UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Maria Lucila Hernández Macedo

IDENTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS DE Ceriporiopsis subvermispora EXPRESSOS NAS FASES INICIAIS DA BIODEGRADAÇÃO DA MADEIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular .

Orientadora: Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Co-Orientadora: Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni

Campinas, 2006

UNIDADE <u>BC</u> Nº CHAMADA <u>THINICAMP</u> <u>M151</u> V <u>EX</u> TOMBO BC/ <u>70665</u> PROC. <u>16. P.00123-06</u> C <u>B</u> PREÇO <u>H.00</u> DATA <u>2114106</u> BIB-ID <u>391496</u>

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M151i	Macedo, Maria Lucila Hernández Identificação de transcritos de Ceriporiopis subvermispora expressos nas fases iniciais da biodegradação da madeira / Maria Lucila Hernández Macedo Campinas, SP: [s.n.], 2006.
	Orientadora: Maricilda Palandi de Mello. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Biodegradação. 2. Lignina. 3. Expressão gênica. Fungos. I. Mello, Maricilda Palandi de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Identification of transcripts of Ceriporiosis subvermispora expressed during initial phases of wood biodegradation.

Palavras-chave em inglês: Biodegradation; Lignin; Gene expression; Fungi.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutual.

Banca examinadora: Maricilda Palandi de Mello, Marcela de Araújo, Márcio José da Silva, Edi Lúcia Sartorato, Edmilson Ricardo Gonçalves.

Data da defesa: 25/08/2006.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutual.

Campinas, 25 de Agosto de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello (Orientadora)

Assinatura

Profa. Dra. Edi Lúcia Sartorato

Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves

Prof. Dr. Márcio José da Silva

Profa. Dra. Marcela de Araújo

Prof. Dr. Juan Lucas Argueso Gomes de Almeida

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel

Assinatura

Assinatura

Assinatura Mo rulo Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Dedico este trabalho a minha família recém formada Elcio e João Ignácio que dão novo ânimo à minha vida e aos meus pais e irmãos pelo amor e incentivo.

MEUS AGRADECIMENTOS

À Profa. Maricilda, pela orientação, amizade, compreensão e carinho durante estes vários anos de convívio.

À Profa. Laura pela co-orientação e amizade.

Aos professores componentes da banca e pré-banca Dra. Edi Sartorato, Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves, Dra. Marecela de Araújo, e Dr. Márcio José da Silva e Dr. Gonçalo Guimarães pelas sugestões e críticas deste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Ribeiro pela disposição e ajuda na técnica de PCR quantitativo em tempo real.

Aos amigos de Lorena, Jussara, Zé Moreira e Vanessa pelo acolhimento e ajuda no desenvolvimento de alguns experimentos na FAENQUIL.

Aos amigos da "velha guarda" do CBMEG Marcela, Juliana, Daniela, Eliana e Ed pelos inúmeros bons momentos compartidos.

Aos amigos do Lab. Madalena, Aparecida (Cidinha), Fernanda Soardi, Fernanda Coeli, Fabiana, Camila, Márcia, Renan, Luiz Eduardo e todos os colegas pela cooperação e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da CVX Flavia, Andrés, Sakai, Alessandro, Érika, Cleo, Patrícia e Analí por sempre poder contar com eles nas horas de maior dificuldade.

Ao Pe. Toninho, pela amizade, carinho e zelo com minha família.

Ao meu super marido Elcio pelo seu grande amor, dedicação, paciência e incentivo para seguir em frente e ao meu filinho João Ignácio que sem saber me dá forças para continuar e planejar novos projetos na minha vida.

Aos meus queridos pais, Tito e Maria pelo seu apoio incondicional, assim como aos meus queridos irmãos Sonia e Miguel pelo seu amor e apoio.

A CAPES, meus pais e marido pelo apóio financeiro.

A Deus que me deu tudo e todos que fazem parte da minha vida.

ABREVIATURAS

%- Porcentagem **oC-** Graus Celsius Atm- Atmosfera ATP- adenosina 5'-trifosfato BLAST- Basic Local Alignment Search Tool **BSA-** Albumina Soro Bovina Da- Daltons dATP- Deoxiadenosina 5'-trifosfato dCTP- Deoxicitidina 5'-trifosfato dGTP- Deoxiguanidina 5'-trifosfato DD- Differential display DDRT- PCR- Differential Display Reverse Transcription-PCR DEPC- Dietilpirocarbonato Dnase- Desoxiribonuclease dNTP- Deoxiribonucleosídeo trifosfato **DTT-** Ditiotreitol EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético GTP- Guanosina 5'-trifosfato h- Hora HDTMA- Hexadecyltrimethyl-ammonium bromide HPLC- High Performance Liquid Chromatography Kb- quiloilobases KDa- quiloilodaltons LiP-Lignina Peroxidase LMMCs- Low molecular mass compounds M- Molar mA- Miliamperes ME-Extrato de malte

MEA- Extrato de malte-ágar

- µCi- Microcurie
- µg- Micrograma
- µL- Microlitros
- µM- Micromolar
- mg- Miligramas
- min- Minutos
- mL- Mililitro
- mM- Milimolar
- MnP- Manganês Peroxidase
- MOPS- 3-(N-Morpholino)ropanesulfonic Acid
- MW- Molecular Weight
- nm- Nanômetro
- pb- pares de base
- PCR- Polymerase Chain Reaction
- pH- Concentração de íons de hidrogênio, logaritmo negativo
- pI- Ponto Isoelétrico
- PMSF- Phenylmethylsulfonyl Fluoride
- Quantitative RT PCR- Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
- RNase- Ribonuclease
- rpm- Rotações por minuto
- s- Segundos
- SDS- Dodecil Sulfato de Sódio
- Tris- Tris (hidroximetil) Aminometano
- UDG- Uracil-DNA Glicosilase
- U- Unidade
- V- Volt
- v/v- volume/volume
- W- Watt

SUMÁRIO

RESUMO	12
SUMMARY	14
INTRODUÇÃO	. 15
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	.19
Composição da madeira	.19
Enzimas envolvidas na degradação da madeira	20
Fungos degradadores de madeira	.22
Ceriporiopsis subvermispora	.23
Regulação dos genes que codificam as enzimas extracelulares	.25
OBJETIVOS	.27
MATERIAL E MÉTODOS	.28
1. Material Biológico	.28
2. Cultura do fungo	.28
3. Dosagem do ergosterol para a curva de crescimento	.29
4. Isolamento de RNA	.30
4.1 Fungos crescidos em madeira	30
4.2 Fungos crescidos em meio líquido	.31
5. Isolamento de fragmentos com expressão diferencial através de Display de RNA	32
5.1. Síntese de cDNA e Amplificação por PCR	32
5.2. Visualização do fingerprint de cDNA	.33
5.3. Isolamento e re-amplificação das bandas diferenciais	.33
6. Clonagem dos fragmentos diferenciais	.34
7. Mini preparação de plasmídio e confirmação da inserção do fragmento	.35
8. Preparação dos plasmídios selecionados para seqüenciamento	.35
9. <i>Northern blot</i> e hibridização	.36
10. Confirmação da expressão diferencial por <i>Slot blot</i>	37
11. RT-PCR quantitativo em tempo real	38
12. Confirmação da expressão diferencial por <i>PCR</i> quantitativo em tempo real	.40

RESULTADOS E DISCUSÃO41
1.Curva de crescimento41
2. Padronização da extração de RNA total de C. subvermispora crescido em cavacos de P.
taeda e E. grandis43
3. Isolamento de fragmentos com expressão diferencial de C. subvermispora através de
Display diferencial
4. Isolamento e re-amplificação das bandas diferenciais45
5. Clonagem dos fragmentos diferenciais
6. Analise das seqüências dos fragmentos diferenciais
7. Confirmação da expressão diferencial
a) Northern blot e Slot blot61
b) Análise da expressão diferencial dos fragmentos pela técnica RT-PCR
quantitativo61
b.1) Expressão de Oxalato Oxidase61
b.2) Expressão de Celobioidrolase64
b.3) Expressão de manganês superóxido dismutase65
CONCLUSÕES
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS70
ANEXO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1- Principais unidades aromáticas presentes na molécula de lignina.....20
- Figura 2- Teor de ergosterol de *Ceriporipsis subvermispora* crescido em madeiras de *P.taeda* e *E. grandis* nos períodos de 5 a 60 dias de cultivo......42

RESUMO

Ceriporiopsis subvermispora é um basidiomiceto classificado como *white-rot*, que apresenta alta seletividade de degradação da lignina quando crescido em madeira. De maneira geral, existem três tipos de enzimas lignolíticas: manganês peroxidases (MnP), lignina peroxidases (LiP) e lacases. Estas enzimas atuam degradando estruturas fenólicas e não fenólicas da lignina. Até o momento, acredita-se que o sistema ligninolítico do fungo *C. subvermispora* seja composto por isoenzimas da família MnP e de lacases, pelo fato da atividade de LiPs não ter sido identificada, embora possua genes desta classe de enzimas. Diferentes estudos têm sido conduzidos como sistemas modelo de ligninólise, com diferentes linhagens de *C. subvermispora* e outros fungos *white-rot* visando uma possível aplicação da ligninólise biológica na biopolpação e na indústria de papel.

Apesar da importância promissora do fungo *C. subvermispora* na aplicação industrial, o metabolismo celular e o sistema extracelular que esse organismo utiliza para decompor a madeira ainda não estão bem esclarecidos. Embora os estudos de atividades de enzimas extracelulares e de seus produtos gerem muitas informações a respeito dos mecanismos de ação de fungos lignolíticos, há necessidade de se integrar a estas informações resultados de expressão gênica durante o processo de biodegradação. Com isto este trabalho tem como objetivo contribuir com estudos moleculares do fungo durante a decomposição das madeiras de *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis* em pontos selecionados durante o período de 5 a 60 dias de crescimento.

Para a caracterização de genes, foram obtidos mRNAs de cada estágio de crescimento e submetidos às técnicas de RT-PCR e *Display* Diferencial. Foram utilizados dois *primers* ancoradores T12NC e T12NG, assim como três *primers* aleatórios (OPJ01, OPJ04, OPJ10). Noventa e um fragmentos diferenciais foram visualizados em autorradiografias de géis de onde foram isolados, clonados e seqüenciados. As seqüências obtidas foram submetidas à analise por comparação de homologias em bancos de dados utilizando o programa BLASTX versão 2.2.14 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Para a confirmação da expressão diferencial das seqüências com similaridade a proteínas envolvidas na degradação da madeira, foi utilizada a metodologia de PCR em tempo real.

Três genes relacionados no processo de biodegradação foram encontrados, oxalato oxidase, celobioidrolase e manganês super oxido desmutase. Oxalato esta envolvido na produção de peróxido de hidrogênio que é utilizado como co-substrato para a ação de MnP. O radical superóxido desmutase reduz Mn⁺², também originando peróxido de hidrogênio que atua na formação de Mn⁺³ capaz de oxidar compostos fenólicos e não fenólicos dos componentes da lignina. Já a celobioidrolase esta envolvida na clivagem da cadéia terminal de polissacarídeos que compõem a celulose.

O padrão de expressão observada por RT-PCR quantitativo mostrou que os genes de oxalato e superóxido desmutase foram altamente expressos durante os primeiros 15 dias de cultivo na madeira de *P. taeda* e nos períodos de 40 a 60 dias em *E. grandis*. Já a celobioidrolase apresentou maior expressão no décimo dia de cultivo nas duas madeiras. De modo geral estes resultados correlacionam-se a análise da atividade enzimática dos extratos de cultura do fungo em *P. taeda* e *E. grandis*.

SUMMARY

Lignin is a heterogeneous and highly cross-linked macromolecule that is particularly resistant to biological degradation but some specialized fungi developed the ability to degrade this complex molecule. Most of these fungi belong to the basidiomycetes and are responsible for the white-rot decay process. One of them, *Ceriporiopsis subvermispora*, has been extensively studied due to its potential applicability in industrial processes.

Ceriporiopsis subvermispora is a white-rot fungus that shows high selectivity towards lignin degradation through a mechanism composed mainly by maganese-dependent peroxidase (MnP) and lacase. Both activities are secreted as isoenzyme families, with isoelectrofocusing patterns that vary according to the composition of the growth media. Although the industrial applicability of this fungus has been recognized, its biochemical and molecular lignolytic processes are not completely understood.

