Peberdy, J.F. 1972. Protoplasts from fungi. *Sci. Prog.* 60, 73-86.
- Peberdy, J.F. 1979. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.* 33:21-39.
- Peberdy, J.F., 1991. Fungal protoplasts. In: More gene manipulations in fungi. Bennett, J.W., Lasure, L.L., eds., Academic Press, California, 307-318.
- Quecini, V.M., de Oliveira, C.A., Alves, A.C., Vieira, M.L.C. 2002. Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Protoplasts. *Gen. Mol. Biol.* 25(1), 73-80
- Ruiz-Diez, B. 2002. A Review Strategies for the transformation of filamentous fungi. *J. Appl. Microbiol.* 92, 189-195.
- Sánchez, O., Aguirre, J. 1996. Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal Genetics Newsletter* 43, 48-51.
- Santos, J.K. 2001. Obtenção e regeneração de protoplastos de *Crinipellis pernicioso*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao* L.). Dissertação, UFV, 39p.
- Shillito, R.D., Saul, M.W., Paszkowski, J., Müller, M. Potrykus, I. 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio/Tech.* 3, 1099-1103.
- Tanaka, H., Ogasawara, N., Kamimiya, S. 1981. Protoplasts of *Pyricularia oryzae* P2: preparation and regeneration into hyphal form. *Agr. Biol. Chem.* 45(7), 1541-1552.

- Thompson, W., Isaac, S., Collin, H.A., Hardwick, K. 1986. Isolation of protoplasts from *Crinipellis pernicioso*, causative agent of witches' broom disease of cocoa (*Theobroma cacao* L.) *Café Cacao Thé* 30, 177-182.
- Tschen, J.S.M., Li, I.F. 1994. Optimization of formation and regeneration of protoplasts from biocontrol agents of *Trichoderma* sp. *Mycoscience* 35, 257-263.
- Yanagi, S.O., Takebe, I. 1983. An efficient method for the isolation of mycelial protoplasts from *Coprinus macrorhizus* and other basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotech.* 19(1):58-60.
- Zimmermann, U. 1986. Electrical Breakdown, electro-permeabilization and electrofusion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 5, 175-265.

**6. CAPÍTULO II. dsRNA-induced gene silencing in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao**

**A.C. Caribé dos Santos, J.A.L. Sena, S.C. Santos, C.V. Dias, C.P. Pirovani, C. Pungartnik, R.R. Valle, J.C.M. Cascardo, M. Vincentz**



## dsRNA-induced gene silencing in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao

A.C. Caribé dos Santos<sup>a</sup>, J.A.L. Sena<sup>a</sup>, S.C. Santos<sup>a</sup>, C.V. Dias<sup>a</sup>, C.P. Pirovani<sup>a</sup>, C. Pungartnik<sup>a</sup>, R.R. Valle<sup>a,b</sup>, J.C.M. Cascardo<sup>a,\*</sup>, M. Vincentz<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus – Itabuna, Km 16, CEP 45662-000 Ilhéus, BA, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Pesquisas do Cacau, CEPLAC, Rodovia Ilhéus – Itabuna, Km 22, CEP 45662-000 Ilhéus, BA, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 January 2009

Accepted 29 June 2009

Available online 12 July 2009

#### Keywords:

*Crinipellis perniciosa*

*Theobroma cacao*

RNAi

Peroxidase

GFP

Hydrophobins

### ABSTRACT

The genome sequence of the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa* revealed genes possibly participating in the RNAi machinery. Therefore, studies were performed in order to investigate the efficiency of gene silencing by dsRNA. We showed that the reporter *gfp* gene stably introduced into the fungus genome can be silenced by transfection of *in vitro* synthesized *gfp*dsRNA. In addition, successful dsRNA-induced silencing of endogenous genes coding for hydrophobins and a peroxiredoxin were also achieved. All genes showed a silencing efficiency ranging from 18% to 98% when compared to controls even 28 d after dsRNA treatment, suggesting systemic silencing. Reduction of GFP fluorescence, peroxidase activity levels and survival responses to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were consistent with the reduction of GFP and peroxidase mRNA levels, respectively. dsRNA transformation of *M. perniciosa* is shown here to efficiently promote genetic knockdown and can thus be used to assess gene function in this pathogen.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* (Aime and Phillips-Mora, 2005) [Syn. *Crinipellis perniciosa* (Sthael) Singer; Tricholomataceae], causal agent of witches' broom disease of cacao (*Theobroma cacao* L.), occurs in all cacao producing countries of South and Central America (Arévalo et al., 2007). This pathogen was the main cause for the decrease of cacao production and environmental, social and economic decline in producing regions of those countries. The fungus shows a hemibiotrophic life cycle with distinct parasitic and saprophytic phases. The parasitic phase is characterized by intercellular monokaryotic mycelia that cause hypertrophy and hyperplasia in the infected tissue. The saprophytic phase shows intercellular and intracellular dikaryotic mycelia responsible for necrosis (Evans, 1980, 1981; McGeary and Wheeler, 1988) with subsequent programmed cell death of the tissues (Ceita et al., 2007). Although several studies have already uncovered important aspect of *M. perniciosa* pathogenicity, for example, the identification of three putative genes encoding necrosis and ethylene-inducing proteins, MpNEPs (Garcia et al., 2007)

and genes involved in defense responses to pathogen infection or in programmed cell death (Gesteira et al., 2007), as well as, studies relative to chitinase regulation (Lopes et al., 2008), further efforts need to be undertaken to better understand the plant–pathogen interaction and therefore be able to design new strategies to control this disease.

Direct genetic analysis of dikaryotic filamentous fungi, such as *M. perniciosa* would not be easily implemented mainly due to the restricted access to the haploid uninucleate spores. This characteristic impairs gene replacement and insertional mutagenesis at least at this stage of life cycle and/or methods relying on isolation of homokaryotic transformants derived from single transformation events to study loss of functional mutants (Vijn and Govers, 2003). In this context, knockdown of candidate genes using reverse genetic strategies such as dsRNA-induced RNAi-mediated gene silencing represents an important alternative to get new insight into key features of the *M. perniciosa* pathogenic process. Since this mechanism acts at the mRNA level, its efficiency is not compromised by the presence of non-transformed nuclei or multicopy genes (Nakayashiki et al., 2005).

RNAi-mediated gene silencing is a mechanism that has been conserved along evolution and found in a wide range of eukaryotic organisms, including fungi (Kadotani et al., 2003; Goldoni et al., 2004; Tanguay et al., 2006; Heneghan et al. 2007; Meyer, 2008; Eastwood et al., 2008), plants (Vance and Vaucheret, 2001; Tenllado et al., 2004; Herr et al., 2005) and animals (Lee and Rossi, 2004;

\* Corresponding author. Address: Centro de Biotecnologia e Genética, Laboratório de Genômica e Proteômica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus – Itabuna, km 16, 45662-000 Ilhéus, BA, Brasil. Fax: +55 73 3680 5258.

E-mail address: [cascardo@labbi.uesc.br](mailto:cascardo@labbi.uesc.br) (J.C.M. Cascardo).

Ashrafi et al., 2003; Haley et al., 2003; Pereira et al., 2008) and is related to protecting the genome from exogenous (pathogens) and endogenous (transposons). Furthermore, RNAi participates in regulatory mechanisms of genic expression mediated by some classes of small endogenous RNAs like miRNAs (Bernstein et al., 2001; Bartel, 2004; Rana, 2007). Based on biochemical and genetic studies, a model for the RNAi mechanism was proposed (reviewed by Ceruti, 2003; Aigner, 2006; Weld et al., 2006; Rana, 2007). Briefly, the process of gene silencing is initiated by a long double-stranded RNA (dsRNA) expressed by the organism or introduced in the cell of interest or even from viral origin. The dsRNA is next cleaved into small interference RNAs (siRNAs) with around 21–23 bp in animals (Zamore et al., 2000) or 25 bp in plants and fungi (Hamilton and Baulcombe, 1999; Catalanotto et al., 2002) by a specific dsRNA endonuclease named Dicer (Bernstein et al., 2001; Forrest et al., 2004; Meister and Tuschl, 2004; Kim et al., 2005). The double-stranded siRNAs are rapidly incorporated to the multiprotein complex RISC (RNA-induced silencing complex) where the siRNAs are unwinded into single strands (Hammond et al., 2000; Maiti et al., 2007). In this manner, the antisense single strand siRNAs are used as guides by RISC to identify complementary bases of the target mRNA, which finally is degraded by endo- and exonucleolytic cleavages (Rana, 2007). Even though RNAi is predominantly characterized as a post-transcriptional process, it can participate of the transcriptional silencing pathway involving DNA methylation, histone modification, as well as meiotic gene silencing (Mette et al., 2000; Sijen et al., 2001; Volpe et al., 2002; Shiu et al., 2006).

Several studies have investigated the occurrence of the silencing mechanism by RNAi in fungi and oomycetes. In *Neurospora crassa*, Catalanotto et al. (2002) reported that siRNAs with 25 nucleotides were involved in the RNAi silencing route. Nicolás et al. (2003) demonstrated the mode of action of the RNAi-mediated gene silencing mechanism in the filamentous fungus *Mucor circinelloides* using *carB* as marker. Whisson et al. (2005) described the first application of transient gene silencing by delivering *in vitro* synthesized dsRNA into protoplasts of the oomycete *Phytophthora infestans* to trigger silencing. In *Schizophyllum commune* the *SC15* gene, which encodes a secreted structural protein, was silenced at a frequency of 80% using a hairpin construct (de Jong et al., 2006). Simultaneous silencing in at least four groups of genes was detected in *Magnaphorthe oryzae* using the RNA-silencing vector pSilent-Dual 1 (Nguyen et al., 2008). RT-qPCR analyses indicated that transcripts of two *Agaricus bisporus* genes (*URA3* and *CBX*) silenced with hairpin constructs were significantly reduced (Costa et al., 2009). In *Coprinopsis cinerea*, Costa et al. (2008) reported that the use of short hairpin constructs promoted the formation of transformants with reduced transcripts of the Green Fluorescent Protein (GFP) transgene.

In *N. crassa* RNAi-mediated gene silencing requires the following set of four genes: *qde-1* (Cogoni and Macino, 1999) that encodes a probable RNA-dependent RNA polymerase (RdRP), the Dicer gene *dcl-2*, which encodes an endonuclease that processes dsRNA into siRNAs strands (Catalanotto et al., 2004); *qde-2*, which encodes a component of RISC (Catalanotto et al., 2000) and *qde-3* that codes for a probable Rec-Q DNA helicase (Cogoni and Macino, 1999). The identification of sequences similar to these four *N. crassa* key genes in the genome of *M. perniciosa* (Mondego et al., 2008) suggests that silencing should also be functional in this fungus.

To determine if the RNAi route is indeed functional in *M. perniciosa* and could be efficiently used to silence specific genes, the transformation of dikaryotic hyphae with long dsRNA corresponding to three target genes was performed and the reduction of mRNA of the target genes was evaluated. We showed that this approach was efficient to silence a heterologous *gfp* reporter gene and two endogenous genes, *MpHYD3* and *MpPRX1*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fungus strains and culture conditions

The strain CP02, a wild type of *M. perniciosa* (biotype C), used in this study was isolated from cacao branches (CEPLAC/CEPEC, Bahia, Brazil). This strain was used for sequencing the genome of this species (Mondego et al., 2008). The fungus was maintained in the saprophytic phase at 25 °C in darkness on potato-dextrose-agar media – PDA (Acumedia®) modified by addition of 0.15% casein hydrolysate, 0.2% yeast extract and 0.2% peptone.

### 2.2. Transformation vector

The vector pHSP70-SG contains the *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*) and *gfp* reporter gene, both fused to the Heat Shock Protein (*hsp70*) promoter of *Ustilago maydis* that exhibits a strong basal activity and can be further stimulated under stress condition. For the construction of this vector, Spellig et al. (1996) used an improved version of GFP, SGFP-TYG (Sheen et al., 1995). In SGFP-TYG a Ser65 → Thr point mutation was introduced in the chromophore domain, which resulted in GFP with a single excitation and emission peak, brighter fluorescence and more rapid chromophore generation (Heim et al., 1995).