The present study provides additional data for evaluating the molecular processes involving the first steps of wood biodegradation by *C. subvermispora* cultivated in *Pinus taeda* and *Eucalyptus grandis* for periods ranging from 5 to 60 days. Using the differential display reverse transcription PCR technique (DDRT-PCR), a total of 91 differentially expressed cDNA fragments were identified by comparing band intensities among fingerprints obtained with mRNA from cultivated mycelia. Sixty-one differential fragments were sequenced and identified by alignment analysis with GenBank sequences using the BLASTX function.

Three genes oxalate oxidase, manganese superoxide desmutase and cellobiohydrolase, derivates from biodegradation by *C. subvermispora* on *Pinus taeda* wood chips culture, were analysed and compared the expression in *Eucalyptus grandis* culture. Oxalate and superoxide dismutase genes were expressed during the first growth period (to 15 days) in *P. taeda* culture and 40-60 days in *E. grandis* wood. On the other hand cellobiohydrolase gene showed high expression at 10 day culture in both wood. This results are correlate with *C. subvermispora* enzymatic activities during biopulping of *P. taeda* e *E. grandis*.

INTRODUÇÃO

A lignina é um biopolímero aromático complexo, um componente abundante e essencial no tecido da madeira ao qual se deve sua rigidez. É extremamente resistente à degradação pela maioria dos microorganismos, no entanto uma estreita gama de organismos mostra-se eficiente na sua degradação, entre eles encontram-se os fungos de degradação branca ou podridão branca como *Ceriporiopsis subvermispora* que são capazes de degradar a lignina a CO_2 e água numa intensidade e velocidade muito maior que qualquer outro grupo de organismos (Kirk e Cullen, 1998).

Fungos de podridão branca realizam biodegradação seletiva da lignina na parede celular, deixando a celulose praticamente intacta (Blanchette, 1991; Blanchette *et al.*, 1994). A biodegradação de madeira por esses fungos é atribuída à ação de uma série de enzimas, dentre elas as ligninas peroxidases, as manganês peroxidases e as lacases, bem como à compostos extracelulares de baixa massa molar (Messner *et al.*, 2003). No ano 1983, dois grupos relataram a descoberta de uma enzima extracelular degradadora de lignina em culturas do fungo de degradação branca *Phanerochaete chrysosporium* (Glend *et al.*, 1983; Tien e Kirk, 1983). Esta enzima, hoje denominada lignina peroxidase (LiP) é uma glicoproteína, que contém ferroprotoporfirina como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica (Gold e Alic, 1993). Estudos subseqüentes revelaram que a LiP de *P. chrysosporium* apresenta múltiplas formas com pIs que variam entre 3,2-4,7 e massas moleculares entre 38-43 kDa dependendo do tipo de cepa e das condições de cultura (Gold *et al.*, 1989). As LiPs na presença de peróxido de hidrogênio são capazes de degradar compostos fenólicos e não fenólicos, assim como anéis aromáticos encontrados nas moléculas de lignina (Dezotti *et al.*, 1995).

Além das LiPs, as manganês peroxidases (MnPs), descobertas em *P. chrysosporium*, representam outra classe de enzimas envolvida na decomposição de lignina (Glen *et al.*, 1986). Estas enzimas apresentam um grupo prostético heme no sítio ativo e massas moleculares que variam entre 45 - 47 kDa. São glicosiladas e apresentam ação extracelular (Gold *et al.*, 1989). Embora o ciclo catalítico das MnPs seja similar ao das LiPs, além de

ser dependente de peróxido de hidrogênio requerem Mn^{+2} para ativar sua ação (Escutia *et al.*, 2005; Poulus *et al.*, 1995; Merslen *et al.*, 1995).

O terceiro grupo de enzimas importante para a degradação da madeira é o das lacases que têm características de fenoloxidase e são produzidas por fungos e plantas (Baldrian, 2006). As lacases pertencem ao grupo das oxidases que complexam cobre, apresentam massas molares que variam entre 60-100 kDa e são sintetizadas pela maioria dos basidiomicetos (Collins e Dobson, 1997).

A degradação microbiana de lignina exerce um papel essencial na ciclagem do carbono e a função dos microorganismos, que são em sua maioria os fungos, é fundamental para as biotecnologias emergentes tal como a polpagem biomecânica, o branqueamento enzimático de polpas e a degradação de poluentes orgânicos (Whiteley e Lee, 2006; Bajpai *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2004; Mardones *et al.*, 2006).

Dada à complexidade e à heterogeneidade da molécula de lignina, desde os primeiros trabalhos que estudaram sua degradação por microorganismos, se propôs que deva existir um mecanismo extracelular oxidativo e, relativamente inespecífico. Na verdade, apesar dos muitos trabalhos para se entender os mecanismos de reação das ligninas peroxidases (LiPs), há poucas evidências de que elas possam realmente quebrar a lignina polimérica por ação direta (Haemmerli *et al.*, 1986; Odier *et al.*, 1988; Sarkanen *et al.*, 1991, Aguiar *et al.*, 2006). Uma das primeiras questões que se levantou contra a ação direta de enzimas foi quanto ao tamanho dos poros da madeira que não permitiria a difusão das LiPs (Carpita *et al.*, 1979; Tepfer e Taylor, 1981; Flournoy *et al.*, 1991). Em trabalho bastante esclarecedor, Blanchete *et al.* (1997) demonstraram que *Ceriporiopsis subvermispora* (um dos fungos já descritos mais seletivos para a degradação de lignina) causa alterações estruturais significativas na lignina presente na parede celular e na lamela média, mesmo antes da parede celular vegetal ser permeável a proteínas pequenas como as do tamanho da insulina (5730 Da).

Dessa forma, vários trabalhos têm proposto que alguns compostos de baixa massa molar poderiam atuar nos estágios iniciais da biodegradação da madeira (Blanchete *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 2000; Aguiar *et al.*, 2006). Esses compostos deveriam apresentar atividade degradativa, mas serem pequenos o suficiente para penetrar no complexo celular vegetal, degradar os componentes aí existentes e com isso desestruturar a parede celular a ponto de permitir a penetração de enzimas oxidativas e hidrolíticas. Isto sugere que a biodegradação da matriz lignocelulósica da madeira não seja um processo simples envolvendo atividades enzimáticas únicas, reforçando a tese de que esse processo deva ser resultado de uma ação conjunta entre enzimas e compostos de baixa massa molecular (Paszczynski *et al.* 1988; Daniel, 1994)

Fungos de decomposição ou podridão branca "white-rot fungi", que degradam todos os componentes da madeira e os de decomposição ou podridão castanha "brown-rot fungi", que degradam principalmente polissacarídeos, são os organismos mais efetivos na biodegradação de madeira na natureza. A grande maioria destes microorganismos pertence à Divisão Basidiomycota. Já fungos de decomposição branda "soft-rot fungi", que podem degradar lignina e carboidratos, porém em velocidades muito baixas pertencem à Divisão Ascomycota e Deuteromycota (Kirk e Cullen, 1998; Rodríguez *et al.*, 1997; Ferraz *et al.*, 1991; 1995).

O gênero *Ceriporiopsis* pertence à família Polyporaceae (Harold, 1998). Esse gênero é conhecido por sua seletividade para a degradação de lignina quer em madeiras duras ou em madeiras moles (Akthar *et al.*, 1998). Sua extrema agressividade para a colonização da madeira lhe permite grande capacidade de se estabelecer em sistemas não completamente estéreis (Scott *et al.*, 1998) e sua eficiência em causar o efeito de "amolecimento" da matriz lignocelulósica forma a base da polpação biomecânica. Essas características tornam fungos deste gênero promissores para utilização no processo de biopolpação (Akhtar *et al.*, 1998).

Embora os estudos de atividades de enzimas extracelulares e de seus produtos gerem muitas informações a respeito dos mecanismos de ação de fungos ligninolíticos, há necessidade de se integrar estas informações com a expressão de genes, incluindo os mecanismos de regulação da expressão gênica. Nesse sentido a Genética Molecular deve contribuir significativamente. No entanto, poucos genes de *C. subvermispora* foram isolados e caracterizados. No banco de seqüências nucleotídicas mantido pelo National Center for Biotechnology Information do National Institute of Health nos Estados Unidos estão depositadas apenas 24 seqüências protéicas. Dentre estas, 4 são seqüências de genes

que codificam MnP (*Cs-mnp1*, *Cs-mnp2A*, *Cs-mnp2B e Cs-mnp3*), *Cs-mnp2A* e *Cs-mnp2B* correspondem a alelos do mesmo gene (Polanco *et al.*, 2002; Lobos *et al.*, 1998; Tello *et al.*, 2000), 2 correspondem a seqüências homólogas às LiPs (Rajakumar *et al.*, 1996) e uma codifica uma lacase (Karahanian *et al.*, 1998), 7 genes que codificam subunidades de RNA ribossomal (Hibbett e Donoghue 2001), 4 que codificam oxalato oxidase (Escutia *et al.*, 2005).

Este trabalho tem como objetivo contribuir com estudos da expressão gênica do fungo durante a decomposição natural das madeiras de *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis* em períodos diferentes de crescimento. A partir da caracterização de genes específicos de cada estágio de cultivo, correlacionar sua expressão com as informações geradas pelos recentes estudos de identificação química de compostos produzidos no processo da degradação de madeira.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Composição da madeira

Do ponto de vista das indústrias madeireiras e papeleiras, as espécies arbóreas dos bosques classificam-se em duras e moles. Na literatura internacional as Gimnospermas são designadas como madeiras moles (*softwoods*), algumas classes de Coníferas, como o *Pinus elliottii*, o *Pinus taeda*, o *Pinus oocarpa* e algumas variedades do *Pinus caribaea* têm sido muito usadas nas industrias de papel. Já entre as Angiospermas distinguem-se as Dicotiledôneas, usualmente designadas como madeiras duras (*hardwoods*), destacando-se na indústria de papel algumas espécies como *Eucalyptus grandis, Eucalyptus saligna, Eucalyptus citriodora, Eucalyptus paniculata, Eucalyptus tereticornis, Eucalyptus dunii, Eucalyptus microcorys, Eucalyptus urophylla e Eucalyptus deglupta.*

A madeira é um composto polimérico cujas propriedades técnicas e biológicas são principalmente determinadas pela composição química da parede celular. A parede celular da madeira é constituída por longos biopolímeros de celulose, hemicelulose e lignina. A forte tensão das fibras da madeira é determinada principalmente pela celulose e hemicelulose, enquanto que a lignina media a adesão entre as fibras (Mai *et al.*, 2004; Aro *et al.*, 2005).

A celulose, o principal componente das madeiras tanto moles como duras, apresenta-se em forma de polímeros lineares de alto peso molecular, constituído por ligações β ·1,4 de unidades de D-glicose que formam cadeias poliméricas lineares de 8.000-12.000 unidades de glicose. Na forma cristalina, a celulose é constituída por cadeias poliméricas ligadas entre si por pontes de hidrogênio formando uma estrutura altamente insolúvel.

Já a hemicelulose, tem composição heterogênea de várias unidades de açúcar mais curtas que a celulose e, geralmente, monossacarídeos e grupos acetila encontram-se ramificados na sua estrutura. Os constituintes das hemiceluloses são as hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) (Aro *et al.*, 2005).

A lignina é um polímero tridimensional de unidades de fenilpropanóides que são polimerizadas oxidativamente por peroxidases e fenoloxidases durante a sua biossíntese. Outras unidades como fenilcumarana (β -5), resinol (β - β) e dibenzodioxina (5-5/ β -O-4, α -O-4) podem também estar presentes na sua composição. Normalmente, a parede celular das madeiras contém de 20 a 30% de lignina (Guerra *et al.*, 2004; Mai *et al.*, 2004).

Outros componentes como compostos fenólicos, terpenos, carboidratos, gorduras e ceras também conferem propriedades específicas às madeiras (Fengel e Wegener 1984).

Em madeiras duras, ou angiospermas, a lignina é formada principalmente de unidades Guaiacila e Siringila. Já as madeiras moles, ou gimnospermas, possuem ligninas formadas fundamentalmente de unidades de Guaicila. Ligninas de gramíneas compreendem unidades Guaiacila-Siringila-Hidroxifenila (**fig. 1**).



Figura 1: Principais unidades aromáticas presentes na molécula de lignina.

Enzimas envolvidas na degradação da madeira

O mecanismo enzimático da degradação da madeira por fungos é bem estudado. A hidrólise da celulose é realizada por endoglucanases e celobioidrolases, ambas denominadas celulases. A hidrólise da hemicelulose acontece pela ação das xilanases, manases e outras enzimas hidrolíticas de substrato específico. A mineralização da lignina é realizada por peroxidases, lignina peroxidase, manganês dependente de peroxidase, polifenoloxidase e lacase (Bucher *et al.*, 2004).

Celulases:

A hidrólise completa da celulose a glicose requer a combinação de enzimas múltiplas com diferentes especificidades frente aos substratos. Por exemplo, a celobioidrolase cliva as unidades de celobiose a partir de seus terminais para produção de cadeias de polissacarídeos. As endoglucanases clivam a internamente as cadeias de celulose fornecendo maior número de terminais para a ação da celobioidrolase. Já a β -glicosidase hidrolisa a celubiose a glicose (Aro *et al.*, 2005).

Hemicelulases:

A hidrólise da hemicelulose acontece pela ação coordenada de endoenzimas, que clivam internamente a cadeia principal, de exo-enzimas, que liberam açúcares monoméricos e, de enzimas auxiliares que clivam as cadeias laterais dos polímeros ou oligossacarídeos levando à produção de mono ou dissacarídeos dependendo do tipo de hemicelulose (Aro *et al.*, 2005).

Ligninases:

A degradação da lignina é um pré-requisito para a hidrolise da celulose e da hemicelulose como fonte de energia para os fungos. A lignina é pouco degradada por microrganismos capazes de degradar celulose, porém basidiomicetos de degradação branca são capazes de despolimerizar e mineralizar a lignina eficientemente. As principais enzimas lignolíticas produzidas por fungos são a manganês peroxidases, lignina peroxidases, que catalisam uma variedade de reações oxidativas dependentes de H_2O_2 e as lacases que oxidam compostos fenólicos e reduzem o oxigênio molecular a água. Entre outras enzimas extracelulares que geram peróxido de hidrogênio estão a glioxal oxidase e glicose-2-oxidase. Os peróxidos gerados por estas enzimas têm um papel essencial nos processos de deslignificação (Aro *et al.*, 2005).

Fungos degradadores de madeira

Os fungos são microrganismos produtores de sistemas enzimáticos complexos capazes de degradar substâncias químicas de estruturas complexas como as que compõem a madeira, de maneira a produzir moléculas mais simples e mais facilmente assimiláveis. Estas características incentivaram o interesse de aplicar a biotecnologia em produtos da floresta focando a exploração de basidiomicetos degradadores de madeira e suas enzimas extracelulares. Em função dos mecanismos de degradação, estes fungos podem ser divididos em dois grupos: de decomposição ou podridão branca (*White rot*) e de decomposição ou podridão castanha (*Brow rot*) (Hammel, 1996). O primeiro grupo, tem capacidade de degradar simultaneamente os componentes da parede celular a lignina, hemicelulose e celulose e, em estágios avançados de degradação, produzindo celulose branca. Este tipo de fungo está associado principalmente à degradação de madeiras duras. O segundo grupo, esta associado à degradação de madeiras moles e apresenta capacidade de despolimerizar os polissacarídeos da parede celular a hemicelulose e celulose, enquanto que a lignina é pouco degradada apesar de sofrer modificações químicas como desmetilação e oxidação (Alexopoulus *et al.*, 1996).

Fungos de decomposição branca podem ser divididos em dois tipos, os que estão envolvidos na decomposição de todos os componentes da madeira simultaneamente, neste caso a degradação ocorre pela formação de erosão e pelo afinamento progressivo da parede celular devido às múltiplas enzimas que atuam na superfície exposta da madeira. O segundo tipo de fungos de decomposição branca são aqueles que degradam lignina de forma seletiva, neste caso são poucas espécies que pertencem a este grupo. Estes fungos removem a lignina e polioses da madeira sem que ocorra afinamento progressivo da parede celular e a degradação ocorre após longos períodos, o que indica que não pode ser causado por ação direta das enzimas na parede celular já que estas têm aproximadamente 40 kDa e a parede celular da madeira seria inacessível a elas. Estudos recentes mostraram que moléculas de baixo peso molecular (*LMMCs*) estariam envolvidas no início da degradação como ocorre em fungos de degradação marrom (Aguiar *et al.*, 2006).

Geralmente, durante o processo de degradação da madeira por fungos de decomposição branca, a lignina é atacada inicialmente por uma fenoloxidase extracelular (Lacases) e uma peroxidase (lignina peroxidases e manganês peroxidases) (Orth e Tien 1995). As peroxidases utilizam peróxido de hidrogênio como co-substrato enquanto que as lacases requerem oxigênio molecular como receptor de elétrons (Ericksson *et al.*, 1990). Fungos de degradação castanha são capazes de degradar celulose e hemicelulose sem a remoção da lignina. A celulose cristalina é atacada inicialmente por radicais hidroxi (sistemas Fe²⁺/ H₂O₂). Propõe-se que moléculas fenólicas de baixo peso molecular queladoras de ferro e que produzem radiacias hidroxila estejam relacionadas diretamente na degradação da celulose (Kapich *et al*, 2005).

Ceriporiopsis subvermispora

O gênero *Ceriporiopsis* pertence a uma classe de fungos causadores de decomposição branca da família Polyporaceae (Harold, 1998). Esses fungos são conhecidos por sua grande seletividade para a degradação de lignina quer em madeiras duras ou em madeiras moles (Akthar *et al.*, 1998). Sua extrema agressividade para a colonização da madeira lhe permite grande capacidade de se estabelecer em sistemas não completamente estéreis (Scott *et al.*, 1998) e sua grande eficiência em causar o efeito de "amolecimento" da matriz lignocelulósica forma a base da polpação biomecânica. Essas características indicam que até o momento, esse gênero é o mais indicado para o processo de biopolpação.

Apesar da importância de *C. subvermispora* na aplicação industrial, o sistema extracelular que o fungo utiliza para decompor a madeira ainda não está bem esclarecido. As enzimas extracelulares produzidas pelo microorganismo compreendem as lacases e as MnPs. Como em vários basidiomicetos, a expressão dessas enzimas é dependente do substrato (Sethuraman *et al.* 1998). Um fato intrigante nesse aspecto é a não detecção de atividade de lacases em condições de cultivo onde o único substrato orgânico é o próprio material lignocelulósico (Ferraz *et al.*, 2000). Com isso, os autores sugerem que a degradação de lignina por esse fungo deveria, a princípio, ser atribuída exclusivamente à

ação de MnP. A atividade de LiPs também não tem sido detectada nas várias formas de cultivo já estudadas (Lobos *et al.*, 1994; Souza-Cruz *et al.*, 2004).

Em uma série de trabalhos esclarecedores sugerem-se alternativas para explicar o mecanismo bioquímico envolvido no processo de degradação da madeira por *C. subvermispora* (Jenssen *et al.*, 1996; Srebotnik *et al.*, 1997; Kapich *et al.*, 1999; Ferraz et al., 2003; Heidorne et al., 2006; Aguiar 2006). Uma delas seria que este fungo produziria LiP em sistemas de fermentação sólida, mas que a quantificação dessa enzima nos extratos seria mascarada pela presença de contaminantes. Nesse caso, os mecanismos envolvidos seriam os mesmos já reportados para *P. chrysosporium*. Essa hipótese, apesar de remota, não tem sido descartada, pois *C. subvermispora* possui genes semelhantes aos genes responsáveis pela expressão de LiPs em *P. chrysosporium* (Rajakumar *et al.*, 1996).

Enoki *et al.* (1999; 2000) demonstraram que *C. subvermispora* produz os seguintes ácidos graxos quando cultivado em meio sólido contendo madeira moída: ácido 9,12octadecadienóico, ácido 9-octadecenóico, ácido 11-octadecenóico, ácido hexadecanóico e ácido octadecanóico. Esses ácidos foram produzidos principalmente nos estágios iniciais da biodegradação sendo que após 2 semanas de cultivo o teor desses ácidos diminuiu consideravelmente sendo seguido do aparecimento de hidroperóxidos orgânicos. Esses dados levaram os autores a relacionar a formação dos hidroperóxidos orgânicos com a ação de Mn³⁺, oriundo da oxidação de Mn²⁺ por MnP. Foram encontrados novos componentes lipídicos em estágios avançados de degradação de madeira de *Eucalyptus* por *C. subvermispora*, estes componentes foram identificados por espectrometria de massa como sendo um ácido dicarboxílico insaturado que poderia servir como fonte de peroxidação de lipídios durante a degradação por basidiomicetos de decomposição branca (Gutierrez *et al.*, 2002; Blanchete *et al.*, 1997).

Kapich *et al.* (1999) demonstraram que os radicais peroxila oriundos da peroxidação de ácido linoléico por MnP de *C. subvermispora* podem atuar em compostos modelos de lignina não fenólicos, abstraindo um elétron (e um próton) do carbono alfa, levando a uma posterior degradação do composto modelo.

Regulação dos genes que codificam as enzimas extracelulares

A regulação dos genes que codificam as enzimas extracelulares envolvidas na biodegradação é dependente da fonte de carbono disponível no meio. Assim a maioria destes são reprimidos por fontes de carbono de fácil metabolismo como glicose e induzidos na presença de polímeros complexos como a lignina.

Expressão das celulases:

De modo geral a degradação da celulose ocorre pela indução de três tipos de enzimas: endo 1,4- β -**D** -glucanase, exo-1,4- β -**D** -glucanase, e β -glicosidase (ou cellobiase) (Hamada *et al.*, 1999). O sistema de regulação dos genes de celulases tem sido melhor estudado no fungo *Trichoderma reesei*, esse sistema contém cinco genes que codificam endoglucanases, *egl1–egl5*, dois genes que codificam celobioidrolases, *cbh1* e *cbh2* e, dois genes codificantes de β -glicosidase *bgl1* e *bgl2*.

No fungo *T. reesei* a expressão das celulases é controlada no nível transcricional. Na presença de D-glicose a transcrição é reprimida, enquanto que na ausência da mesma e na presença de certos oligossacarídeos ou dissacarídeos (soforose) a transcrição é fortemente induzida. A repressão da transcrição de D-glicose neste fungo é mediada por *Cre1*, o qual media a repressão dos genes que codificam enzimas envolvidas na degradação da hemicelulose (Hasper *et al.*, 2002).

Expressão das hemicelulases:

As hemiceluloses assim como as celuloses são moléculas muito grandes para serem utilizadas como fonte de energia direta para os microorganismos. Assim acredita-se que moléculas intermediárias menores possam ter um papel importante na ativação dos genes das hemicelulases (Aro *et al.*, 2005). A expressão das hemicelulases tem sido estudada principalmente nas espécies *A. nidulans* e *T. reesei*, onde se observou que a presença das hemiceluloses xilana, arabinana e manana, assim como outros componentes derivados

desses açúcares de cadeia longa como galactose e manose, provoca a alta produção de hemicelulases (Margolles-Clark *et al.*, 1997). Porém a possibilidade de que algum sinal extracelular como variação de pH do meio ou mesmo polímeros de cadéia longa possam estar envolvidos na indução das enzimas hemicelulolíticas (Arst et al., 1994).

Expressão das ligninases:

Devido a número de genes homólogos que codificam as enzimas lignolíticas (LiP. MnP e Lacases), estudos da expressão desses genes por métodos tradicionais como *Northern blot* tem encontrado dificuldades para selecionar sondas específicas. Um exemplo disso são estudos realizados em *P. chrysosporium* que tem pelo menos dez genes *lips* (*lipA* a *lipJ*) e três *mnps* (*mnp1* a *mnp3*) (Gaskell *et al.*, 1994; Alic *et al.*, 1997).

Em geral, a expressão de genes ligninolíticos é induzida pela restrição de alguns nutrientes como nitrogênio, carbono ou enxofre, assim a expressão destes genes é visto como resposta ao estresse de nutrientes. Em *P. chrysosporium* a expressão de *mnp* é ativada pela baixa concentração de nitrogênio e pela presença de Mn (II) em cultura. De forma similar aos genes *mnp*, os genes *lip* neste fungo são também diferencialmente regulados de acordo com vários fatores como resposta à falta de nitrogênio e carbono no meio (Stewart *et al.*, 1992; Stewart and Cullen, 1999). Já a expressão de lacases não depende da falta de nutrientes, esses genes são expressos constitutivamente em muitos basidiomicetos (Egger *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

O presente trabalho teve como objetivo principal o isolamento e caracterização de genes expressos durante as primeiras etapas de crescimento do fungo *Ceriporiopsis subvermispora* em cavacos de madeira de *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis* entre 5 e 60 dias de cultivo.