### 2.3. Protoplasts production and transformation procedure

Protoplasts of strain CP02 were obtained from mycelia grown on modified Potato Dextrose Grow – PDG (Acumedia®) with agitation in darkness at 25 °C for 8 d. The procedure of protoplasts production was carried out according to Lima et al. (2003). Transformation of *M. perniciosa* with DNA was performed by two methods. The first followed Yelton et al. (1984) and Balance and Turner (1985) procedures with some modifications. To a suspension of protoplasts ( $1 \times 10^8$  protoplasts/mL) 10 µg of plasmid pHSP70 in circular shape, 10 U of *Ssp1* restriction enzyme and 50 µL of PEG/CaCl<sub>2</sub> solution (25% PEG 6000, 50 mM CaCl<sub>2</sub>) was added, incubated on ice for 20 min, followed by addition of 500 µL of the same PEG/CaCl<sub>2</sub> solution and incubated for another 20 min at room temperature. The protoplasts were then plated on selective regeneration medium (PDA medium containing 0.5 mM sucrose, with 100 µg hygromycin B/mL) and incubated at 25 °C, in darkness. Positive and negative controls, that is, protoplast suspensions treated with PEG/CaCl<sub>2</sub> solution with and without pHSP70 were plated on regeneration medium with and without addition of 100 µg hygromycin B/mL, respectively, and incubated in similar conditions.

The second method of transformation consisted in using electroporation to promote DNA transfer into the cell. Aliquots of 400 µL protoplast suspensions ( $10^8$  protoplasts/mL) treated with 10 µg of plasmid pHSP70 in circular form and 10 U of *Ssp1* restriction enzyme were electroporated in cuvettes (0.2 cm) with the application of a 1.5 kv/4.0 ms pulse using a Micropulser Electroporator (BioRad, Hercules, CA). The parameters used in electroporation were selected from a previous set of experiments aimed at establishing a protocol for regeneration of electroporated protoplasts of *M. perniciosa* (unpublished data). The protoplasts treated with pHSP70-SG and negative control (without plasmid) were incubated in selective regeneration medium and the positive control in non-selective regeneration medium.

### 2.4. Mitotic stability

The mitotic stability of the transformants was investigated by monitoring growth on non-selective medium (PDA modified medium without hygromycin B) for 40 d. That is, cultures were

sequentially transferred to non-selective medium five times and cultured for 8 d each time. Mycelial fragments were then transferred back to selective medium to determine the expression stability of hygromycin resistance.

### 2.5. Molecular analysis of transformants

Genomic DNA of the parent strain and two randomly chosen transformants were extracted according to Melo et al. (2006). In order to confirm the presence of plasmid pHSP70 in *M. perniciosa* hyphae, a PCR analysis was performed to detect a 1025 bp amplification product of the *hph* gene using the primers *hphF* (5'-CTATTTCTTTG CCCTCGGACGAG-3') and *hphR* (5'-ATGAAAAGCCCT GA ACTCACCGC-3'). PCR amplification included 30 cycles of 1 min at 94 °C, for denaturing, 1 min at 50 °C for annealing and 1.5 min at 72 °C for extension. The reaction products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel. In addition, a PCR analysis was performed to detect a 119 bp amplification product of the *gfp* gene using the primers *gfpF* (5'ATCATGGCCGACAAGCAA3') and *gfpR* (5'GCCATCGCCAATTGGA GTAT3'). The fragment was resolved on a 12% polyacrylamide gel, and visualized with ethidium bromide under UV light.

### 2.6. Detection of GFP by fluorescence microscopy

GFP was detected in regenerating protoplasts and hyphae by fluorescence microscopy using an Epifluorescence Photomicroscope DMR2 with filter cube GFP (excitation range blue, excitation filter BP 470/440 nm, dichromatic mirror 500 nm, and suppression filter BP 525/550, Leica, Germany). Images from microscopy were recorded on the Leica image system analysis – software IM50.

### 2.7. Construction of *gfp*, *MpPRX1* and *MpHYD3* templates for dsRNA preparation

The plasmid template strategy was used to obtain *gfp* and *MpHYD3* in sense and antisense orientations both cloned to the T7 promoter seeking the synthesis of *gfp*dsRNAs and *MpHYD3*dsRNA, respectively. The *gfp* target, sequences with 717 bp were amplified by PCR from pCAMBIA 1302 vector using *gfp-NcoIF* and *gfpR* primers (Table 1) and cloned in pTZ57R/T. The target sequence

in sense and antisense orientations with a single T7 promoter assembled at opposite ends of the region to be transcribed was amplified using T7 F/*gfpR* and T7/*gfp-NcoIF* primers, respectively (Fig. 1A). On the other hand, *MpHYD3* target sequences were amplified from pDNR-LIB vector, which was utilized for construction of a library of the interaction *Moniliophthora*–Cacao, using PDNR-LIB F and PDNR-LIB R primers (Table 1). The *MpHYD3* fragment was cloned in pGEM T-easy. The amplification of the target sequence in sense and antisense orientations with a single T7 promoter placed at opposite ends of the region were amplified using T7 F and SP6 R primers (Fig. 1B).

The PCR template strategy was used to obtain *MpPRX1* sequences in sense and antisense orientations to synthesize *MpPRX1*dsRNAs. In order to do that a pair of primers *MpPRX1* forward and reverse with a 5'-T7 promoter sequence (Table 1) were designed to amplify 390bp *MpPRX1* sequences from the *Moniliophthora*–Cacao interaction library. These primers were used in a single PCR to generate transcription templates for both orientations (Fig. 1C).

### 2.8. dsRNA synthesis and transformation procedures

The dsRNAs for *gfp*, *MpPRX1* and *MpHYD3* (Fig. 1D) were produced by *in vitro* transcription at 37 °C for 4 h using a RNAi kit according to the instruction of the manufacturer (Megascript® RNAi Kit, Ambion), from sense and antisense templates generated through the two strategies mentioned above.

For *gfp*, *MpHYD3* and *MpPRX1* silencing assays up to 10 µg of specific dsRNA were used in protoplasts transformation experiments via PEG/CaCl<sub>2</sub> (Yelton et al., 1984; Balance and Turner, 1985) and electroporation using the same condition described for DNA transfer above.

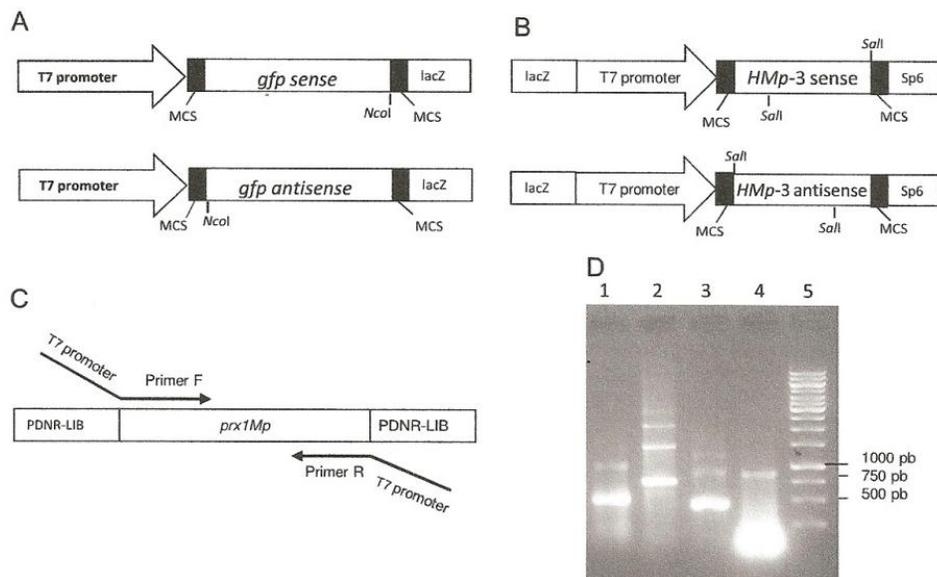
Regenerated mycelia from different plate regions submitted to transformation treatment with dsRNA were considered as individual lines in gene expression and phenotype analyses.

### 2.9. RNA extraction and cDNA synthesis

Mycelium of lines exposed to *gfp*dsRNA, *MpPRX1*dsRNA or *MpHYD3*dsRNA and their respective control lines were collected, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. Samples were macerated and total RNA was extracted using a

**Table 1**  
Oligonucleotide primer pairs and respective amplicon size used in template preparation for dsRNA synthesis, and RT-qPCR.

Gene	Primer name	Primer sequence	Application	Amplicon size (pb)
<i>gfp</i>	<i>T7/gfp-NcoIF</i>	5'TAATACGACTCACTATAGGGG3'/5'CCATGGTAGACTGACTAG3'	dsRNA synthesis	717
	<i>T7/gfpR</i>	5'TAATACGACTCACTATAGGGG3'/5'CATCCATGCCATGTGTAATCC3'		
	<i>gfpF</i>	5'ATCATGGCCGACAAGCAA3'	RT-PCR	119
	<i>gfpR</i>	5'GCCATCGCCAATTGGAGTAT3'		
hf-3	PDNR-LIBF	5'ATCAGTCGACGGTACCCGGAC3'	dsRNA synthesis	808
	PDNR-LIBR	ACAGCTATGACCATGTTAC3'		
	T7	5'TAATACGACTCACTATAGGGG3'	dsRNA synthesis	
	Sp6	5'GTAACGACGCGCCAGT3'		
	Hidro1F	5'TCATCGCCTTTGGGT3'	RT-PCR	333
	Hidro1R	5'GCACGAGTTACCAACAAG3'		
	Hidro2F	5'GCTGCAATAGCGTTCAGT3'	RT-PCR	321
	Hidro2R	5'GTGCAAGAGTTGCCCTCAAT3'		
	Hidro3F	CGATCCTGCTGCCAGTA3'	RT-PCR	336
	Hidro3R	ACGGGAACGCATCCAATCGA3'		
	Hidro4F	CGATAACGCCCAACAAG3'	RT-PCR	330
	Hidro4R	ACAGCAGACGGGTTGTGG3'		
	Hidro5F	GCAGGTGTCCTTGCCITGATA3'	RT-PCR	288
	Hidro5R	5'CTCGCAGCAAACTGGGCT3'		
	<i>prxMp1</i>	<i>T7prxMp1F</i>	5'TAATACGACTCACTATAGGGATATCCAAATACCTGGCCGACTCAT3'	dsRNA synthesis
<i>T7prxMp1R</i>		5'TAATACGAGTCACTATAGGGATATCTCATCAAGTTTCGTCCAGC3'		
Act	ActinF	5'CCATCTACACCACAATGGAGGA3'	RT-PCR	165
	ActinR	5'CCCGACATAGGAGTCCCTCT3'		



**Fig. 1.** Strategies for dsRNA synthesis. (A) Plasmid template strategy for obtaining *gfp* in sense and antisense orientations both cloned next to the T7 promoter (pTZ57R/T) aiming the synthesis of *gfp*dsRNAs. (B) Plasmid template strategy for the obtention of *Hmp3* gene in sense and antisense orientations both cloned next to the T7 promoter (pGEM T-easy) aiming the synthesis of *MpHYD3*dsRNAs. (C) PCR template – amplification strategies to add T7 promoter sequences to fragment *prx1Mp* in both orientations for the synthesis of *MpPRX1*dsRNA. T7 promoter sequences were added to DNA (*MpPRX1*) using PCR. The strategy begins by synthesizing PCR primers with the T7 promoter sequence appended to the 5' end of the primer. (D) Synthesis of dsRNAs with MEGAscript RNAi Kit transcription reaction. 1. dsRNA control from kit (500 pb), 2. *gfp*dsRNA (717 pb), 3. *MpPRX1*dsRNA (414 pb), 4. *MpHYD3*dsRNA (808 pb), 5. Marker 1 kb.

RiboPure™ Kit (Ambion®), which allows obtaining total RNA free of genomic DNA. Quantitative real-time PCR test was performed with the RNA samples to verify the absence of DNA contamination. The cDNA was synthesized from a 1.0 µg of total RNA per reaction (20 µL) using RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) and oligo(dT)<sub>18</sub> primers according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA was stored at –20 °C before use.