Objetivos específicos:

- Estabelecer critérios para determinar os períodos importantes para a avaliação da expressão diferencial de genes C. Subvermispora (Pil.) Gilbn. & Ryv. em Pinus taeda L. e Eucalyptus grandis W. Hill ex Maiden.
- 2. Realizar géis de *display* diferencial de cDNA para a identificação de transcritos específicos de cada fase de desenvolvimento micelial por meio de:
 - a) Extrações de RNA de micélio crescido em cavacos de madeira;
 - b) Identificação de transcritos expressos diferencialmente em vários pontos distribuídos entre 5 – 60 dias de cultivo;
 - c) Isolamento de bandas específicas através de re-amplificação;
 - d) Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs diferenciais, seguido de um estudo de comparação das seqüências em bancos de dados para investigar a homologia com proteínas conhecidas.
 - e) Confirmação da expressão diferencial dos cDNAs isolados por meio de PCR quantitativo em tempo real.

1. Material Biológico:

O fungo utilizado neste trabalho é o basidiomiceto de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispora SS3* (Pil.) Gilbn. & Ryv. (cepas SS3). Esta linhagem foi obtida da coleção de laboratório do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena. As culturas foram mantidas em placas de Petri com meio contendo 2% de extrato de malte e 2% de agar e cultivados a 28° C e mantidos a 5° C.

As madeiras utilizadas para este trabalho, foram *Pinus taeda* L. e *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden cortadas em cavacos com medidas aproximadas de 3,5x 2,0x 0,3 cm, e fornecidas pelo Parque Nacional de Campos de Jordão.

2. Cultura do fungo:

A partir das placas, onde são mantidos os fungos, foi realizado o cultivo em meio líquido, que foi utilizado tanto como controle como também como pré-inóculo para o cultivo em madeira. Esse meio foi constituído por 2,4% de extrato de batata (DIFCO) e 0,7% de extrato de levedura (DIFCO).

Para o cultivo em madeira, o fungo foi crescido primeiramente em meio líquido durante 10 dias, após este período foi inoculado em madeira de *Pinus taeda* L. e de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. As amostras foram colhidas nos dias 5, 10, 15, 20, 40 e 60 de crescimento.

Com o intuito de inocular a mesma carga de micélios nas culturas em madeira, foi calculada a medida de peso seco do fungo e dos cavacos de madeira. Para isto foi preparada uma suspensão fúngica em meio líquido. Após 10 dias de cultivo, a suspensão foi filtrada e lavada com água estéril em funil de Buchner e, em seguida o filtrado foi homogeneizado e ressuspendido em 100 mL de água estéril e, então macerada. Para se garantir a homogeneidade da suspensão, a amostra foi tratada em homogeneizador estéril com 3

ciclos de 15 segundos. Dessa suspensão foi removida uma alíquota de 25 mL para ser filtrada em papel de filtro pré-seco em estufa a 60° C. O micélio retido no papel foi colocado em pesa-filtro dentro de uma estufa a 60° C por 8 horas em seguida foi medido o peso e colocado a 100° C por 3 horas, até atingir peso constante. A partir do valor do peso obtido após secagem do micélio, foi determinada a quantidade de micélio em suspensão a ser inoculado ao cultivo em madeira.

Para estimar a umidade incorporada à madeira, dado necessário para o cálculo da quantidade de cavacos a serem inoculados, aproximadamente 338 g de cavacos de *E. grandis* e *P. taeda* foram submersos em água por 16 horas. Um cavaco foi retirado e a umidade incorporada foi medida em balança com registro de umidade. Quatro frascos Erlenmeyers de 250 mL foram utilizados para cada período de cultivo (5, 10, 15, 20, 40 e 60 dias) para os dois tipos de madeira. A cada Erlenmeyer foram adicionados 5 g de vermiculita e 20 ml de água para manter a umidade durante o período de cultivo. Os frascos contendo as madeiras foram autoclavados a 1 atm por 15 minutos. Em seguida procedeu-se com a inoculação com a suspensão dos micélios. Aproximadamente 400 mg de micélio seco/kg de madeira foram inoculados e incubados por períodos entre 5 a 60 dias a 27 ^oC. Após estes períodos os cultivos em madeira foram triturados em um moinho de faca (Renard modelo MFC180-75-01) e coletados para a dosagem de ergosterol necessária para a obtenção da curva de crescimento e para a extração do RNA total.

3. Dosagem do ergosterol para a curva de crescimento

Os experimentos para a dosagem de ergosterol foram realizados segundo metodologia descrita por Montgomery *et al.* (2000) com algumas modificações.

Aproximadamente 1 g dos cultivos triturados de cada madeira nos diferentes períodos de crescimento, foi colocado em triplicatas em tubos de ensaio com tampa de rosca. A cada tubo contendo as amostras, foram adicionados 8 mL de metanol e 2 mL de NaOH 2 M, os tubos foram agitados por 15 minutos em vortex e, deixados por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, os tubos foram colocados em forno de microondas doméstico em potência média por 18 segundos, esfriados e agitados por 15

segundos em vortex. As amostras, novamente, foram colocadas em forno de microondas nas condições já citadas, repetindo-se o procedimento anterior. Em seguida 4 mL de HCl 1 M foram adicionados aos tubos que foram agitados por 15 segundos, em seguida foram adicionados 2 ml de metanol e, agitados novamente. Oito mL de hexano foram adicionados aos tubos que foram agitados por 15 segundos, a fase superior foi colhida em tubos limpos. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Ao final, a fase superior foi colocada em frascos para análise em cromatografia líquida (HPLC), e o solvente foi eliminado sob fluxo de nitrogênio.

As amostras foram analisadas no aparelho de HPLC SPD-10AV UV-Visível Detector Shimadzu / SCL- 10^{A} System Controller. O comprimento de onda utilizado foi de 282 λ e o fluxo de 1 mL/m. Soluções de ergosterol com diferentes concentrações (1 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L; 20 mg/L) foram utilizadas como padrão para a quantificação do ergosterol das amostras.

4. Isolamento de RNA:

4.1 Fungos crescidos em madeira:

A partir dos micélios obtidos no crescimento em cavacos de *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis*, foram realizadas extrações de RNA utilizando o método descrito por Sokolovsky *et al.* 1995.

Os cavacos com micélios crescidos nos diferentes períodos de cultivo foram triturados junto com gelo seco em moinho de faca (Renard modelo MFC180-75-01) e macerados em nitrogênio líquido até apresentar a consistência de um pó relativamente fino. Em um tubo Falcon foram colocados 5 g do micélio macerado e 15 mL de tampão de lise constituído por 0,6 M de NaCl, 10 mM de EDTA, 100 mM de Tris-HCl pH 8.0 e 4 % de SDS. Este material foi centrifugado a 2.300 rpm por 10 minutos em uma centrífuga Beckman GPR. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Miracloth e subdividido em tubos de 2 mL. Em seguida adicionou-se igual volume de fenol equilibrado a pH 7.9 (1 mL de sobrenadante: 1 mL de fenol), estes tubos contendo o material foram colocados em um shaker a 230 rpm por 15 minutos e em seguida foram centrifugados por 10 minutos a

12.000 rpm em uma microcentrífuga. A fase aquosa foi coletada à qual se adicionou igual volume de fenol, as amostras foram vortexadas e centrifugadas nas mesmas condições já citadas. A fase aquosa novamente foi coletada e precipitada com 0,75x o seu volume de LiCl 8 M a -20 °C por 12 horas.

Após este período os tubos foram vortexados e centrifugados 15 minutos a 12.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e os "pellets" foram lavados com etanol 70 % gelado. Centrifugou-se novamente e, agora, o "pellet" foi lavado com etanol absoluto. Este foi secado ao ar por uma hora, mas mantido em gelo e, logo em seguida foi ressuspendido em 50 μ L de água tratada com DEPC para ser estocado a –70 °C.

4.2 Fungos crescidos em meio líquido:

A partir dos micélios crescidos em meio líquido (2,4% de extrato de batata e 0,7% de extrato de levedura) foram feitas extrações de RNA utilizadas como controle. Para a extração foi utilizando o kit *Perfect RNA, Eucaryotic, Mini* (Eppendorf, Scientific Inc.) seguindo as especificações do fabricante.

Todas as amostras extraídas foram tratadas com DNase da seguinte maneira: aos tubos contendo 50 μ L de RNA total, foram adicionados 0,31 μ L de RNA guard (40 U/ μ L), 15 μ L de DNase mix, 0,2 μ L de DNase (147 U/ μ L). As amostras foram incubadas a 37 0 C por 2 horas e, em seguida foram adicionados 65,5 μ L de água-DEPC e 120 μ L de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico 25:24:1 V/V. Centrifugou-se por 3 minutos a 12.000 rpm, adicionou-se 12 μ L de acetato de sódio e 288 μ L de etanol absoluto e se precipitou por 12 horas a –20 0 C.

Após este período de precipitação, os tubos contendo as amostras foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm, os "pellets" formados foram lavados 1 vez com etanol 70% e 1 vez com etanol absoluto, em seguida foram secados a vácuo. Em seguida foram ressuspendidos em 15 μ L de água-DEPC e estocados a – 70 °C.

Todas as amostras de RNA extraídas foram analisadas em gel 0,5 % de agarose composto por 0,5 g de agarose, 5 mL de MOPS 10X, 2,5 mL de formaldeído 37 %, 42,5 mL de água-DEPC.

5. Isolamento de fragmentos com expressão diferencial através de *Display* de RNA:

Os experimentos de *display* de RNA foram realizados segundo metodologia descrita por Welsh *et al.* (1992) e Wong & McClelland (1994). Este método, também conhecido como DDRT-PCR (*Differential Display Revers Transcription-Polymerase Chain Reaction*), baseia-se na síntese de cDNA a partir de RNA total ou mRNAs expressos em situações diferenciais a serem comparadas, e na amplificação por PCR utilizando *primers* arbitrários (randômicos) e oligos (d)T. Os padrões gerados são comparados através da corrida das reações de amplificação lado a lado em gel de poliacrilamida. Desta forma, é possível a detecção de diferenças no padrão de expressão gênica entre duas ou mais condições. Os transcritos expressos diferencialmente podem ser excisados do gel, eluídos, reamplificados, clonados e seqüenciados.

5.1. Síntese de cDNA e Amplificação por PCR

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi utilizado o kit Ready-to-GoTM RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech.), segundo instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos ancoradores utilizados foram do tipo T12N (Gibco BRL) sendo N = G ou T . As amplificações dos cDNAs foram realizadas em termociclador (Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems). Foram utilizados oligos ancoradores (T12N) e oligos arbitrários da marca OPERON (OPJ01, OPJ04, OPJ10). As reações foram feitas em duplicatas e constituídas por: 2 μ L de cDNA (1 μ g/ μ L); 2 μ L do primer ancorador (10 μ M); 2 μ L do primer arbitrário (10 μ M); 8 μ L de água bidestilada; 2 μ L de tampão de amplificação 10x (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4; KCl 50 mM, Invitrogen); 0,5 μ L de MgCl₂ 50 mM; 2 μ L de dNTPs 20 μ M; 1 μ L de a-³³P-dATP 5 μ Ci e Taq DNA polimerase (Invitrogem) 0,5 μ L (5 U/ μ L). As condições de amplificação foram: 94°C (4 min), seguido de 40 ciclos de 94°C (30 s), 40°C (2 min) e 72°C (30 s).

5.2. Visualização do fingerprint de cDNA:

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 4,8% contendo uréia a 41,25 %. O gel foi constituído por 10,2 mL de acrilamidabisacrilamida (40:2); 16 mL de TBE 5X e 33 g de uréia para um volume final de 80 mL. Esta solução foi filtrada com filtro Nalgene de 0,45 μ m à qual foram adicionados 266 μ L de persulfato de amônio 10% e 80 μ L de TEMED. Após a polimerização, o gel foi submetido a uma pré-corrida por 30 minutos a 1.320 V; 35 mA: 45 W em tampão de corrida TBE 1X. Em seguida as amostras contendo 7 μ L de cada reação de PCR misturados com 5 μ L de stop solution (formamida 80% contendo azul de bromofenol e xileno cianol), previamente denaturadas a 80°C por 4 min e 10 μ L foram aplicados no gel. A eletroforese foi realizada a 1.320 V - 35 mA, até a frente de xileno-cianol chegar ao final do gel. Após a separação dos fragmentos por eletroforese, o gel foi secado a vácuo sobre uma folha de papel Whatman 3 MM e o *fingerprint* de cDNA foi visualizado através de exposição a filme de raio-X (KodaK X-OMAT AR ou Hyperfilmt MP, Amersham Biosciences).