#### 2.10. Quantitative real-time PCR analysis

Real-time PCR (RT-qPCR) was used to quantify gene expression levels. All real-time assays were done in triplicate for all control and dsRNA-treated lines using 0.2 µM forward and reverse primers specific for each gene (Table 1) and 10 µL of each cDNA 1:50 (v/v) dilution in a final reaction volume of 20 µL. Thermo cycling was performed utilizing an ABI 7500 RT-qPCR System (Applied Biosystems). Fluorescence data were acquired during the elongation step in every cycle. After cycling, melting curves for each amplicon were determined between 80 and 85 °C.

The *actinA* gene was used to normalize the expression levels of the studied genes. For control samples, the mean relative expression level of the assayed gene was assigned a value of 1.0 and the relative expression levels for all lines were calculated relative to it. Analysis of variance and ranking by Tukey's test were performed. Mean standard errors of all lines were computed dividing the standard deviation by the square root of three (since three replications were taken).

#### 2.11. Determination of 1-cys peroxidase activity

For the determination of the peroxidase activity, six spots of individual mycelia from control and treated with *MpPRX1*dsRNA

lines were grown in 50 mL of PDG enriched medium at 25 °C and stirred in the dark for 12 d. After that, an aliquot of the culture supernatant was used in a reaction medium containing 10 mM phosphate buffer pH 6.0, 20 mM guaiacol and 0.3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The volume of the aliquot was adjusted to obtain absorbance readings at 470 nm between 0.2 and 1.0 in a reaction time of 3 min. The enzyme activity was followed through the change in absorbance (λ 470 nm, at 25 °C) of the reaction immediately after mixing, and afterward every 30 s for 3 min. The absorbance was measured with a microplate spectrophotometer Versamax (Molecular Devices Corporation, CA, USA).

The measured absorbance values (Abs) were correlated to enzyme activity through a standard curve prepared using enzymatic extract in excess and varying guaiacol concentrations in the reaction medium. This enabled the change in absorbance correlate with the amount of guaiacol converted into tetrahydroguaiacol. Therefore, peroxidase activity could be expressed in mMol guaiacol/mL of supernatant/h using the equation: activity = –0.0135 + 1.6444 × Abs ( $r^2 = 0.999$ ).

#### 2.12. *M. perniciosa* survival curve in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Broken hyphae were obtained according to Filho et al. (2006) from control mycelia and from mycelia of the four lines silenced with *MpPrx1*dsRNAs; all grown in enriched PDA media at 25 °C for 8 d. Three milliliters of the resulting broken hyphae suspension were transferred to 50 mL of liquid PDG media and incubated at 25 °C for 7 d without agitation. After this period, the sensitivity of broken hyphae to different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 1, 2 and 4 mM) was determined by applying 1.0 mL of broken hyphae suspension in three plates of PDA containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and incubated at 25 °C. After 7 d the absolute number of *pseudo-colonies* formed from the surviving broken hyphae was counted. Each of the three

plates gave rise to a number of pseudo-colonies/mL of suspension. Control plates without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yielded *M. perniciosa* pseudo-colonies for determination of 100% survival rate. Results are expressed as the percentage of survival related to the untreated control and represent the mean of at least three independent experiments. Bars represent standard deviations as calculated by the GraphPad Prism® program (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

### 3. Results

#### 3.1. dsRNA-induced silencing of the exogenous *gfp* gene marker

##### 3.1.1. Analysis of transformants

In a first step toward a straightforward evaluation of dsRNA-mediated gene silencing in *M. perniciosa*, we used the reporter gene *gfp* as a target for silencing. Therefore, transgenic hyphae expressing *gfp* were produced. To this end, the pHSP70-SG vector containing the hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*), which confers resistance to hygromycin B, and *gfp* under the control of *Ustilago maydis* Heat Shock Protein 70 (*hsp70*) promoter was employed to transform *M. perniciosa* protoplast using a modified PEG/CaCl<sub>2</sub> transformation protocol (Yelton et al., 1984; Balance and Turner, 1985). Hygromycin resistant mycelia from distinct protoplasts regenerating on separate regions of the plate were isolated after 10 days (d) of selection. Each selected mycelia was defined as an independent transformant and the presence of *hph* and *gfp* was then analyzed in these independent transformants after a further growth period of 10 d on selective medium.

The transformation efficiency ranged from 0.9 to 0.6 independent transformants/μg DNA, in two distinct experiments. Five hygromycin resistant regenerants, were tested for the presence of pHSP70-SG by amplification of the *hph* and *gfp* genes (Fig. 2A and B) and by analysis of *gfp* expression by fluorescence microscopy (Fig. 3. A1–A3 and B).

Furthermore, the mitotic stability of *hph* gene was evaluated by testing the ability of transformed hyphae to express hygromycin resistance even after a growth period in non-selective medium. We found that all five selected independent transgenic hyphae when grown up to 40 d in non-selective medium and subsequently transferred to selective medium containing hygromycin B still kept their capacity to grow, indicating that *hph* was stably integrated in the genome.

Transformation with *gfp* was monitored by observation and recording green fluorescence. In transformants GFP fluorescence was detected in the cytoplasm of protoplasts 24 h after transformation and at the hyphal extension zone during the early stages of hyphae development (3–5 d post-transformation). In up to 20-d old hyphae different degrees of green fluorescence was observed

in some hyphae while others did not fluoresce at all (Fig. 3. A1–A3) indicating a heterogeneous pattern of fluorescence.

It was also recorded that GFP fluorescence in 6-month old transformants was preferentially localized in more specific regions of the hyphae such as cell wall, hyphae tips, between hyphae compartments, points of hyphae ramifications, as well as clamp connections (Fig. 3. B1–B3).

A weak fluorescence background was also detected in 3–5 and 20-d old control hyphae that were regenerated from non-transformed protoplasts. This fact can be attributed to fluorescent phenolic compounds in the mycelium cell wall and this hypothesis is compatible with the absence of any fluorescence in non-transformed protoplasts which lack cell wall structures (Fig. 3. A4–A6).

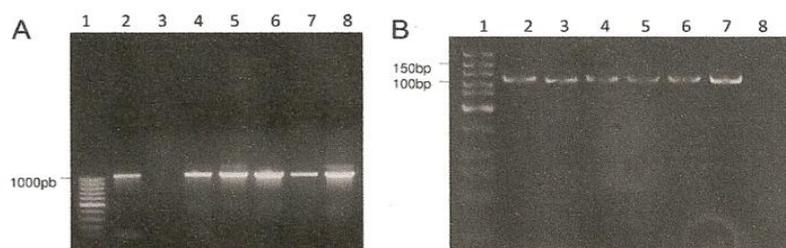
We next attempted to induce *gfp* silencing by direct transformation of protoplasts obtained from hyphae expressing the heterologous *gfp* reporter gene with an *in vitro* synthesized *gfpdsRNA* sequence. Hyphae regenerated from six independent protoplast transformation events with *gfpdsRNA* will be referred to as individual lines T1–T6 and therefore can be considered as biological replicas. The expression level of *gfp* was measured by RT-qPCR 28 d after protoplast transformation with *gfpdsRNAs*. The expression level of *gfp* RNA in lines T1, T3 and T4 treated with *gfpdsRNA* was found to be reduced to approximately half (51.3–63.6%) the level measured in the control *gfp* expressing line. On the other hand, lines T2, T5 and T6 showed striking decreases in the expression levels, ranging from 90.8% to 97.3%, compared to the control line (Fig. 4A).

According to Tukey's test in all six lines treated with *gfpdsRNA* the level of *gfp* expression was significantly lower than the expression values measured in the control (Fig. 4A). Furthermore, the reduction in *gfp* expression in the six silenced lines was compatible with their reduction in GFP fluorescence (Fig. 4B). These results strongly suggest that dsRNA can induce silencing of a specific target gene in *M. perniciosa*. We next verified whether endogenous genes could also be efficiently silenced by related dsRNAs.

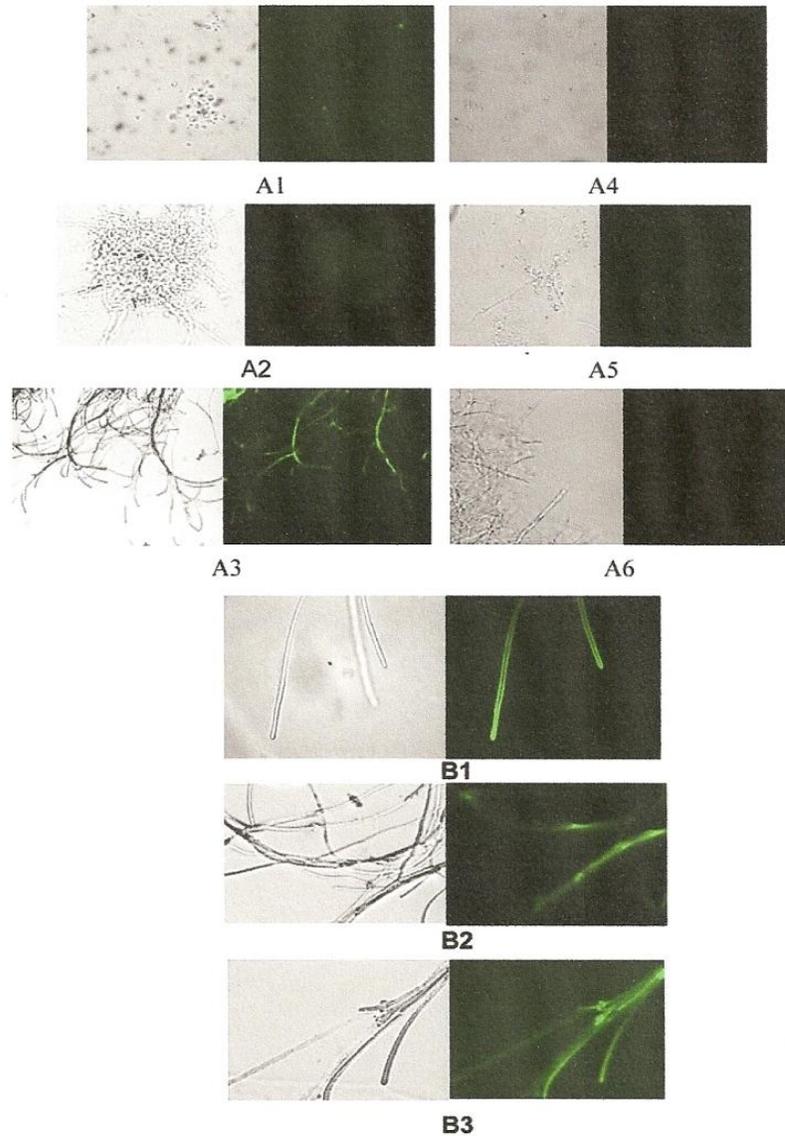
#### 3.2. dsRNA silencing of *M. perniciosa* 1-cys peroxiredoxin (*MpPRX1*) and hydrophobin (*MpHYD*) gene family

To assess the possibility to silence endogenous genes by dsRNAs in *M. perniciosa* we choose the 1-cys peroxiredoxin (*MpPRX1*) that encodes for a mitochondrial protein and the hydrophobin-3 (*MpHYD3*) genes as targets. These gene sequences were identified in the *M. perniciosa* genome database (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>).

The mitochondrial enzyme 1-cys peroxiredoxin function in the detoxification of ROS generated by the respiration process or as a response to several stress agents (Monteiro and Netto, 2004),



**Fig. 2.** Detection of the *hph* and *gfp* genes in lines of *M. perniciosa* transformed with pHSP70(*gfp*). (A) DNA from several independent hygromycin resistant *M. perniciosa* mycelia was extracted and the presence of the *hph* gene evaluated by PCR amplification. 1. Marker; 2. Positive Control (pCAMBIA 1381); 3. Non-transformed *M. perniciosa*; 4, 5, 6, 7, 8 *M. perniciosa* transformants (T1–T5). (B) DNA from several independent hygromycin resistant *M. perniciosa* mycelia was extracted and the presence of the *gfp* gene (119 pb) evaluated by PCR amplification. 1. Marker; 2. Positive Control (pHSP70-SG); 3, 4, 5, 6, 7 *M. perniciosa* transformants (T1–T5); 8. Non-transformed *M. perniciosa*.

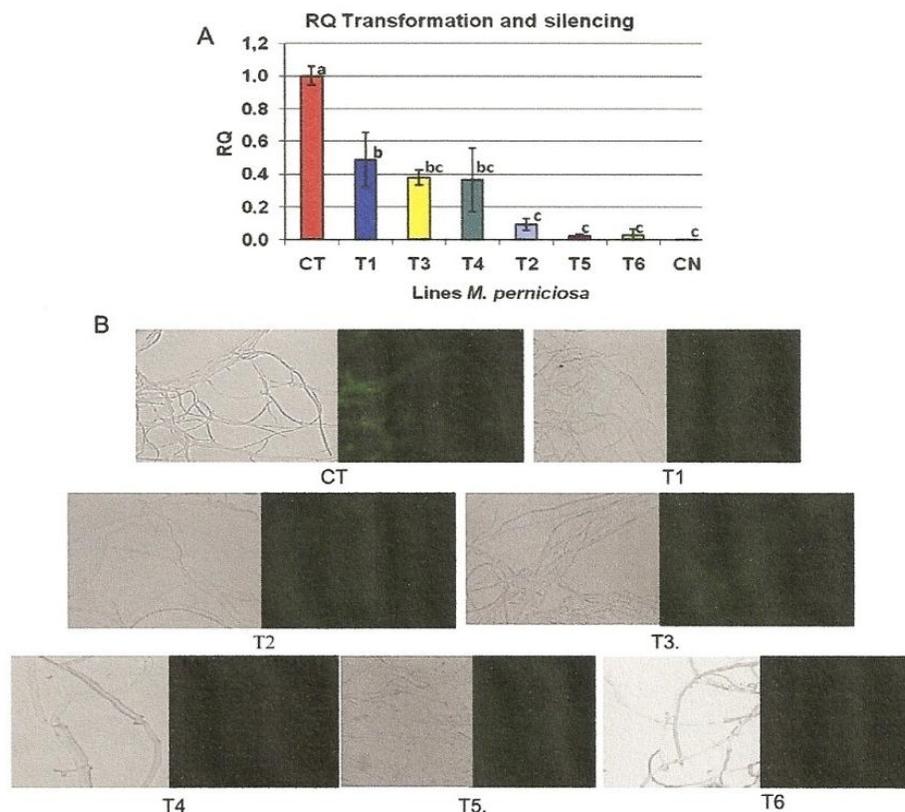


**Fig. 3.** Expression of GFP in *M. perniciosa* mycelia transformed with pHSP70, via PEG/CaCl<sub>2</sub>. Protoplasts and mycelia were examined microscopically using 40× objective under white light conditions (left) or UV light to detect green fluorescence (right). (A) Expression of GFP in *M. perniciosa* mycelia transformed with pHSP70 was monitored at different developmental stages of transformed (A1, A2, A3) and compared to control non transformed mycelia (A4, A5, A6) at equivalent developmental stages. (A1 and A2), Protoplasts, 1 d after transformation. (A2 and A5), Hyphae in early development, 5 d after transformation. (A3 and A6), Hyphae 20-d old after transformation. (B) Expression of GFP in 6-month old *M. perniciosa* transformed mycelia. (B1) Details of hyphae tip shows greater fluorescence intensity at the cell wall and hyphae tip. (B2) Detail of hyphae shows fluorescence among hyphae compartments. (B3) Detail of hyphae shows greater fluorescence intensity at the ramification points and connection clamps. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

protecting the cells against oxidative stresses. In addition to its functional importance, the *MpPRX1* gene was also chosen for its phenotypic expression, that is, lines impaired in the expression of the mitochondrial peroxidase activity at the initial phase of mycelial development are sensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment and, therefore, can be readily identified.

The procedure to induce *MpPRX1* silencing by a corresponding dsRNA sequence was essentially identical to the one described

for *gfp* silencing. Silencing was evaluated by using RT-qPCR to quantify the *MpPRX1* RNA level in 28-d old mycelia that were regenerated from *MpPRX1*dsRNA-treated protoplasts (Fig. 5A). A clear reduction of *MpPRX1* mRNA levels was detected in all five independent lines regenerated from *MpPRX1*dsRNA-treated protoplasts (Fig. 5A). According to Tukey's test, in five lines the expression was significantly reduced (22.8–87.3%) compared to the control line (Fig. 5A).



**Fig. 4.** Evaluation of *gfp* silencing by *gfpdsRNA* in *M. perniciosa*. (A) Quantification of *gfp* silencing by RT-qPCR. Relative *gfp* expression in the transgenic independent lines of *M. perniciosa* treated with *gfpdsRNA* (T1–T6), Control line transgenic expressing *gfp* (CT) and negative control (NT, non-transformed control line). *gfp* values were normalized to actin values. The levels of *gfp* expression in lines treated with *gfpdsRNA* significantly decreased (51.3–97.3%) in relation to the control line. Variations in the levels of *gfp* expression are shown as standard errors of the means ( $n = 3$ ). Means with the same letter are not significantly different from each other according to Tukey's test ( $p = 0.05$ ). (B) Expression of GFP in 4-month old hyphae of *M. perniciosa* as revealed by green fluorescence. *gfp* expression levels in silenced lines are compatible with the intensity of green fluorescence observed under UV light. Hyphae examined microscopically using 40 $\times$  objectives in white light (left) and GFP filter (right). CT, control non-silenced line and T1–T6 correspond to lines treated with *gfpdsRNA*. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

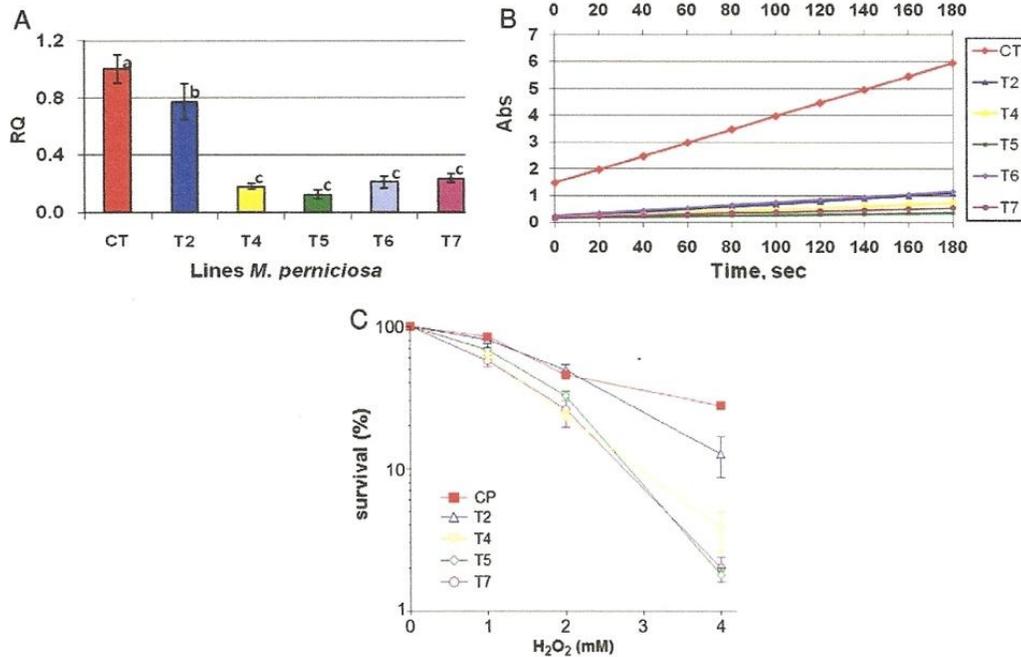
As expected, the five lines silenced for *MpPRX1* presented a reduction in the corresponding peroxidase activity which appeared to be proportional to the *MpPRX1* mRNA levels (Fig. 5B). Reduction of peroxidase activity should confer high sensitivity to  $H_2O_2$ . Hence, 5-month old hyphae silenced for *MpPRX1* were challenged for their sensitivity to  $H_2O_2$ . In all five lines a clear correlation between  $H_2O_2$  exposure doses and survival response was observed (Fig. 5C); with significant reduction in survival values in lines silenced with *MpPRX1*dsRNAs treated with  $H_2O_2$  as compared to the control line (Fig. 5C). The differences among the silenced lines were more accentuated at 4 mM  $H_2O_2$ , indicating that this dose was the most effective in discriminating the different lines. At this concentration all lines differed from each other except T5 and T7, which were not statistically different and showed the lower survival values (Fig. 5C). Since this assay was performed 150 d after dsRNA transformation and the lines were replicated almost 19 times, this result suggests that stable silencing of *MpPRX1* occurred.

In order to consolidate our findings we reasoned that it would be important to be able to silence several genes simultaneously. For that, we chose to simultaneously silence the hydrophobin (*MpHYD*) multigene family, which is formed by five members that

share a high degree of sequence similarity (Fig. 6A and F and Santos, 2005). In addition, as *MpHYD* are required for the formation of aerial hyphae, basidiomes and spores, which are essential structures in reproduction and preservation of the fungus, silencing of these genes would result in phenotypes that could be monitored. Therefore, a dsRNA sequence corresponding to the whole *MpHYD3* gene (alignments of *MpHYD3* with other hydrophobin sequences are shown in Fig. 6A), was used to evaluate the efficiency of silencing the *MpHYD* gene family.

The efficiency of *MpHYD* silencing was measured by RT-qPCR analysis in two independent experiments that differed from each other by the method of transferring the *MpHYD3dsRNA*, PEG/ $CaCl_2$  versus electroporation transformations. All analyses were performed using the four pairs of primers that specifically amplify hydrophobins 1, 2, 4 and 5, respectively (Table 1). Although *MpHYD3dsRNA* was used to trigger hydrophobin genes silencing, *HMP3* RNA could not be quantified adequately by RT-qPCR and was therefore not included in our analysis.

Fig. 6B shows that silencing occurred in a set of three independent lines that were regenerated from protoplasts electroporated with *MpHYD3dsRNA*. The degree of reduction in hydrophobin gene expression ranged from 89.0% to 97.6% (Fig. 6B) and the



**Fig. 5.** Evaluation of MpPRX1 silencing. (A) Determination of MpPRX1 silencing efficiency using RT-qPCR. Relative MpPRX1 expression in control (CT) and five independent hyphae lines T2, T4, T5 T6 and T7 treated with MpPRX1 dsRNA. Variations in the levels of MpPRX1 expression are shown as standard errors of the mean ( $n = 3$ ). Means followed by the same letter in the same column are not significantly different from each other according to Tukey's test ( $p = 0.05$ ). (B) Determination of peroxidase activity in mycelia of *M. perniciosa* silenced with MpPRX1 dsRNA. Lines are linear regression equations, symbols actual data ( $n = 3$ ). Abs can be converted in activity using the equation in material and methods. (C) Survival curves of *M. perniciosa* lines silenced with MpPRX1 dsRNA and control line, all exposed to different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations and incubated for 7 d at 25 °C.

hydrophobin 1, 2, 4 and 5 were significantly different from the control line according to Tukey's test (Fig. 6B).

Transfer of MpHYD3 dsRNA into protoplasts via the PEG/CaCl<sub>2</sub> transformation protocol also resulted in a wide range of reduction of expression levels (18.4% to the 97.0%) compared to control lines (Fig. 6C). According to Tukey's test, the lines T1, T2 and T10 showed significantly reduced levels of mRNA for hydrophobins 1, 2, 4 and 5 with the exception of line T3 for hydrophobin 1 (Fig. 6C). Higher decreases in the expression of hydrophobins were detected in lines T1, for hydrophobins 1, 2 and 4, and lines T1, T2, T3 and T10 for hydrophobin 4 (Fig. 6C).

Overall, it appeared that hydrophobins 4 and 5 showed higher degrees of silencing in most of the silenced lines treated with MpHYD3 dsRNA possibly as a consequence of their higher similarity with MpHYD3 as compared to hydrophobins 1 and 2 (Fig. 6D). In any case, the results obtained for hydrophobins 1, 2, 4 and 5 strongly suggest that the simultaneous silencing of several members of a multigenic family, by the introduction of a dsRNA that covers conserved sequences among the family members, was successfully achieved. Microscopical and visual analyses of the hyphae revealed that 50% and 40% of them exhibited a hydrophilic phenotype (non-flocculent) for electroporated and PEG silenced lines, respectively, when compared with the non-silenced lines (Fig. 6E and F).