5.3. Isolamento e re-amplificação das bandas diferenciais

As bandas diferenciais de RT-PCR foram cortadas dos géis e colocadas em tubos Eppendorf. O DNA foi eluído através de incubação por 20 min a 95°C em 200 μ L de água Milli-Q e precipitado através da adição de 0,1x o seu volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 (20 μ L) e 2x o seu volume de etanol absoluto (440 μ L). O DNA foi mantido a -20°C durante a noite, em seguida centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos e ressuspendido em 10 μ L de água.

O DNA eluído foi amplificado por PCR em uma reação com volume final de 40 μ L contendo: 4 μ L de cDNA eluído; 4 μ L de primer ancorador (10 μ M); 4 μ L do primer arbitrário (10 μ M); 21,5 μ L de água bidestilada; 4 μ L de tampão de amplificação 10x (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4; KCl 50 mM) (Invitrogen); 1 μ L de MgCl₂ 50 mM; 1 μ L de dNTPs 200 μ M; e 0,5 μ L (5 U/ μ L) de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As condições de

amplificação foram: 94°C (4 min), seguido de 40 ciclos de 94°C (30 s), 40°C (2 min) e 72°C (30 s). A amplificação foi realizada em termociclador (Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystems). As amostras re-amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de 2% de agarose para confirmação do tamanho.

6. Clonagem dos fragmentos diferenciais:

Para a clonagem dos fragmentos diferenciais, foi utilizado o kit de ligação p-GEM – T Easy Vector System I (Promega Co.). Em tubos Eppendorfs foram colocados 3 μL das amostras reamplificadas, 5 μL de tampão de ligação 2X, 1 μL do vetor pGEM-T (50 ng/ μL) e 1 μL da enzima DNA ligase. A reação de ligação foi incubada durante a noite a 4 °C.

Células competentes de *E. coli DH5* α foram utilizadas para produzir colônias transformantes. Em tubos Eppendorf contendo 100 µL de cultura permanente foram adicionados 5 µL da reação de ligação, estes foram deixados por 20 minutos em gelo, e em seguida colocados a 42 °C por 50 segundos, deixou-se novamente em gelo por 3 minutos e foram adicionados 900 µL de meio de cultura LB. As bactérias foram incubadas em shaker New Brunswick Scientific a 180 rpm por 1,5 hora a 37 °C.

Com o intuito de se obter colônias transformantes, as culturas obtidas foram crescidas novamente em placas de Petri contendo meio de cultura LB – ágar com 2 μ L / mL de ampicilina 50 μ g/ μ L previamente tratadas com 50 μ L de X–gal 20 mg/mL. Estas culturas foram crescidas por 16 horas a 37 °C.

As colônias transformantes foram identificadas pela cor branca nas placas, de onde foram selecionadas 6 colônias de cada fragmento diferencial clonado. As colônias foram isoladas e crescidas em tubos de cultura com meio LB e 10 μ L de ampicilina 50 μ g/ μ L por 16 horas a 37 °C.

7. Mini preparação de plasmídio e confirmação da inserção do fragmento:

As culturas incubadas durante a noite, foram transferidas para tubos e centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e o pellet constituído de bactérias foi ressuspendido em 300 μ L de solução P1 (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 10 mM de EDTA pH 8,0 e 100 μ g / mL de RNAse) utilizando vortex. Em seguida foram adicionados 300 μ L de solução P2 (200 mM de Na OH e 1% de SDS) e incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 300 μ L de P3 (3 M de acetato de potássio pH 5,5) e centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e precipitado com 400 μ L de isopropanol a 14.000 rpm por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se com 500 μ L de etanol 70% por 4 minutos a 14.000 rpm. O pellet foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 20 μ L de TE.

Para verificar a inserção dos fragmentos no plasmídeo, foi realizada uma PCR de: 1 μ L do plasmídio diluído em 200 μ L de água bidestilada; 2 μ L do primer sp6 20 pmol; 2 μ L do primer T7 20 pmol; 36 μ L de água; 2 μ L de dNTP 5 mM, 5 μ L de tampão de amplificação 10x (Tris-HCl 20 mM, pH 8.4; KCl 50 mM; Invitrogen); 1,5 μ L de MgCl₂ 50 mM; e 0,5 μ L (5 U/ μ L) de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As condições de amplificação foram: 94°C (5 min), seguido de 30 ciclos de 94°C (1 min), 50°C (1 min) e 72°C (2 min) e a extensão de 72 °C (20 min). Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de 1,5% de agarose para confirmação do tamanho através de comparação com o padrão de peso molecular.

8. Preparação dos plasmídios selecionados para seqüenciamento:

Para o seqüenciamento dos fragmentos diferenciais foi realizada uma reação de PCR utilizado o kit DNA Sequencing Kit Big DyeTM Terminator v3.1 (ABI PRISM Applied Biosystems). A reação foi composta de: 1 μ L de DNA plasmidial obtido da mini preparação; 2 μ L do mix Big Dye; 1 μ L do primer sp6; 1 μ L do primer T7 e 6 μ L de água

bidestilada estéril. As condições de amplificação foram 94°C (5 min), seguido de 35 ciclos de 95°C (30 seg), 55°C (10 seg) e 60°C (4 min).

Após a amplificação, 80 μL de isopropanol 75% foram adicionados aos tubos, logo estes foram vortexados e incubados por 10 minutos, em seguida foram centrifugados por 30 minutos a 14.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 180 μL de etanol 70%, e centrifugou-se novamente nas mesmas condições citadas a cima. O material foi secado à temperatura ambiente protegido da luz e em seguida ressuspendido em 3 μL de Blue Dextran/EDTA com formamida 1:3 e denaturada a 95°C por 5 minutos. O seqüenciamento foi realizado pelo seqüenciador automático ABI PRISMTM 377 (*Perkin Elmer*), e as seqüências obtidas foram analisadas utilizando o programa GENE RUNNER e CHROMAS. Estas seqüências foram comparadas em banco de dados utilizando o programa BlastX versão 2.2.14 para investigar a homologia com proteínas conhecidas.

9. Northern blot e hibridização

Para a confirmação da expressão diferencial dos fragmentos obtidos, foram realizados Northern blots com as amostras do fungo crescido nas madeiras E. grandis e P. taeda e do fungo crescido no meio líquido como controle. Para obtenção de cada membrana (blot), o RNA total das amostras, foi corrido em gel de 1,0% de agarose com formaldeído e MOPS 1X. Em seguida, o gel foi lavado com água estéril tratada com DEPC por 15 minutos e colocado em um aparato de transferência, contendo tampão SSC 2X. Sobre o gel colocou-se uma membrana de transferência de ácidos nucléicos (HybondTM-N+ - Amersham), duas folhas de papel Whatman 3MM e várias camadas de papel absorvente. A transferência foi realizada durante a noite e em seguida a membrana foi lavada com SSC 2X durante 15 min sob agitação e secada a 80°C durante duas horas.

Para as hibridizações das membranas foram preparadas sondas utilizando fragmentos de clones isolados marcados com $[\alpha$ -³²P]-dCTP (Amersham Biosciences). Para isto foi utilizado o kit *Random Primers DNA Labelling System* da Invitrogen, seguindo as especificações do fornecedor.
As membranas obtidas foram hibridizadas com o fragmento dos clones isolados marcado radiativamente. Para tanto, as membranas foram incubadas a 65°C por no mínimo 2 horas com a solução de pré-hibridização contendo: 0,5 M NaHPO₄ pH 7,2; 7% SDS e 1 mM EDTA e 100 μ g/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado e fragmentado por sonicação. Após este período, a solução inicial foi retirada e substituída pela solução de hibridização constituída de: 0,5 M NaHPO₄ pH 7,2; 7% SDS e 1 mM EDTA, juntamente com a sonda marcada radiativamente. A hibridização foi realizada durante a noite a 65°C.

As membranas hibridizadas foram lavadas à temperatura ambiente por 25 minutos em uma solução 2X SSC e 0,1 % SDS, em seguida foram lavadas novamente na solução 2X SSC e 0,1% SDS a 55°C por 25 minutos, e então lavadas na mesma solução a 60°C por 15 minutos. Em seguida, as membranas foram expostas a filme de raio-X por três dias a – 80 °C.

10. Confirmação da expressão diferencial por Slot blot:

Esta metodologia foi utilizada para confirmar o padrão de expressão diferencial das bandas isoladas nos experimentos de RT-PCR e para a análise da expressão dos cDNAs obtidos durante o crescimento do fungo na madeira de *P. taeda* nos períodos entre 5 e 60 dias.

Cinqüenta ng de produto amplificado das bandas isoladas e clonadas, em um volume final de 150 μ L de TE 1X foram denaturados por 95°C por 10 minutos. A seguir adicionou-se 150 μ L de SSC 20X filtrado. As amostras foram transferidas para membranas de nylon (HybondTM-N+ - Amersham Pharmacia) com auxílio de um aparelho *slot blot* Minifold I (Schleicher & Schuell Inc.). Antes da transferência das amostras, os *slots* foram lavados em 300 μ L de SSC 10X filtrado. As membranas foram secadas à temperatura ambiente e o DNA foi fixado a 80 °C por 2 horas. Como controle de expressão foi utilizado produto de PCR do gene constitutivamente expresso gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gdh*) que foi previamente aplificado e clonado usando primers descritos por Manubes *et al.* (2003). Todo experimento foi realizado em duplicata.

Os cDNAs sintetizados a partir do RNA isolado durante os períodos de 5, 10, 15, 20, 40, e 60 dias foram quantificados no aparelho de quantificação Gene Quant (Amersham Pharmacia) e utilizados como sondas nos experimentos de *slot blot* para a confirmação da expressão diferencial das bandas isoladas. Aproximadamente 30 ng dos cDNAs foram marcados com o kit *Random Primers DNA Labelling System* (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante.

As membranas foram pré-hibridizadas a 42 °C por 5 horas em: formamida deionizada 50%; SSC 5X; Debhard's 10X (Sambrook *et al.*, 1989) Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; SDS 1% e DNA de esperma de salmão desnaturado100 µg/mL. As membranas foram hibridizadas durante a noite a 42 °C na mesma solução de pré- hibridização contendo a sonda marcada previamente desnaturada a 98 °C. Após o período de hibridização, as membranas foram lavadas à temperatura ambiente por 5 minutos em uma solução contendo SSC 2X e SDS 0,1%. A seguir, as membranas foram lavadas por 2 vezes a 60°C por 5 minutos em uma solução contendo SSC 0,1X e SDS 0,1%. As membranas foram expostas por tempo necessários a filme de raio X (Hyperfilm, Amersham Pharmacia).

11. RT-PCR quantitativo em tempo real:

Para confirmação da expressão dos genes estudados foi utilizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real, para tanto o gene Gliceraldeido fosfato desidrogenase (*GPD*) expresso constitutivamente foi escolhido como gene referência para a obtenção da curva de expressão quantitativa. *Primers* específicos foram desenhados a partir das seqüências obtidas como mostra a **tabela 1**.

Tabela 1: primers utilizados no RT-PCR quantitativo.

Nome do primer	Seqüências (5´-3´)	$\operatorname{Tm}(^{0}\mathrm{C})$
3'GPD-Sense	GTGACCTCGTCGTCCGTCT	58,6
3'GPD-Antissense	TCCTTCTCAGCGAAGACGT	58,1
CsOO/OD –Sense	GGGAGAAGGGACGTGTAAA	56,1
CsOO/OD-Antissense	TTCTCAACAAAGTGCCCGA	58,3
CsCelh-Sense	CGGTACATGGTTCCAGGAG	56,9
CsCelh-Antissense	GGTGACATCGCATTGACAA	55,9
CsSOD-Sense	AAGCCCGAGGGACATAATT	58,0
CsSOD-Antisense	CACGTCATCCGGTGTCTCC	59,7

A partir das culturas crescidas no período de 5-60 dias em *P. Taeda*, *E. Grandis* e meio líquido, foram extraidos os RNAs de cada amostra e tratados com DNAse como citado no tópico 4. Em seguida cDNAs foram obtidos utilizando o kit SuperScripII (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante.