#### 4. Discussion

We provided evidences that efficient gene silencing mediated by dsRNA can be achieved in *M. perniciosa*. In a first step we showed that the heterologous *gfp* reporter gene could be stably

transferred into *M. perniciosa* through protoplast transformation with subsequent reduction of *gfp* expression in stably transformed lines promoted by transfer of *gfp* dsRNA synthesized *in vitro*. Silencing of *gfp* in all six transgenic lines submitted to *gfp* dsRNA was highly efficient. Reductions of *gfp* mRNA levels ranging from 51.3% to 97.3% in relation to the control line were found and validated by the reduction in GFP fluorescence emission. Our results are compatible with previously reported *gfp* dsRNA- or hairpin *gfp*-induced *gfp* silencing in different fungi, such as *Colletotrichum lagenarium* (de Jong et al., 2006), *M. oryzae* (Kadotani et al., 2003), *Venturia inaequalis* (Fitzgerald et al., 2004), *P. infestans* (Whisson et al., 2005) and *Coprinopsis cinerea* (Walti et al., 2006; Costa et al., 2008). Silencing of the *gfp* gene in *M. perniciosa* was initially detected after 28 d following transformation with *gfp* dsRNA. Additionally, after 4 months of subsequent mycelium growth and replication, the silenced phenotype was maintained since the treated lines presented reduction in fluorescence when compared to the control non-silenced line grown under the same conditions. This result contrasts with that of Whisson et al. (2005), who considered silencing of *P. infestans* treated with *gfp* dsRNA transient due to the fact that fluorescence was partially recovered after 4 d. In general, RNAi is activated within one or 2 d and may persist for many days until the expression of the gene is recovered (Chen et al., 2003). In our study, the persistence of *gfp* silencing for a longer period (120 d) can be explained by the presence of a sequence similar to *qde-1* of *N. crassa* that encodes for a RNA-dependent RNA-polymerase (RdRP) present in the *M. perniciosa* genome (Mondego et al., 2008). This enzyme feeds back the production of new siRNAs (secondary siRNAs), amplifying silencing through two different pathways (Axtell et al., 2006; Sijen et al., 2001,



2007; Alder et al., 2003; Aoki et al., 2007; Baulcombe, 2007). Alternatively, the late occurrence of gene silencing in *M. perniciosa* may involve other mechanisms, such as DNA methylation or formation of heterochromatin.

In summary, since RNAi is a locus-independent silencing mechanism, transmitted by a molecular mobile signal through the cytoplasm of each cell, its application is viable in filamentous fungi formed by multicellular and bi- or multinucleate hyphae, like *M. perniciosa*.

To be useful as a reverse genetic tool, dsRNA-induced gene silencing must be working for endogenous genes. For that, we tried two approaches, one silencing a gene that encodes for a mitochondrial-targeted protein and another silencing a small gene family that encodes for secreted proteins. We reported that the MpPRX1 silencing was efficiently promoted by MpPRX1 dsRNA reaching up to 87.3% mRNA reduction when compared to the non-silenced control. Moreover, a positive correlation between mRNA levels and the degree of the corresponding enzyme 1-cys peroxiredoxin activity was established indicating that dsRNA-induced silencing can indeed result in lower protein levels, which characterizes a knock-down outcome.

Reduction of mitochondrial 1-cys peroxiredoxin activity was further confirmed by the increased sensitivity, therefore, lower survival rates of silenced lines to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Generally, in this study, performed 5 months after transformation, we found a strong negative correlation between survival values in lines silenced with MpPRX1 dsRNAs treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as compared to the control line. We notice, however, that low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> of 1 and 2 mM were not discriminative since the survival values of the different silenced lines were rather similar to the control line. This result can be explained if other enzymes such as the cytoplasmic and mitochondrial catalases involved in the neutralization or removal of ROS species were activated (Boveris, 1998) and could compensate for the lack of MpPRX1 activity. In *S. cerevisiae*, for example, the peroxiredoxin-null mutants, including *prx1* did not exhibit serious growth defects in aerobic culture due the induction of expression of others antioxidant proteins including glutathione peroxidase and glutathione reductase (Wong et al., 2004). Furthermore, the decrease in the survival rate values of silenced lines treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, when compared to the control line, indicates that the silencing persisted throughout a 5 month period. This data is in agreement with the stability of *gfp* silencing during growth described above and further supports the conclusion that silencing is maintained during long periods. Recently, Pungartnik et al. (2009) demonstrated the effects of ROS in the *M. perniciosa* biology, thus, the silencing of MpPRX1 will be very important to validate several hypothesis raised in this work.

One way to get around the functional redundancy among members of gene families is to silence simultaneously all members of the family. In order to test such a possibility we evaluated the dsRNA-induced silencing of four among five members of the *M. perniciosa* hydrophobin family. We showed that indeed, by direct transfer of an MpHYD3 dsRNAs full sequence, some part of which is conserved among all five hydrophobin genes (Fig. 6A), the expression levels of MpHYD 1, 2, 4 and 5 were significantly reduced as compared to the untreated control.

The levels of relative expression of MpHYDs showed wide variation (18.4–97.6%) among the lines treated with MpHYD3 dsRNA which is in agreement with the variability in the extent of silencing that was described for the six hydrophobins of the fungus *Cladosporium fulvum* targeted with inverted repeat chimeras (Lacroix and Spanu, 2008). It appeared however that hydrophobin 4 and 5 showed the highest degrees of silencing in most of the lines treated with MpHYD3 dsRNA. This can be correlated to the overall high degree of identity of MpHYD4 and MpHYD5 with the silencing sequence from MpHYD3, 66% and 88%, respectively (Fig. 6D).

Our results are in line with those obtained by Walti et al. (2006), who used as targets the isogenes *cg1* and *cg2* that encode two isogalectins, which are highly induced during the formation of fruiting bodies of *Coprinopsis cinerea*. They demonstrated the possibility of silencing part of this gene family with a single hairpin construction. The genes *cg1* and *cg2*, which show 87% identity, were silenced in a frequency of up to 90%, while the counterpart *cg3*, with 53.5% identity to *cg2* in its coding region, was not affected. In *C. fulvum*, simultaneous silencing of hydrophobins using inverted repeat chimeras was obtained, however, it was noticed that the efficiency of the process decreased with the increase of genes to be simultaneously silenced (Lacroix and Spanu, 2008). Together, these observations provide guidelines for functional gene analyses using dsRNA-induced silencing mainly in the cases of functional redundancy among closely related paralogues. In addition to the RT-qPCR results, a hydrophilic phenotype was observed in 45% of the silenced lines, which is accordingly with one of the expected roles of hydrophobins in aerial hyphae maintenance (Wösten et al., 1994). Indeed, antisense silenced lines of HCF1 in *Cladosporium fulvum* presented a hydrophilic phenotype (Hamada and Spanu, 1998).

Since the technology used in this work does not rely on laborious methods, it has great potential as a tool for the study of many functional genes in *M. perniciosa*, especially those linked to the developmental and infective stages. Moreover, the adjustment and optimization of the protocol for silencing mediated by dsRNA in *M. perniciosa*, including the technology for plasmidial construction that express hpRNA and produces stable silencing, is important for the functional analysis of genes that are expressed in more advanced developmental stages, such as basidiocarp formation. RNAi silencing would be a valuable tool to silence genes that are active in the heterokaryotic stage and require the inactivation of them in both nuclei. RNAi is able to silence genes in both nuclei by the expression of a hairpin construction in just one of them.

#### Acknowledgments

We thank Dr. Regine Kahmann and Dr. Karina Gramacho for kindly providing the pHSP70-SG vector and the *M. perniciosa* CPO2 strain, respectively. Research supported by FINEP and FAPESP *M. perniciosa* Proteomic Network. A.C.C.S held a fellowship from the Programa de Qualificação Institucional – PQI-CAPES and the UNICAMP Genetics Post-Graduation Program. C.V.D held FAPESP fellowship as Doctoral student in the Genetics Post-Graduation Program of UESC.

#### References

- Aigner, A., 2006. Gene silencing through RNA interference (RNAi) *in vivo*: strategies based on the direct application of siRNAs. *Journal of Biotechnology* 124, 12–25.
- Aime, M.C., Phillips-Mora, W., 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod of cocoa (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97, 1012–1022.
- Alder, M.N., Dames, S., Guadet, J., Mango, S.E., 2003. Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference. *RNA* 9, 25–32.
- Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K., Tabara, H., 2007. *In vitro* analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *EMBO Journal* 26, 5007–5019.
- Arévalo, E., Ram, A., Valle, R.R., 2007. Integração de práticas de manejo no cultivo de cacau. In: Valle, R.R. (Ed.), *Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacau*. Gráfica e Editora Vital Ltda, pp. 324–370.
- Ashrafi, K., Chang, F.Y., Watts, J.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Ruvkun, G., 2003. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 421, 268–272.
- Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R., Bartel, D.P., 2006. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell* 127, 565–577.
- Balanced, D.J., Turner, G., 1985. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* 36, 321–331.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Baulcombe, D.C., 2007. Amplified silencing. *Science* 315, 199–200.

- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., 2001. Role for a bidirectional ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363–366.
- Boveris, A., 1998. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B. Aires)* 58, 350–356.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G., Cogoni, C., 2000. Gene silencing in worms and fungi. *Nature* 404, 245.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G., Cogoni, C., 2002. Involvement of small RNAs and role of the *qde* genes in the gene silencing pathway in *Neurospora*. *Genes and Development* 16, 790–795.
- Catalanotto, C., Pallotta, M., ReFalo, P., Sachs, M.S., Vayssie, L., Macino, G., Cogoni, C., 2004. Redundancy of the two Dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology* 24, 2536–2545.
- Ceita, G.O., Macêdo, J.N.A., Santos, T.B., Alemanno, L., Gesteira, A.S., Micheli, F., Mariano, A.C., Gramacho, K.P., Silva, D.C., Meinhardt, L., Mazzafera, P., Pereira, G.A.G., Cascardo, J.C.M., 2007. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Science* 173, 106–117.
- Ceruti, H., 2003. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends in Genetics* 19, 39–46.
- Chen, S., Hofius, D., Sonnenwald, U., Bornke, F., 2003. Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA. *Plant Journal* 36, 731–740.
- Cogoni, C., Macino, G., 1999. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 399, 166–169.
- Costa, A.S.M.B., Mills, P.R., Bailey, A.M., Foster, G.D., Challen, M.P., 2008. Oligonucleotide sequences forming short self-complementary hairpins can expedite the down-regulation of Coprinopsis cinerea genes. *Journal of Microbiological Methods* 75, 205–208.
- Costa, A.S.M.B., Thomas, D.J.I., Eastwood, D., Cutler, S.B., Bailey, A.M., Foster, G.D., Mills, P.R., Challen, M.P., 2009. Quantifiable downregulation of endogenous genes in *Agaricus bisporus* mediated by expression of RNA hairpin. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 271–276.
- de Jong, J.F., Deelstra, H.J., Wösten, H.A.B., Lugones, L.G., 2006. RNA-mediated gene silencing in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1267–1269.
- Eastwood, D.C., Challen, M.P., Zhang, C., Jenkins, H., Henderson, J., Burton, S., 2008. Hairpin-mediated down-regulation of the urea cycle enzyme argininosuccinate lyase in *Agaricus bisporus*. *Mycological Research* 112, 708–716.
- Evans, H.C., 1980. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society* 74, 515–523.
- Evans, H.C., 1981. Witches' broom disease – a case study. *Cocoa Growers' Bulletin* 32, 5–19.
- Filho, D.F., Pungartnik, C., Cascardo, J.C.M., Brendel, M., 2006. Broken hyphae of the basidiomycete *Crinipellis perniciosa* allow quantitative assay of toxicity. *Current Microbiology* 52, 407–412.
- Fitzgerald, A., van Kan, J.A.L., Plummer, K.M., 2004. Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genetics and Biology* 41, 963–971.
- Forrest, E.C., Cogoni, C., Macino, G., 2004. The RNA-dependent RNA polymerase, QDE-1, is a rate-limiting factor in post-transcriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Research* 32, 2123–2128.
- Garcia, O., Macedo, J.N.A., Tiburcio, R., Zapparoli, G., Rincones, J., Bittencourt, L.M.C., Ceita, G.O., Micheli, F., Gesteira, A., Mariano, A.C., Schiavinato, M.A., Medrano, F.J., Meinhardt, L.W., Pereira, G.A.G., Cascardo, J.C.M., 2007. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycological Research* 111, 443–455.
- Gesteira, A.S., Micheli, F., Carels, N., da Silva, A.C., Gramacho, K.P., Schuster, I., Macedo, J., Pereira, G.A.G., Cascardo, J.C.M., 2007. Comparative analysis of expressed genes from cocoa meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. *Annals of Botany* 100, 129–140.
- Goldoni, M., Azzalin, G., Macino, G., Cogoni, C., 2004. Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 41, 1016–1024.
- Haley, B., Tang, G., Zamore, P.D., 2003. In vitro analysis of RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods* 30, 330–336.
- Hamada, W., Spanu, P.D., 1998. Co-suppression of the hydrophobin gene Hcf-1 is correlated with antisense RNA biosynthesis in *Cladosporium fulvum*. *Molecular General Genetics* 259, 630–638.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950–952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296.
- Heim, R., Cubitt, A.B., Tsien, R.Y., 1995. Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663–664.
- Heneghan, M.N., Costa, A.S.M.B., Challen, M.P., Mills, P.R., Bailey, A., Foster, G.D., 2007. A comparison of methods for successful triggering of gene silencing in *Coprinus cinereus*. *Molecular Biotechnology* 35, 283–296.
- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T., Baulcombe, D.C., 2005. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308, 118–120.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S., 2003. RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 769–776.
- Kim, D.H., Behlke, M.A., Rose, S.D., Chang, M.S., Choi, S., Rossi, J.J., 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnology* 23, 222–226.
- Lacroix, H., Spanu, P.D., 2008. Silencing of six hydrophobins in *Cladosporium fulvum*: complexities of simultaneously targeting multiple genes. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 542–546.
- Lee, N.S., Rossi, J.J., 2004. Control of HIV-1 replication by RNA interference. *Virus Research* 102, 53–58.
- Lima, J.O., Santos, J.K.dos., Pereira, J.F., de Rezende, M.L.V., de Araújo, E.F., de Queiroz, M.V., 2003. Development of a transformation system for *Crinipellis perniciosa* the causal agent of witches' broom in cocoa plants. *Current Genetics* 42, 236–240.
- Lopes, M.A., Gomes, D.S., Koblitz, M.G.B., Pirovani, C.P., Cascardo, J.C.M., Góes-Neto, A., Micheli, F., 2008. Use of response surface methodology to examine chitinase regulation in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*. *Mycological Research* 112, 399–406.
- Maiti, M., Lee, H.C., Liu, Y., 2007. QIP, a putative exonuclease, interacts with the *Neurospora Argonaute* protein and facilitates conversion of duplex siRNA into single strands. *Genes and Development* 21, 590–600.
- McGeary, F.M., Wheeler, B.E.J., 1988. Growth rates of, and mycelial interactions between isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa. *Plant Pathology* 37, 489–498.
- Meister, G., Tuschl, T., 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343–349.
- Melo, S.C.O., Pungartnik, C., Cascardo, J.C.M., Brendel, M., 2006. Rapid and efficient protocol for DNA extraction and molecular identification of the basidiomycete *Crinipellis perniciosa*. *Genetics and Molecular Research* 5, 851–855.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A., Matzke, A.J., 2000. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO Journal* 19, 5194–5201.
- Meyer, V., 2008. Genetic engineering of filamentous fungi – progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances* 26, 177–185.
- Mondego, J.M., Carazzolle, M.F., Costa, G.G., Formighieri, E.F., Parizzi, L.P., Rincones, J., Cotomacci, C., Carraro, D.M., Cunha, A.F., Carrer, H., Vidal, R.O., Estrela, R.C., Garcia, O., Thomazella, D.P., de Oliveira, B.V., Pires, A.B., Rio, M.C., Araujo, M.R., de Moraes, M.H., Castro, L.A., Gramacho, K.P., Goncalves, M.S., Moura Neto, J.P., Goes Neto, A., Barbosa, L.V., Guiltinan, M.J., Bailey, B.A., Meinhardt, L.W., Cascardo, J.C., Pereira, G.A., 2008. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into witches' broom disease of cocoa. *BMC Genomics* 9, 548.
- Monteiro, C., Netto, L.E.S., 2004. Glucose repression of *PRX1* expression is mediated by Tor1p and Ras2p through inhibition of Msn2/4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 241, 221–228.
- Nakayashiki, H., Hanada, S., Nguyen, B.Q., Kadotani, N., Tosa, Y., Mayama, S., 2005. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genetics and Biology* 42, 275–283.
- Nguyen, Q.B., Kadotani, N., Kasahara, S., Tosa, Y., Mayama, S., Nakayashiki, H., 2008. Systematic functional analysis of calcium-signaling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. *Molecular Microbiology* 68, 1348–1365.
- Nicolás, F.E., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vázquez, R.M., 2003. Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO Journal* 22, 3983–3991.
- Pereira, T.C., Pascoal, V.D.B., Marchesini, R.B., Maia, I.G., Magalhães, L.A., Zanotti-Magalhães, E.M., Lopes-Cendes, I., 2008. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. *Experimental Parasitology* 118, 619–623.
- Pungartnik, C., Melo, S.C.O., Basso, T.S., Macena, W., Cascardo, J.C.M., Brendel, M., 2009. Reactive oxygen species and autophagy play a role in survival and differentiation of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Fungal Genetics and Biology* 46, 461–472.
- Rana, T.M., 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews* 8, 23–36.
- Santos, S.T., 2005. Caracterização de hidrofobinas do fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, causador da doença vassoura-de-bruxa do cacauero. M.Sc. Thesis, UESC, Ilhéus, Bahia, 2005.
- Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H., Galbraith, D.W., 1995. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant Journal* 8, 777–784.
- Shiu, P.K., Zickler, D., Raju, N.B., Ruprich-Robert, G., Metzner, R.L., 2006. SAD-2 is required for meiotic silencing by unpaired DNA and perinuclear localization of SAD-1 RNA-directed RNA-polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2243–2248.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., Fire, A., 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465–476.
- Sijen, T., Steiner, F.A., Thijssen, K.L., Plasterk, R.H., 2007. Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* 315, 244–247.
- Spellig, T., Bottin, A., Kahmann, R., 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular and General Genetics* 252, 503–509.
- Tanguay, P., Bozza, S., Breuil, C., 2006. Assessing RNAi frequency and efficiency in *Ophiostoma floccosum* and *O. Piceae*. *Fungal Genetics and Biology* 43, 804–812.
- Tenillado, F., Llave, C., Díaz-Ruiz, J.R., 2004. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research* 102, 85–96.
- Vance, V., Vaucheret, H., 2001. RNA silencing in plants – defense and counter-defense. *Science* 292, 2277–2280.

- Vijn, I., Govers, F., 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 4, 459–467.
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I., Martienssen, R.A., 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297, 1833–1837.
- Walti, M.A., Villalba, C., Buser, R.M., Grunler, A., Aebi, M., Kunzler, M., 2006. Targeted gene silencing in the model mushroom *Coprinus cinerea* (*Coprinus cinereus*) by expression of homologous hairpin RNAs. *Eukaryotic Cell* 5, 732–744.
- Weld, R.J., Plummer, K.M., Carpenter, M.A., Ridgway, H.J., 2006. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research* 16, 31–44.
- Whisson, S.C., Avrova, A.O., West, P.V., Jones, J.T., 2005. A method for double-stranded RNA-mediated transient gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 6, 153–163.
- Wong, C.-M., Siu, K.-L., Jin, D.-Y., 2004. Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable. *Journal of Biological Chemistry* 279, 23207–23213.
- Wösten, H.A., Asgeirsdóttir, S.A., Krook, J.H., Drenth, J.H., Wessels, J.G., 1994. The fungal hydrophobin Sc3p self-assembles at the surface of aerial hyphae as a protein membrane constituting the hydrophobic rodlet layer. *European Journal of Cell Biology* 63, 122–129.
- Yelton, M.M., Hamer, J.E., Timberlake, W.E., 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 1470–1474.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Barlet, D.P., 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25–33.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

O estabelecimento de uma metodologia, bem como a obtenção da comprovação acerca da operacionalidade do silenciamento mediado por RNAi em *M. perniciososa* abrem novos caminhos para o estudo funcional de genes e conseqüente compreensão dos mecanismos de infecção, reprodução e sobrevivência deste fitopatógeno. Por meio das ações estratégicas implementadas neste trabalho e dos resultados obtidos pode se concluir que:

7.1. Nos experimentos que integram o Capítulo I foram estabelecidas as condições adequadas para a regeneração de protoplastos eletroporados de *M. perniciososa*. A eletroporação é proposta como um método alternativo para a transfecção de DNA transgênico e de dsRNAs nos experimentos de transformação e de silenciamento, respectivamente.

- Foi evidenciado que a capacidade regenerativa dos protoplastos de *M. perniciososa* decresceu com aumento da voltagem e do número de pulsos aplicados durante a eletroporação, sendo que os parâmetros que promoveram a maior freqüência de regeneração foram a aplicação de um pulso de 1.5 kV, entretanto, este protocolo deve ser otimizado para fins de transformação, usando DNA exógeno.
- O padrão de regeneração das hifas de *M. perniciososa* foi caracterizado pela emergência de um tubo germinativo a partir de uma única célula esférica, entretanto deve ser ressaltado que a reversão dos protoplastos regenerados para a forma hifal ocorre de modo geral, a partir da agregação de vários protoplastos, sendo, portanto, difícil estabelecer a freqüência de regeneração de *M. perniciososa*.

7.2. No Capítulo II foi produzida uma linhagem transgênica de *M. pernicioso*, que expressa o gene heterólogo *gfp*. Essa linhagem foi utilizada como modelo para o estabelecimento do protocolo de silenciamento gênico por RNAi, bem como para a confirmação da operacionalidade de RNAi em *M. pernicioso*. A partir deste modelo, foi estabelecido o silenciamento de dois genes endógenos (MpHYD3 e MpPRX1), mediado por dsRNAs, visando o seu estudo funcional.

- Foram obtidas linhagens transgênicas com inserção estável do gene *gfp* no genoma de *M. pernicioso*. Essa transformação foi validada pela detecção de fluorescência de GFP nos protoplastos e nas hifas, sendo que estas últimas apresentaram um padrão de fluorescência heterogêneo.
- Nas linhagens transgênicas tratadas com *gfpdsRNAs* foi detectado redução significativa dos níveis de mRNAs. O silenciamento foi validado pela redução da intensidade na emissão de fluorescência.
- Foi estabelecido o silenciamento do gene endógeno MpPRX1 a partir da transfecção direta de MpPRX1dsRNAs sintetizados *in vitro*. Este gene foi significativamente silenciado, alcançando 87,3% de redução dos níveis de mRNAs. O silenciamento foi validado pelo estabelecimento de uma correlação positiva entre os níveis de mRNAs e o grau de atividade da enzima 1-cis peroxiredoxina, bem como pelo decréscimo na taxa de sobrevivência das linhagens silenciadas quando submetidas a concentrações diferentes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Foi demonstrado que RNAi em *M. pernicioso* é capaz de silenciar vários genes simultaneamente. Dessa forma uma família multigênica (MpHYD) que codifica hidrofobinas, proteínas requeridas para a reprodução e disseminação desse fungo, teve todos os membros silenciados em diferentes graus, devido à

introdução de dsRNA homólogo a uma seqüência conservada entre os membros dessa família. Das linhagens silenciadas 50% apresentaram fenótipo das hifas correspondentes ao silenciamento, ou seja, redução no número de hifas aéreas.