Em um tubo contendo aproximadamente $0,5 \ \mu g$ de RNA foi adicionado $1\mu L$ de oligo DT (Invitrogen), $1 \ \mu L$ de dNTP mix 10 mM, água q.s.p 12 μL e incubado a 65 °C por 5 minutos e por 2 minutos no gelo. Em seguida foram adicionados 4 μL de 5X first-strad Buffer, 2 μL de DDT 0,1 M, 1 μL de RNA guard e incubado a 42 °C por 50 minutos e depois a 70 °C por 15 minutos.

A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento iCycler IQTM (Bio-Rad) e o C_t (*threshold cycle* - momento da reação em que a fluorescência da amostra começa a ser detectada) determinado com o auxílio do *Real-Time Detection System Software*, versão 3.0 (Bio-Rad). O C_t de uma reação é determinado, principalmente, pela quantidade de cDNA molde presente no começo da reação de amplificação.

Para um volume final de 50 μ L a reação foi preparada como descrito a seguir: 25 μ L *de Platinum*[®] *SYBR*[®] *Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), 10 μ M de cada *primer* e 10 μ L de cDNA total (100 ng) (**Tab. 1**).

Para amplificação foi usado o ciclo descrito a seguir: 2 min a 50°C de prétratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de 2 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 59°C por 15 s, e uma extensão a 72°C por 30 s, seguida de uma análise de curva de *melting* (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s iniciando-se em 95°C). Através desta análise foi possível averiguar a especificidade da reação de amplificação, uma vez que o fluoróforo usado emite luz sempre que um dímero de DNA é formado.

12. Confirmação da expressão diferencial por PCR quantitativo em tempo real:

Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do C_t usada para avaliação da expressão gênica. Os genes estudados foram analisados e sua expressão normalizada de acordo com a expressão do gene constitutivo *3GPD*, o aumento da expressão gênica foi calculada utilizando a formula $2^{(Rt_Et)}/2^{(Rn_En)}$ onde *Rt* é o número de ciclos do gene de referência observado em *Eucalyptus* e *Pinus*, *Et* é o número de ciclos dos genes estudados em *Eucalyptus* e *Pinus*, *Rn* é o número de ciclos do gene de referencia observada em condição padrão, *En* é o número de ciclos dos genes experimentais observada em condição padrão.

1. Curva de crescimento:

Para se obter uma curva relativa ao crescimento fúngico, o teor de ergosterol presente nas amostras de madeiras biodegradadas durante o período de cultivo foi avaliado, uma vez que o ergosterol está diretamente correlacionado com a membrana fúngica (Montgomery *et al.*, 2000).

A partir dos micélios de *C. subvermispora* crescidos no período de 5 a 60 dias em madeira de *P. taeda* e *E. grandis*, utilizando medidas em HPLC, os teores de ergosterol foram obtidos em pontos escolhidos ao longo deste período para a construção das curvas nas duas condições de crescimento.

A análise das curvas (**fig. 2**) mostrou que no primeiro ponto da medida da colonização da madeira, o fungo apresentou um melhor crescimento em *P. taeda*, que é uma madeira mole, porém já no segundo ponto e à medida que o período se estendeu o micélio apresentou um melhor crescimento em *E. grandis*, uma madeira dura.

Deste resultado pode-se concluir que o fungo *C. subvermispora* coloniza mais facilmente madeiras duras do que moles. Da mesma forma, Reid e Paice (1994) estudando branqueamento da polpa Kraft por *Tramentes versicolor* (fungo de degradação branca), utilizando madeiras duras e moles, observaram que este organismo coloniza preferencialmente madeiras duras e, concluíram que fungos de degradação branca degradam melhor o tipo de lignina presente madeiras duras, compostas por unidades guaiacila e siringila, do que o presente em madeiras moles, compostas principalmente por unidades de guaiacila.

Observando-se ainda a **fig. 2**, verifica-se que entre os dias 10 e 15 de cultivo há uma desaceleração do crescimento fúngico nas duas madeiras. Provavelmente este efeito esteja relacionado com a falta de nitrogênio, que é essencial para manter o crescimento, mas se esgota nos primeiros estágios de colonização (Messner *et al.*, 1998). Normalmente, o nitrogênio como nutriente está disponível no parênquima celular da madeira e, à medida que este elemento se torna menos abundante, são induzidos no fungo elementos que

iniciarão a despolimerização da lignina. Isto acontece em *P. chrysosporium* onde a expressão de *mnp* é ativada pela baixa concentração de nitrogênio e pela presença de Mn (II) em cultura (Li *et al.*, 1994). De forma similar aos genes *mnp*, os genes *lip* neste fungo são também diferencialmente regulados de acordo com vários fatores como a resposta à falta de nitrogênio e carbono no meio (Stewart *et al.*, 1992; Stewart e Cullen, 1999). Este efeito parece comum às várias espécies de fungos de degradação branca (*white-rot fungi*). Porém, foi observado que alguns destes fungos como *C. subvermispora e Dichomutus squalens* apresentam atividade ligninolítica mesmo em meios onde o nitrogênio está disponível (Kirk *et al.*, 1978; Messner *et al.*, 1998). A fase onde o nitrogênio é menos abundante é conhecida como idiofase. Por outro lado, esta fase não é observada quando o fungo cresce em meio rico em nutrientes, neste caso se observa apenas o aumento constante da concentração de ergosterol durante o período de crescimento (Messner *et al.*, 1998).



Figura 2. Teor de ergosterol de *Ceriporipsis subvermispora* crescido em madeiras de *P.taeda* e *E. grandis* nos períodos de 5 a 60 dias de cultivo.

2. Padronização da extração de RNA total de *C. subvermispora* crescido em cavacos de *P. taeda* e *E. grandis*:

Com o intuito de otimizar a extração de RNA dos micélios crescidos em madeira, foram testadas varias metodologias, entre elas uma citada por Vallim *et al.* (1988) para extração de RNA de fungos cultivados em madeira, porém este método de extração de RNA total não apresentou rendimento satisfatório. Uma outra metodologia descrita por Sokolovsky *et al.* (1995) apresentou um melhor rendimento na extração de RNA total, sendo esta a adotada para o procedimento de extração de todas as amostras cultivadas em cavacos de madeira (**fig. 3A**).



Figura 3: A - Gel de agarose com RNA total de *C. subvermispora* extraído após 60 dias de cultivo em *E. grandis.* por dois métodos diferentes de extração. Coluna 1: RNA da extração segundo a metodologia de Vallim *et al.* (1988). Coluna 2: extração segundo a metodologia de Sokolovsky *et al.* (1995). B - Gel de agarose com RNA total extraído de cavacos de *E. grandis* e *P. taeda* (coluna 1 e 2) e RNA total extraído da cultura de *C. subvermispora* em *E. grandis* e *P. taeda* após 60 dias de cultivo (colunas 3 e 4, respectivamente). As setas correspondem aos RNAs ribossômicos 28s (superior) e 18s (inferior).

Para se certificar da possível existência de contaminação com RNA das madeiras nas extrações dos micélios fúngicos, foram realizadas extrações controles dos cavacos de *P. taeda* e *E. grandis* não inoculados com micélios (**fig. 3B**). Este procedimento mostrou que a metodologia de extração produz RNA do fungo livre de uma possível contaminação com RNA das madeiras.

3. Isolamento de fragmentos com expressão diferencial de *C. subvermispora* através de *Display* diferencial:

Neste trabalho, amostras de cDNAs de *C. subvermispora* crescidos em *P. taeda* e *E. grandis* foram amplificados por PCR utilizando os *primers* arbitrários OPJ01, OPJ04, OPJ10 e OPJ12 juntamente com os oligos ancoradores (d)Ts, T12NC e T12NG, na presença de 5 μ Ci do radiosótopo [α -³³P]-dATP. Os produtos obtidos formam uma espécie de *fingerprint* de transcritos que foram visualizados em autorradiografias de gel de poliacrilamida e, desta forma, fragmentos com expressão diferencial puderam ser identificados em pontos específicos no período entre 5-60 dias de cultivo.

Infelizmente para os transcritos provenientes do crescimento em *E. grandis* não foi possível obter uma boa qualidade nas autorradiografias o que impossibilitou a análise da expressão diferencial pela técnica de *Display* Diferencial. Provavelmente os RNAs de C. subvermispora, quando crescido nesta madeira, trazem algum contaminante que interfere na reação de amplificação. Com o intuito de se obter amostras de RNA total com menos contaminação, foram feitas várias tentativas com outras técnicas de extração como, por exemplo, o protocolo descrito por Logemann *et al.* (1987), adaptado para extração de RNA de folhas de café (Mondego *et al.*, 2005), porém ainda assim não foi possível obter uma boa qualidade do cDNA para a metodologia de *Display* Diferencial. Desta forma, foi dado prosseguimento ao estudo para isolamento de transcritos somente com amostras obtidas de cultivo em *P. taeda*.

Para os micélios crescidos em *P. taeda*, utilizando o *primer* arbitrário OPJ01 junto com o ancorador T12NC, foram visualizadas 20 bandas com evidente expressão diferencial (**fig. 4A**), já com o primer T12NG apenas 10 bandas foram identificadas com este perfil de expressão (**fig. 4B**). Nas autorradiografias dos géis de poliacrilamida utilizando os *primers* OPJ04 e T12NC foram 12 os fragmentos visualizados com expressão diferencial (**fig. 4C**), já utilizando T12NG como ancorador foram isolados 15 fragmentos expressos diferencialmente (**fig. 4D**). As autorradiografias dos géis com os produtos do RT-PCR utilizando o *primer* aleatório OPJ10 com os *primers* ancoradores T12NC (**fig. 5A**) e T12NG (**fig. 5B**) mostraram, respectivamente, 13 e 38 bandas cujos perfis indicaram

expressão diferencial. Para os *primers* OPJ12 e T12NC e T12NG como ancoradores, foram isolados 15 e 9 fragmentos (**fig. 5**C e **D**), respectivamente.

Os fragmentos foram nomeados de acordo à condição de cultivo, neste caso a madeira onde o fungo foi crescido *Pinus taeda* (Pt), seguido pelo dia da coleta (5, 10, 15, 20, 40 ou 60), o número do fragmento diferencial cortado do gel *Display* numerados no sentido do maior para o menor (como mostrados nas **figs. 4** e **5**) e de acordo com o *primer* ancorador utilizado (C=T12NC ou G=T12NG).

4. Isolamento e re-amplificação das bandas diferenciais:

Após a identificação dos 116 fragmentos expressos diferencialmente nas autorradiografias, estes foram cortados e eluídos para serem re-amplificados por PCR nas condições citadas em material e métodos. Neste processo apenas 94 fragmentos re-amplificaram. A falta de amplificação de alguns fragmentos pode ser devida provavelmente á pouca quantidade de DNA eluído do gel de poliacrilamida, ou mesmo à presença de algum contaminante inibidor da Taq DNA polimerase.

A **fig. 6** (**A**, **B** e **C**) mostra as bandas re-amplificadas testadas em gel de agarose 1,5%. Com o *primer* OPJ01, foram identificadas nas autorradiografias, 30 bandas expressas diferencialmente, dentre estas 3 não re-amplificaram (**fig. 6A**).



Figura 4: Autorradiografia de gel de display diferencial de C. subvermispora crescido em P. taeda no período de 5-60 dias. (A) Fragmentos obtidos com os primers OPJ01/T12NC. (B) Fragmentos obtidos com os primers OPJ01/T12NG. (C) Fragmentos obtidos com os primers OPJ04/T12NC. (D) Fragmentos obtidos com os *primers* OPJ04/T12NG. (C) Fragmentos obtudos com os *primers* OFJ04/T12NG. As bandas assinaladas (•) e numeradas foram isoladas para caracterização. 46



Figura 5: Autorradiografia de gel de *display* diferencial de *C. subvermispora* crescido em *P. taeda* no período de 5-60 dias. (A) Fragmentos obtidos com os *primers* OPJ10/T12NC. (B) Fragmentos obtidos com os *primers* OPJ10/T12NG. (C) Fragmentos obtidos com os *primers* OPJ12/T12NC. (D) Fragmentos obtidos com os *primers* OPJ12/T12NG. As bandas assinaladas (•) e numeradas foram isoladas para caracterização.



Figura 6: Géis de agarose a 1,5% para vizualização dos fragmentos isolados e re-amplificados dos géis de display diferencial de C. subvermispora crescido em P. taeda. Os primers arbitrários e ancoradores, bem com os dias de cultivo estão descritos acima das figuras: A- OPJ01/T12NC e T12NG; B- OPJ04/T12NC e T12NG; C- OPJ10/T12NC e T12NG. L nos painéis A e C corresponde ao marcador 100 pb DNA ladder da Invitrogen e no painel B, ao marcador 100 pb DNA ladder da Amersham Biosciences.

Com os primers OPJ04 e OPJ10, foram visualizados ao todo 27 e 33 fragmentos diferenciais, dos quais 4 e 3 não re-amplificaram, respectivamente (fig. 6B e C). Já o rendimento de re-amplificação para os fragmentos do *primer* OPJ12 foi de 50% (dados não mostrados).

De modo geral os fragmentos re-amplificaram em bandas únicas com tamanho (pb) compatíveis ao tamanho verificado originariamente no gel do *display*. Em alguns casos foram obeservadas duas bandas na re-amplificação, como por exemplo, nos fragmentos OPJ01- Pt403C e OPJ01-Pt404C (fig. 6A, colunas 7 e 8). Os fragmentos re-amplificados foram clonados para caracterização.

5. Clonagem dos fragmentos diferenciais:

As bandas re-amplificadas foram clonadas no vetor p-GEM através da ligação T-A usando o kit de ligação *p-GEM –T Easy Vector System I* (Promega). O produto de ligação foi usado para transformar bactérias *E. coli* DH5α para seleção de colônias contendo os plasmídios recombinantes. Dos 94 fragmentos re-amplificados, 68 foram clonados para posterior caracterização. Ao todo foram isolados e analisados 408 clones.

Com o intuito de se certificar se os plasmídios continham os fragmentos clonados e se os tamanhos dos fragmentos correspondiam aos das bandas identificadas no gel de *display*, foram realizadas as PCRs utilizando os *primers* T7 e SP6 que se anelam nas regiões flanqueadoras do sítio de clonagem do vetor.

Os clones foram nomeados de acordo com a condição de cultivo seguindo a nomenclatura adotada para os fragmentos, sendo Pt para *Pinus taeda*, seguido pelo dia da coleta (5, 10, 15, 20, 40 ou 60), o número do fragmento diferencial cortado do gel *Display* numerados no sentido do maior para o menor (como mostrados nas figs. 4 e 5), C para T12NC ou G para T12NG e por último o número do clone obtido (1-6).

Para cada fragmento diferencial clonado, foram selecionadas 4-6 colônias de bactérias *E. coli DH5a* recombinantes através do marcador X-gal. De uma forma geral os plasmídios extraídos apresentaram tamanho do inserto iguais entre si para os clones individuais e compatíveis com o tamanho do fragmento isolado do gel de display,

indicando uma boa eficiência do método de seleção adotado. Alguns clones apresentaram tamanhos de insertos variados, principalmente nos casos derivados de uma banda cuja reamplificação gerou mais do que um fragmento como por exemplo o Pt51C (**fig. 6A**, coluna 12).

No caso dos fragmentos isolados *primer* arbitrário OPJ01 observa-se que para as bandas Pt602C, Pt401AC, Pt401C, Pt402C, Pt405C e Pt151G os insertos dos clones são todos do mesmo tamanho (**fig. 7**). Por exemplo, o fragmento diferencial Pt602C que era de aproximadamente 420 pb, gerou um fragmento de aproximadamente 600 pb em todos os clones analisados após a amplificação do plasmídio com os *primers* T7 e sp6. Levando em consideração o tamanho do *polylinker* do vetor que é aproximadamente 150 pb, verifica-se que o produto corresponde ao tamanho original do fragmento. Por outro lado, para o mesmo *primer* arbitrário, os clones derivados dos fragmentos diferenciais Pt603C, Pt604C, Pt403C, Pt404C, Pt401G, Pt201G, Pt202G, Pt152G, Pt101G, Pt52G e Pt54G não apresentaram uniformidade nos tamanhos (**fig.7**).

Um quadro semelhante foi observado para os fragmentos diferenciais obtidos com os *primers* OPJ04 e OPJ10 (dados não mostrados).

Tabela 2 – Resumo dos resultados numéricos relativos aos diferentes passos de
caracterização dos transcritos obtidos nos experimentos de DDRT e
clonagem.

Primers	Fragmentos isolados	Fragmentos clonados	Clones sequenciados	Fragmentos sequenciados
OPJ01/T12NC e T12NG	30	26	25	20
OPJ04/T12NC e T12NG	28	15	21	14
OPJ10/T12NC e T12NG	33	29	49	27



Figura 7: Gel de agarose a 1% para teste dos fragmentos inseridos no sítio de clonagem T-A do plasmídio pGEM-T Easy. Fragmentos originários do gel de display obtido com o *primer* arbitrário OPJ01 e os âncoradores T12NC (A e B) e T12NG (C). O nome de cada fragmento diferencial se encontra acima dos números. Os números correspondem aos clones analisados e L aos marcadores: 100 pb DNA *ladder* e 1 kb Plus DNA ladder da Invitrogen (painéis A e B) e 100 pb DNA *ladder* da Amersham Biosciences (painel C).

6. Analise das seqüências dos fragmentos diferenciais:

Após a confirmação da presença dos fragmentos nos clones e a verificação dos seus tamanhos, os plasmídios foram submetidos à análise por seqüenciamento automático. Nas reações de sequenciamento foram usados os *primers* T7 (+) e SP6 (-) para cada fragmento.

Para os clones derivados de um mesmo fragmento diferencial cujos tamanhos diferiram, foi realizado o sequenciamento de um clone de cada inserto diferente. Um total de 95 seqüências foram analisadas.

As seqüências dos diferentes transcritos isolados de *C. subvermispora* em cada período de cultivo foram alinhadas com seqüências contidas no GenBank usando o algoritmo BLAST versão 2.2.14 (Altschul *et al.*, 1997) utilizando a função BLASTX (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</u>). As seqüências obtidas para os fragmentos estão apresentadas no Anexo.

Os resultados dos alinhamentos das seqüências obtidas no GenBank estão apresentados na **Tabela 3**. Do total de 61 transcritos seqüenciados, 10 não apresentaram similaridade com nenhuma seqüência já depositada no banco de dados e 20 apresentaram similaridade a proteínas hipotéticas.

	Fragmento	pb1	Clone ²	Primer ³	Bases lidas	Alinhamento	E-value
	PT51C	450	3	+	219	Transferase (Aspergillus fumigatus)	9.1
	PT52C	220	3	+	213	Fosfatidilinositol glicana, classe N (Homo sapiens)	3.8
	PT101C	530	3	+	262	Sem similaridade	
	PT103C	460	6	+	485	oxalate decarboxylase (Flammulina velutipes)	2e-12
	PT104AC	450	4	+	502	oxalato decarboxilase (Flammulina velutipes)	9e-13
						oxalato oxidase (Ceriporiopsis subvermispora)	3e-12
	PT104C	420	3	+	203	Proteína hipotética (Gibberella zeae)	9.2
	PT151C	215	3	+	220	citocromo c oxidase polipeptide I (Hypocrea jecorina)	1e-16
OPJ01/T12NC	PT401AC	550	2	+	690	Proteína hipotética conservada (Chloroflexus aurantiacus)	4e-31
	PT401C	600	3	+	808	Proteína hipotética conservada (Chloroflexus aurantiacus)	3e-06
	PT402C	517	4	+	672	Aspartateammonia ligase (Clostridium thermocellum)	3.4
	PT404C	410	3	+	476	Possível lipoproteína (Syntrophobacter fumaroxidans)	5.4
	PT405C	320	2	+	325	AroD (Mycobacterium avium)	1e-11
	PT60 2C	420	3	+	439	Proteína hipotética (Geobacillus kaustophilus)	4e-09
	PT603C	380	1	+	386	Proteína hipotética (Geobacillus kaustophilus)	7e-09
			2	+	249	GrpE proteina (Hsp-70 cofactor) (Bacteroides thetaiotaomicron)	1e-06
	PT604C	295	5	+	155	Sem similaridade	
	PT54G	220	4	+	204	Proteína hipotética (Cryptococcus neoformans)	4.1
	PT101G	600	4	+	329	Possível sistema de transporte do tipo permease ABC (Bdellovibrio bacteriovorus)	2.2
	PT151G	450	1	+	340	similar a plakofilina-3 (Gallus gallus).	2.2
OPJ01/T12NG			2	+	325	Proteína hipotética (Candida albicans)	9.0
			3	+	328	Proteína hipotética (Neurospora crassa)	7.1
	PT152G	327	1	+	316	Proteína hipotética (Neurospora crassa]	4.1
			2	+	325	Proteína hipotética (Neurospora crassa]	3.8
	PT401G	600	3	+	339	Sem similaridade	
			4	+	509	Proteína hipotética (Saccharomyces cerevisiae)	4e-36

Tabela 3- Homologias das seqüências obtidas para os fragmentos isolados no DDRT-PCR com seqüências depositadas no GeneBank

Primers utilizados	Fragmento	pb1	Clone ²	Primer ³	Bases lidas	Alinhamento	E-value
	PT101C	380	1	+	413	Proteína hipotética (Yarrowia lipolytica)	0.61
			4	+	373	Provavel transportador de ferro (Chromobacterium violaceum)	6.4
	PT102C	330	1	+	380	Proteína hipotética (Ustilago maydis)	0.44
	PT103C	250	1	+	232	Acido graxo oxigenase (Aspergillus fumigatus)	1.1
			5	+	283	Proteína hipotética (Ustilago maydis)	4.2
	PT151C	900	1	+	795	Proteína hipotética LPF (Candida albicans)	6.9
	PT152C	700	1	+	712	aldo-keto reductase, putative (Cryptococcus neoformans)	3e-11
OPJ04/T12NC			2	-	811	aldo-keto reductase, putative (Cryptococcus neoformans)	9e-08
	PT201C	500	2	+	496	gluconato kinase (2-dehydro-3-deoxygluconokinase) (Bacillus cereus)	2.6
			3	+	495	gluconato kinase (2-dehydro-3-deoxygluconokinase) (Bacillus cereus)	3.4
	PT202C	400	6	+	250	Proteína hipotética (Symbiobacterium thermophilum)	8.1
	PT203C	300	1	+	285	Sem similaridade	
	PT204C	200	3	+	278	Proteína hipotética (Neurospora crassa)	2.5
	PT401C	800	2	-	747	Proteína hipotética (Ustilago maydis)	3.7
			4	+	743	Proteína hipotética (Gibberella zeae)	8.2
	PT402C	750	1	+	141	Sem similaridade	
			4	+	762	Sem similaridade	
	PT403C	650	?	+	67	Sem similaridade	
	PT105G	350	1	+	344	glicosil transferase (Streptococcus agalactiae)	8.4
OPJ04/T12NG			2	+	135	Sem similaridade	
	PT602G	490	1	+	494	Possível DNA polimerase III (Polaribacter irgensii)	1e-07