- Para o gene heterólogo *gfp* e o gene endógeno *MpPRX1* foi comprovada a amplificação do silenciamento, devido ao fato da persistência, por longo período, da redução da emissão de fluorescência de GFP e na diminuição na taxa de crescimento de *M. perniciosus* tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente, indicando silenciamento sistêmico.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., Mukherjee, S.K. 2003. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 657-685.
- Aigner, A. 2006. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *Journal of Biotechnology* 124, 12-25.
- Aime, M.C., Phillips-Mora, W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod of cocoa (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97, 1012-1022.
- Alder, M.N., Dames, S., Guadet, J. Mango, S.E. 2003. Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference. *RNA* 9, 25-32.
- Almeida, H.A., Luz, E. 1995. Influência da chuva, temperatura e umidade relativa do ar na produção de basidiomas de *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira* 20, 374-377.
- Aoki, K., Moriguchi, H., Yoshioka, T., Okawa, K., Tabara, H., 2007. In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *EMBO Journal* 26, 5007-5019.
- Ashrafi, K., Chang, F.Y., Watts, J.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., Ruvkun, G., 2003. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 421, 268-272.
- Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R., Bartel, D.P., 2006. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell* 127, 565-577.

- Ballance, D.J., Buxton, F.P., Turner, G. 1983. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the ornithine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 284-289.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116, 281-297.
- Bass, B.L. 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. Cell 101, 235-238.
- Bastos, C.N. 1986. Comparação morfológica e patológica de isolados de *Crinipellis pernicios* (Sthael) Singer. In Belém, PA, Informe técnico 1986, CEPLAC/DEPEA. 58-63 p.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. Nature 431, 356-363.
- Baulcombe, D.C. 2007. Amplified silencing. Science 315, 199-200.
- Beggs, J. D. 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature 275, 104-109.
- Belozerskaya, T.A., Gessler, N.N. 2007. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A Review. Applied Biochemistry and Microbiology 43, 506-515.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature 409, 363-366.
- Calle, H., Cook, A.A., Fernando, S.Y. 1982. A histological study of Witches' broom in cocoa, caused by *Crinipellis pernicios*. Phytopathology, 72, 1479-1481.
- Case M. E., Schweizer M., Kushner S. R., GILES N. H. 1979. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5259-5263

- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G., Cogoni, C. 2002. Involvement of small RNAs and role of the genes on the gene silencing pathway in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* 16,790-795.
- Catalanotto, C., Pallotta, M., Refalo, P., Sachs, M.S., Vayssie, L., Macino, G., Cogoni, C. 2004. Redundancy of the two Dicer genes in transgene-induced posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology* 24, 2536-2545.
- Ceita, G.O., Macêdo, J.N.A., Santos, T.B., Alemanno, L., Gesteira, A.S., Micheli, F., Mariano, A.C., Gramacho, K.P., Silva, D.C., Meinhardt, L., Mazzafera, P., Pereira, G.A.G., Cascardo, J.C.M., 2007. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Science* 173, 106-117.
- Ceruti, H. 2003. RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet.* 19, 39-46.
- Chakaarabarty, B.N., Patterson, N.A., Kapoor, M. 1991. An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 37, 858-863.
- Chang, H.S., Lin, C.H., Chen, Y.C., Yu, W.C. 2004. Using siRNA technique animals with spatiotemporal and conditional gene knockdown. *Am. J. Pathol.* 165, 1535-1541.
- Chen, X., Stne, M., Schlaghaufer, C., Romaine, C.P. 2000. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4510-4513.

- Cogoni, C., Macino, G. 1999. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 399, 166-69.
- Costa, A.S.M.B., Thomas, D.J.I., Eastwood, D., Cutler, S.B., Bailey, A.M., Foster, G.D., Mills, P.R., Challen, M.P. 2009. Quantifiable downregulation of endogenous genes in *Agaricus bisporus* mediated by expression of RNA hairpin. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 271-276.
- Cronshaw, D.K., Evans, H.C. 1978. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador. 2. Methods of infection. *Ann. Appl. Biol.* 89, 193-200.
- Cui, W., Ning, J.; Naik, U.P., Duncan, M.K. 2004. OptiRNAi, an RNAi design tool. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 75, 67-73.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., Baulcombe, D.C. 2000. RNA-dependent polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101, 533-53.
- Davidson R.C., Cruz M.C., Sia R.A.L. 2000. Gene disruption by biolistic transformation in serotype D strains of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology* 29, 38-48.
- De Jong, J.F., Deelstra, H.J., Wösten, H.A.B., Lugones, L.G. 2006. RNA-mediated gene silencing in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1267-1269.
- De Vries, O.M. Feekes, M.P., Wösten, H.A.B., Wessels, J.G. 1993. Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Arch. Microbiol.* 159, 330-335.

- De Vries, O.M.H., Wessels, J.G.H. 1975. Chemical analysis of cell wall regeneration and reversion of protoplasts from *Schizophyllum commune*. Arch. Microbiol. 102, 209-218.
- Eastwood, D.C., Challen, M.P., Zhang, C., Jenkins, H., Henderson, J., Burton, S. 2008. Hairpin-mediated down-regulation of the urea cycle enzyme argininosuccinate lyase in *Agaricus bisporus*. Mycological Research 112, 708-716.
- Elbashir, S.M., Harborth, J. Weber, K. Tuschlt. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. Methods 26, 199-213.
- Evans, H.C. 1980. Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. Transactions of the British Mycological Society 74, 515-523.
- Evans, H.C. 1981. Witches' broom disease – a case study. Cocoa Growers' Bulletin 32, 5-19.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C., Vaucheret, H. 2000. *AGO1*, *QDE2*, and *RDE1* are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 11650-11654.
- Fire, A. Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391, 806-811.
- Fitzgerald, A., Van Kan, J.A.L., Plummer, K.M. 2004. Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. Fungal Genetics and Biology 41, 963-971.

- Forrest, E.C., Cogoni, C., Macino, G. 2004. The RNA-dependent RNA polymerase, QDE-1, is a rate-limiting factor in post-transcriptional gene silencing in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Research* 32, 2123-2128.
- Frias, G.A., Purdy, L.H., Schmidt, R.A. 1991. Infection biology of *Crinipellis pernicioso* on vegetative flushes of cacao. *Plant Disease* 75, 552-556.
- Gene Expression Affects Hyphal Wall Composition in *Schizophyllum commune*. *Fungal Genetics and biology* 31, 99-104
- Gessler, N.N., Aver'yanov, A.A., Belozerskaya, T.A. 2007. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry* 72, 1342-1364.
- Gesteira, A.S., Micheli, F., Carels, N., Da Silva, A.C., Gramacho, K.P., Schuster, I., Macedo, J., Pereira, G.A.G., Cascardo, J.C.M. 2007. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora pernicioso*. *Annals of Botany* 100, 129-140.
- Goldoni, M., Azzalin, G., Macino, G., COGONI, C. 2004. Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 41, 1016-1024.
- Gomes-Barcellos, F., Pelegrinelli-Fungaro, M.H., Furlaneto, M.C., Lejeune, B., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L. 1998. Genetic analysis of *Aspergillus nidulans* unstable transformants obtained by the biolistic process. *Canadian Journal of Microbiology* 44, 1137-1141.
- Haley, B., Tang, G., Zamore, P.D. 2003. In vitro analysis of RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods* 30, 330-336.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., Baulcombe, D. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21, 4671-4679.

- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C. 1999. A novel species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G.J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- Hammond, T.M., Keller, N.P. 2005. RNA silencing in *Aspergillus nidulans* is independent of RNA-dependent RNA polymerase. *Genetics* 169, 607-617.
- Hazell, B.W., Teo, V.S.J, Bradner, J.R., Berquist, P.L., Nevalainen, K.M.H. 2000. Rapid transformation of high secreting mutant strains of *Trichoderma reesei* by microprojectile bombardment. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 282-6.
- Heneghan, M.N., Costa, A.M.S.B., Challen, M.P., Mills, P.R., Bailey, A., Foster, G.D. 2007. A comparison of methods for successful triggering of gene silencing in *Coprinus cinereus*. *Molecular Biotechnology* 35, 283-296.
- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T., Baulcombe, D.C., 2005. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308, 118-120.
- Hinnen A., Hicks J. B., Fink G. R. 1978. Transformation of yeast chimeric ColE1 plasmid carrying *LEU2*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 1929-1933
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schlter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, P. S. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnol.* 21, 635-637.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S. 2003. RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 16, 769-776.

- Ketting, R.F., Haverkamp, T.H., van Luenen, H.G., Plasterk, R.H. 1999. *Mut-7* of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference is a homolog of Werner syndrome helicases and RnaseD. *Cell* 99, 133-41.
- Kilaru, A., Hasenstein, K.H. 2005. Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis pernicios* on interaction with cacao leaves. *Phytopathology* 95, 101-07
- Kim, D.H., Behlke, M.A., Rose, S.D., Chang, M.S., Choi, S., Rossi, J.J. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnology* 23, 222-226.
- Knoops, B., Loumaye, E., van der Eecken, V. 2007. Evolution of the peroxiredoxins. *Subcell Biochem.* 44, 27-40.
- Lee, N.S., ROSSI, J.J. 2004. Control of HIV-1 replication by RNA interference. *Virus Research* 102, 53-58.
- Leger, R.J.ST., Shimizu, S., Joshi, L., Bidochka, M.J., Roberts, D.W. 1995. Co-transformation of *Metarhizium anisopliae* by electroporation or using the gene *gun* to produce stable GUS transformants. *FEMS Microbiology Letters* 131, 289-294.
- Lima, J.O., Santos, J.K. dos, Pereira, J.F., Rezende, M.L.V. de , Araújo, E.F. de, Queiroz, M.V. de, 2003. Development of a transformation system for *Crinipellis pernicios* the causal agent of witches' broom in cocoa plants. *Current Genetics* 42, 236-240.
- Linder, M.B., Szilvay, G.R., Nakari-Setälä, T., Penttilä, M.E. 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 877-896.
- Lippman, Z., Martienssen, R. 2004. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431, 364-370.

- Liu, J. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi science 305, 1437-1441.
- Lobão, D.E., Setenta, W.C., Lobão E.S.P., Curvelo, K., Valle, R.R. 2007. Cacaucabruca sistema agrossilvicultural tropical. In Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro. Editor R.R. Valle. Gráfica e Editora Vital Ltda. 290-323 p.
- Lopes, F.J.F., Queiroz, M.V. de, Lima, J. O., Silva, V.A.O., Araújo, E.F. 2008. Restriction enzyme improves the efficiency of genetic transformations in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in *Theobroma cacao*. Braz. Arch. Biol. Technol. 51, 27-34.
- Lopes, M.A., Gomes, D.S., Koblitz, M.G.B., Pirovani, C.P., Cascardo, J.C.M., Góes-Neto, A., Micheli, F. 2008. Use of response surface methodology to examine chitinase regulation in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*. Mycological Research 112,399-406.
- Lugones, L.G., Scholtmeijer, K., Klootwijk, R., Wessels, J.G.H. 1999. Introns are necessary for mRNA accumulation in *Schizophyllum commune*. Mol. Microbiol. 32, 681-689.
- MacRae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., Doudna, J. A. 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. Science 311, 195-198.
- Mahmood-ur-Rahman, Ali, I., Husnain, T., Riazuddin, S. 2008. RNA interference: The story of gene silencing in plants and humans. Biotechnology Advances 26, 202-209.

- Maitl, M., Lee, H.C., Liu, Y. 2007. QIP, a putative exonuclease, interacts with the *Neurospora* Argonaute protein and facilitates conversion of duplex siRNA into single strands. *Genes and Development* 21, 590-600.
- Matzke, M.A., Mette, M.F., Matzke, A.J. 2000. Transgene silencing by the host genome defense: Implication for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol. Biol.* 43, 401-415.
- McGeary, F.M., Wheeler, B.E.J. 1988. Growth rates of and mycelial interactions between isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa. *Plant Pathology* 37, 489-498.
- Meinhardt, L.W., Rincones, J., Bailey, B.A., Aime, M.C., Griffith, G.W., Zhang, D., Pereira, G.A.G. 2008. *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Molecular Plant Pathology* 9, 577-588.
- Meister, G., Tuschl, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
- Mello, C.C., Conte, D. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431, 338-342.
- Meyer, V. 2008. Genetic engineering of filamentous fungi – progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances* 26, 177-185.
- Michielse C.B, Hooykaas P.J.J., Van Den Hondel C.A.M.J.J., Ram, A.F.J. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr. Genet.* 48, 1-17.

- Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M. F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S.W., Pruss, G., Vance, V.B. 2002. RNA silencing and the mobile silencing signal. *The Plant Cell* 289-301.
- Mondego, J.M., Carazzolle, M.F., Costa, G.G., Formighieri, E.F., Parizzi, L.P., Rincones, J., Cotomacci, C., Carraro, D.M., Cunha, A.F., Carrer, H., Vidal, R.O., Estrela, R.C., Garcia, O., Thomazella, D.P., DE Oliveira, B.V., Pires, A.B., Rio, M.C., Araujo, M.R., DE Moraes, M.H., Castro, L.A., Gramacho, K.P., Goncalves, M.S., Moura Neto, J.P., Goes Neto, A., Barbosa, L.V., Gultinan, M.J., Bailey, B.A., Meinhardt, L.W., Cascardo, J.C., Pereira, G.A., 2008. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into witches' broom disease of cacao. *BMC Genomics* 9, 548.
- Monteiro, G., Netto, L.E.S., 2004. Glucose repression of PRX1 expression is mediated by Tor1p and Ras2p through inhibition of Msn2/4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 241, 221-228.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T. Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J., Jouette, D., Lacombe, A., Nikic, S., Picault, N. 2000. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101. 533-542.
- Mouyna, I, Henry, C, Doering T.L., Latge, J.P. 2004. Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett.* 237, 317-24.
- Nakayashiki, H., 2005. RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications. *FEBS Letters* 579, 5950-5957.

- Nakayashiki, H., Hanada, S., Nguyen, B.Q., Kadotani, N., Tosa, Y., Mayama, S. 2005. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genetics and Biology* 42, 275-283.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R.A. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell* 2, 279-89.
- Nguyen, Q.B., Kadotani, N., Kasahara, S., Tosa, Y., Mayama, S., Nakayashiki, H. 2008. Systematic functional analysis of calcium-signaling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA silencing system. *Molecular Microbiology* 68, 1348-1365.
- Nicolás, F.E., Torres-Martínez, S., Ruiz-Vásquez, R.M. 2003. Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO J.* 15, 3983-3991.
- Oliveira, M.L., Luz, E.D.M.N. 2007. Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil. In *Ciência e Tecnologia do Cacauero*. Editor, R.R. Valle. Gráfica e Editora Vital Ltda. 123-151 p.
- Pak, J., Fire, A. 2007. Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science* 315, 241-244.
- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Dorlhac de Borne, F., Crete, P., Charles, C., Vaucheret, H. 1996. Frequencies, timing, and spatial patterns of cosuppression of nitrate reductase and nitrite reductase in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* 112, 1447-1456.

- Palauqui, J.C., Elmayan, T., Pollien, J.M., Vaucheret, H. 1997. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.* 16, 4738-4745.
- Palauqui, J.C., Vaucheret, H. 1998. Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9675-9680.
- Pauls, E., Esté, J. A. 2004. RNA interference as a tool for target validation. *Drug Discovery Today, Technologies* 1, 135-140.
- Pedrajas, J.R., Miranda-Vizuete, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J-A., Spyrou, G. 2000. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 16296-16301.
- Pegler, D.N. 1978. *Crinipellis pernicios*a (Agaricales). *Kew Bull.* 32, 731-733.
- Pereira, J.L., Ram, A., Figueiredo, J.M., Almeida, L.C.C. 1989. Primeira ocorrência da vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Agrotropica* 1, 79-81.
- Pereira, J.L., Valle, R.R. 2007. Manejo integrado da vassoura-de-bruxa do cacau. In *Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacau*. Editor R.R. Valle. Gráfica e Editora Vital Ltda. 219-233 p.
- Pereira, T.C., Pascoal, V.D.B., Marchesini, R.B., Maia, I.G., Magalhães, L.A., Zanotti-Magalhães, E.M., Lopes-Cendes, I. 2008. *Schistosoma mansoni*: evaluation of an RNAi-based treatment targeting HGPRTase gene. *Experimental Parasitology* 118, 619–623.

- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemanse, M.A., Pouwels, P.H., Hondel, C.A.M.J.J. Van Den. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56, 117-124.
- Rana, T.M. 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews* 8, 23-36.
- Riach, M.B.R., Kinghorn, J.R. 1996. Genetic transformation and vector developments in filamentous fungi. *Fungal Genetics: Principals and Practice*. Ed. Bos C. J. pp. 209-233. New York: Marcel Dekker Inc.
- Rocha, H.M. 1983. The ecology of *Crinipellis pernicioso* (Sthael) Singer in witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao* L). PhD. Thesis, University of London, England.
- Rocha, H.M., Wheeler, B.E.J. 1985. Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospore of *Crinipellis pernicioso*, the causal fungus of witches' broom on cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Plant Pathol.* 34, 319-328.
- Ruiz-Diez B. 2002. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *J. Appl. Microbiol.* 92, 189-95.
- Ruiz-Diez B., Martinez-Suarez J.V. 1999. Electroporation of the human pathogenic fungus *Scedosporium prolificans* mediated by repetitive rDNA sequences. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 25, 275-82.
- Russo, P.S., Blum, F.D., Ipsen, J.D., Miller, W.G., Abul-Hajj, Y.D. 1982. The surface activity of the phytotoxin cerato-ulmin. *Canadian Journal of Botany* 60, 1414-1422.

- Sánchez, O., Aguirre, J. 1996. Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. Fungal Genetics Newsletter 43, 48-51.
- Santos, J.K. 2001. Obtenção e regeneração de protoplastos de *Crinipellis pernicioso*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao* L.). Dissertação, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- Santos, S.T. 2005. Caracterização de hidrofobinas do fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, causador da doença vassoura-de-bruxa do cacauero. Dissertação, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., Fire, A. 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. Cell 107, 465-476.
- Sijen, T., Steiner, F.A., Thijssen, K.L., Plasterk, R.H. 2007. Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. Science 315, 244-247.
- Silva, S.D.V.M. 1997. Histologia e seleção de variáveis para avaliar resistência de cacauero a *Crinipellis pernicioso*. Tese de Doutorado em Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- Smardon A., Spoerke, J.M., Stacey, S.C., Klein, M.E., Mackin, N., Maine, E.M. 2000. *EGO1* is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. Curr Biol. 10, 169-178.
- Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., Tor, L.J. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science 305, 1434-1437.
- Stahel, G. 1915. *Marasmius perniciosus* Nov. Spec. the cause of the krulloten disease of cacao in Suriname. Transl. AMW ter Laag, Dep. Van den Landbouw, Suriname. Bull 25, p.25. (Translated from German).

- Storz, G., Christman, M.F., Sies, H. Ames, B.N. 1987. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 8917-8921.
- Stringer, M.A., Dean, R.A., Sewall, T.C., Timberlake, W.E. 1991. Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. Genes & Development 5, 1161-1171.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A. 1999. The *rde1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. Cell 99, 123-132.
- Talbot, N.J. 1997. Growing into the air. Curr. Biol. 7, 78-81.
- Talbot, N.J. 1999. Fungal biology: Coming up for air and sporulation. Nature 398, 295-296.
- Talbot, N.J., Kershaw, M.J., Wakley, G.E., de Vries, O.M.H., Wessels, J.G.H., Hamer, J.E. 1996. MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. The Plant Cell 8, 985-999.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., Zamore, P.D. 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. Genes Dev. 17, 49-63.
- Tanguay, P., Bozza, S., Breuil, C. 2006. Assessing RNAi frequency and efficiency in *Ophiostoma floccosum* and *O. Piceae*. Fungal Genetics and Biology 43, 804-812.
- Tenllado, F., Llave, C., Díaz-Ruíz, J.R. 2004. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. Virus Research 102, 85-96.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H. 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. Gene, 26, 205-221.

- van Wetter, M.A., Wösten, H.A.B., Sietsma, J.H., Wessels, J.G.H. 2000. Hydrophobin
- van Wetter, M-A., Wösten, H.A.B., Sietsma, J.H., Wessels, J.G.H. 2000. Hydrophobin gene expression affects hyphal wall composition in *Schizophyllum commune*. *Fungal Genetics and Biology*. 31, 99-104.
- van Wetter, M-A.; Schuren, F.H.J.; Schruurs, T.A.; Wessels, J.G.H. 1996. Targeted mutation of the SC3 hydrophobin gene of *Schizophyllum commune* affects formation of aerial hyphae. *FEMS Microbiology Letters* 140, 265-269.
- Vance, V., Vaucheret, H., 2001. RNA silencing in plants – defense and counterdefense. *Science* 292, 2277-2280.
- Vijn, I., Govers, F. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 4, 459-467.
- Voinnet, O., Baulcombe, D.C. 1997. Systemic signaling in gene silencing. *Nature* 389, 553.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M., Baulcombe, D.C. 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14147-14152.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., Baulcombe, D.C. 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless. DNA. *Cell* 95, 177-187.
- Weld, R.J., Plummer, K.M., Carpenter, M.A., Ridgway, H.J. 2006. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Research* 16, 31-44.
- Wessels, J.G.H. 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 413-437.

- Wessels, J.G.H. 1997. Hydrophobins: Proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv. Microbiol. Physiol.* 38, 1-45.
- Wheeler, B.E.J., Mepsted, R. 1988. Pathogenic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathol.* 37, 475-488.
- Whisson, S.C., Avrova, A.O., West, P.V., Jones, J.T. 2005. A method for double-stranded RNA-mediated transient gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* 6, 153-163.
- Winston, W.M., Molodowitch, C., Hunter, C.P. 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 295, 2456-2459.
- Wood, Z.A., Schroder, E., Harris, J.R., Poole, L.B. 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *TRENDS in Biochemical Sciences* 28, 32-40.
- Wösten, H., de Vries, O., Wessels, J. 1993. Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *Plant Cell* 5, 145-146.
- Wösten, H.A., de Vocht, M.L. 2000. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim. Biophys. Acta* 1469, 79-86.
- Wösten, H.A., Asgeirsdóttir, S.A., Krook, J.H., Drenth, J.H., Wessels, J.G., 1994. The fungal hydrophobin Sc3p self-assembles at the surface of aerial hyphae as a protein membrane constituting the hydrophobic rodlet layer. *European Journal of Cell Biology* 63, 122-129.
- Wösten, H.A., van Wetter, M.A., Lugones, L.G., van der Mei, H.C.; Busscher, H.J.; Wessels, J.G. 1999. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr. Biol.* 9, 85-88.
- Wöstten, H.A.B., Wessels, J.G.H. 1997. Hydrophobins from molecular structure to multiple functions in fungal development. *Mycoscience* 38, 363-367.

Yelton, M.M., Hamer, J.E., Timberlake, W.E. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. Proc. Natl. Acad. of Sci. U.S.A. 81, 1470-1474.

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., Barlet, D.P. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101, 25-33.

## **9. ANEXOS**

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada Silenciamento Gênico por RNAi em *Moniliophthora perniciosa*

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

( X ) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança\*:  
Comissão Interna de Biossegurança da Universidade Estadual de Santa Cruz, sob Protocolo(s) nº 006/2005.

*\* Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: Ana Cristina Caribé dos Santos



Orientador: Michel Georges Albert Vincentz

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido



Nome:

Função:

Prof. Dra. HELENA COUTINHO F. DE OLIVEIRA  
Presidente  
Comissão Interna de Biossegurança  
CIBio/IB - UNICAMP



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
UESC  
Comissão Interna de Biossegurança**

**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o projeto de tese intitulado "SILENCIAMENTO GÊNICO por RNAi em *Moniliophthora perniciosa*" cujo responsável é **ANA CRISTINA CARIBÉ DOS SANTOS** foi desenvolvido com aprovação da Comissão Interna de Biossegurança nesta instituição e recebeu o seguinte registro na CIBIO/UESC 006/2005.

Ilhéus, 11 de janeiro de 2010

  
Dr. Martin Brendel

Presidente da CIBIO/UESC

*Dr. Martin Brendel*  
Comissão Interna de Biossegurança  
Presidente - CIBIO / UESC