Primers utilizados	Fragmento	pb1	Clone ²	Primer ³	Bases lidas	Alinhamento	E-value
	Pt101C	400	1	+	126	Sem similaridade	
	Pt102C	390	3	+	395	Proteína hipotética (Ustilago maydis)	3.7
	Pt103C	250	3	+	208	Sem similaridade	
	PT151C	550	2	+	97	Sem similaridade	
			5	+	186	Possível transportador de cations (Cryptococcus neoformans)	3.8
			6	+	164	Sem similaridade	
	Pt153C	490	2	+	420	Possível ativador transcricional (Saccharomyces cerevisiae)	3.8
	Pt202C	700	2	+	168	celobiohidrolase (Coriolus versicolor)	0.76
OPJ10/T12NC	Pt204C	500	5	+	234	GTPase (Cryptococcus neoformans)	0.008
	Pt205C	460	1	+	491	Proteína hipotética (Cryptococcus neoformans)	0.97
			5	+	582	prolil-tRNA sintetase (Synechococcus sp)	6.8
	PT206C	450	3	-	476	manganese superoxide dismutase (Taiwanofungus camphorata)	2.9
			4	-	467	metalotioneina (Jasus edwardsii)	0.12
			6	+	36	Sem similaridade	
	PT207C	350	1	+	585	Proteína hipotética (Erwinia amylovora)	2e-58
			2	-	682	Repressor transcriptional (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	2.4
			4	-	590	formina (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	0.0015
			6	+	290	Proteína hipotética (Caenorhabditis elegans)	3.0
	Pt51G	520	4	+	46	Sem similaridade	
	Pt52G	510	1	+	338	citocromo b5 reductase (Zea mays)	0.34
			2	+	260	Similar a protein de reparo de DNA	6.4
			3	+	387	citocromo b5 reductase (Zea mays)	5e-16
	D+52C	500	2	+	390	NADH-citocromo b5 reductase (Aspergillus nidulans)	/e-15
OPJ10/112NG	F153G	300	5	Ŧ	277		
	Pt54G	400	4	-	138	Sem similaridade	1.0
	<i>Pt15</i> 2 <i>G</i>	300	6	+	260	Proteina hipotética (Aspergillus nidulans)	1.8
	D4152C	200	4	-	258	Proteina hipotetica (<i>Cryptococcus neoformas</i>)	1./
	P1155G	280	5	+	223	Proteína hipotetica (<i>Cocciatotaes immitis</i>)	8.4 0.2
	D.1546	070	5	+	127	riotenia inpotetica (<i>Usutago mayais</i>)	9.3
	<i>Pt154G</i>	270	2	+	238	alta-1,3-glucanase (Aspergillus sp)	4.2
	Diante	(00 050	5	+	240	Proteina nipotetica (Gibberella zeae)	5.4
	<i>Pt201G</i>	600 e 250	1	+	375	manganese superoxide dismutase (<i>Taiwanofungus camphorata</i>)	1e-05
			2	+	114	Proteina hipotetica conservada (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	0.34

-							
	Pt202G	410	5	+	347	Aglutinina (Chlamydomonas incerta)	0.16
			2	+	414	Glicosidase (Cryptococcus neoformans)	6.8
	Pt203G	350	1	+	320	OSJNBa0004G10.29 [Oryza sativa	6.4
	Pt204G	330	3	+	428	gamma-aminobutyrate permease (Acinetobacter sp)	6e-43
			5	+	307	Glicoproteina Golgi/lysosome (Trypanosoma cruzi)	0.25
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Pt402G	900	3	+	382	Proteína hipotética (Coccidioides immitis)	0.010
OPJ10/T12NG			1	+	352	Proteína hipotética (Gibberella zeae)	3e-07
	Pt403G	850	3	+	421	serine/threonine protein kinase (Frankia sp)	2.9
			4	+	660	Proteína hipotética (Neurospora crassa)	0.60
	PT405G	500	4	+	365	Proteína hipotética (Cryptococcus neoformans)	2.4
			5	+	404	proteina com resistencia a tellurium (Azoarcus sp)	2.9
	Pt406G	450	2	+	392	Homologo Fibrilarina (Arabidopsis thaliana)	0.44
			3	-	352	NADH: flavin oxidoreductase/NADH oxidase:FAD-dependent pyridine nucleotide-	8.5
						disulphide oxidoreductase (Chromohalobacter salexigens)	
	Pt407G	420	4	+	356	Proteína hipotética (Ustilago maydis)	0.82
			5	+	289	Proteína hipotética (Ustilago maydis)	0.49
	Pt408G	380	3	+	287	Proteína hipotética (Tetraodon nigroviridis)	1.7

¹ Tamanho da banda original re-amplificada; ² Clone seqüenciado; ³ *Primer* usado no sequenciamento (+)=T7 e (-) = SP6

Na análise dos transcritos isolados com os primers OPJ01 e T12NC os fragmentos Pt103C6 e Pt104AC4, isolados do micélio obtido com dez dias de cultivo, apresentaram similaridade com a proteína oxalato descarboxilase de Bacillus cereus, Trametes versicolor e Flammulina velutipes, assim como com a própria oxalato oxidase de C. subvermispora, recentemente descrita (Escutia et al., 2005). Ao longo do metabolismo secundário, os fungos ligninolíticos em geral secretam duas hemeproteínas com capacidade de degradar lignina, cuja atividade é de peroxidases. São elas: a lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP). Juntamente com estas enzimas são também produzidos metabólitos secundários de baixo peso molecular como o álcool veratrílico (VA) e o oxalato. O álcool veratrílico atua na degradação de lignina na reação catalisada por LiPs e o oxalato nas reações catalisadas por MnP (Zapanta et al., 1997). Além disso, durante o processo da degradação da madeira por fungos ligninolíticos os carboidratos são convertidos em açúcares monoméricos que são necessários não só como fonte de energia e crescimento do fungo, mas também para a biossíntese dos metabólitos como VA e oxalato em meios onde há limitação de nitrogênio. Nestas condições, estes fungos sintetizam a enzima oxalato descarboxilase que atua como degradador do metabólito secundário oxalato em dióxido de carbono e ácido fórmico, que podem ser utilizados na decomposição da lignina (Shimada et al., 1997). Aparentemente, este padrão de expressão diferencial coincide com a desaceleração do crescimento fúngico observado na curva da figura 2 no período entre 10 e 15 dias, que como citado anteriormente pode estar relacionado com a limitação de nitrogênio e conseqüentemente com o início da degradação da lignina pela MnP.

Observou-se também que o fragmento Pt402C4 apresentou similaridade com a enzima asparagina sintetase, que catalisa a conversão de ácido aspártico a asparagina, que é dependente de glutamina e ATP, cuja principal função é transportar e estocar nitrogênio sob condições de estresse em plantas. Outra similaridade interessante é a do fragmento Pt151C3 com o citocromo C oxidase, esta enzima atua como aceptor de elétrons durante a ação da enzima celobiose desidrogenase na degradação da madeira (Igarishi *et al.*, 1998).

Na análise com o BlastX dos fragmentos obtidos com os *primers* OPJ01 e T12NG, o fragmento Pt101G4 apresentou similaridade com proteínas do sistema de transporte do tipo ABC. Já os fragmentos Pt151G3, Pt152G1 e Pt152G2 não apresentaram similaridade com proteínas conhecidas. No entanto, quando analisados no BlastN de genomas fúngicos (<u>http://www.ncbi.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=fungi</u>); alinharam-se com um cDNA relacionado com o processo de infecção do basidiomiceto *Heterobasidion annosum*, que se expressa durante o início de crescimento (6 e 72 horas) em raíz de *Pinus sylvestris*.

O fragmento Pt202C2, isolado com os primers OPJ10 e T12NC. alinhou-se com uma proteína do tipo celobioidrolase ou celulase (CEL6B) e os fragmentos Pt205C5 e Pt206C3 apresentaram homologia a um possível citocromo P450 monoxidase e manganês superóxido dismutase. E por último, ressalta-se que para o fragmento Pt207C2, quando analisado blastN em de genomas fúngicos (http://www.ncbi.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=fungi), apresentou 0 alinhamento com um cDNA de Laccaria bicolor isolado a partir de raíz de Pinus resinosa que havia sido crescido em diferentes períodos; este mesmo fragmento, quando analisado em BlastX, apresentou homologia a uma proteína do tipo *heat-shock*.

As enzimas celulase e celobioidrolase (CBH) também denominada exoglucanase, são sintetizadas por fungos degradadores de madeira, para a hidrólise da celulose formando dissacarídeos (celobiose), tendo um papel fundamental na decomposição da madeira (Yi *et al.*, 1999). O fragmento Pt202C2 apresentou homologia com celobioidrolase de *C. versicolor*, *P. chrysosoporium* e *L. edodes*, fungos de degradação branca.

Foi encontrado também um fragmento (Pt206C3) com similaridade à enzima manganês superoxido dismutase (*MnSOD*) que tem o papel de proteger a célula dos processos oxidativos. Esta enzima catalisa a oxidação de Mn^{+3} para Mn^{+2} , necessário para induzir a produção de MnP.

Um outro fragmento (Pt206C4-) apresentou similaridade com uma possível Metalotioneina (MTs), proteínas de baixo peso molecular que transportam metais como cobre, zinco e cádmio. O cobre é um eficiente indutor de lacases, enzimas sintetizadas por fungos lignolíticos e reguladas pela família do gene *pox* (Giardina *et al.*, 2000). Muitas seqüências induzidas em resposta ao metal têm sido identificadas em regiões promotoras de três genes *pox* diferentes (Giardina *et al.*, 1999). Essas seqüências são similares às seqüências encontradas em regiões promotoras dos genes de metalotioneínas (Imbert *et al.*, 1990), cuja expressão é induzida por metais.

Um dos transcritos isolados com os primers OPJ10 e T12NC apresentou similaridade com proteína relacionada com o sistema de transporte de Fe (III), o fragmento PT101C4+. Acredita-se que compostos de baixa massa molar (300-5.000 Da), produzidos por fungos que degradam madeira em condições naturais participariam na degradação de lignina, já que o tamanho dos poros da madeira seriam demasiadamente pequenos para a ação direta de enzimas de alto peso molecular como LiP e MnP no estágio inicial de degradação (Jellison et al., 1991; Enoki et al., 1997). O papel destes compostos na biodegradação da madeira tem sido repetidamente confirmado através de validação experimental tanto para fungos de degradação branca (Parra et al., 1998 a, b; Rodrígues et al.,1999; Ferraz et al., 2001; Minussi et al., 2001; Milagres et al., 2002) como para fungos de degradação parda (Goodell et al., 1997; Enoki et al., 1997; Tanaka et al., 1998; Paszczynski et al., 1999; Xu & Goodell, 2001; Qian et al., 2002). Entre os compostos de baixa massa molar com características quelantes de metais, os compostos que quelam ferro têm sido bastante estudados (Rodríguez et al., 2003). Estes quelantes têm uma alta afinidade por ferro e são capazes de reduzir íons férricos em íons ferrosos (Xu e Goodell, 2001). O ferro reduzido pode então reagir com o peróxido de hidrogênio em uma reação do tipo Fenton para produzir radicais hidroxila, os quais são capazes de reagir tanto com a lignina como com a celulose da parede celular da madeira (Goodell et al. 1997; Qian et al., 2002). Assim, o gene correspondente ao fragmento aqui isolado deve estar envolvido na captação de ferro via quelante como já observado para outros fungos (Assmann et al., 2003; Assmann et al., manuscrito em redação).

Dentre as similaridades encontradas para fragmentos expressos diferencialmente isolados com os *primers* OPJ10 e T12NG. O fragmento Pt52G1 apresentou similaridade com NADH citocromo C oxidase, esta enzima funciona como aceptor de elétrons durante a ação da enzima celobiose desidrogenase na degradação da madeira (Igarishi *et al.*, 1998). Um outro fragmento interessante é o Pt201G1, que apresentou similaridade com a enzima manganês superoxido dismutase e que, como foi citado acima tem o papel de proteger a célula dos processos oxidativos. Esta enzima catalisa a oxidação de Mn⁺³ para Mn⁺², necessário para induzir a produção de MnP, este mesmo fragmento também foi similar a cDNAs expressos em *Fusarium oxysporum* crescidos em meio com baixa concentração de nitrogênio, que como foi citada anteriormente, esta baixa concentração do nutriente pode induzir a expressão de manganês peroxidase.

Em fungos de degradação branca os polissacarideos da madeira são degradados durante o metabolismo secundário do fungo, enquanto que a degradação da lignina devido às diversas ligações químicas ocorre durante o metabolismo secundário. A degradação da celulose é causada por um complexo multienzimático de várias endoglucanases glucosidases que clivam a celulose aleatoriamente e seguidamente são clivadas pelas exo glucanases (celobioidrolases) originando celobiose. Um fragmento (Pt154G2+) com similaridade a uma glucanase foi identificado, assim como um outro fragmento (Pt202G2+) com similaridade a uma glicosidase envolvida na hidrolise de açúcares também foi encontrada (Mai *et al.*, 2004).

Assim, os transcritos que apresentaram similaridade com proteínas possivelmente envolvidas na biodegradação da madeira, tais como: Pt103C6+, obtido com o *primer* OPJ01 que se alinhou com oxalto oxidase/oxalato descarboxilase; Pt202C2+ e PT206C3-isolados com o *primer* OPJ10 que se alinharam com celobioidrolase e manganês superóxido dismutase, respectivamente; Pt154G2+ e Pt202G2+ obtidos com os *primer* OPJ10 que se alinharam com α -1,3 glucanase e glicosidase, respectivamente, foram os clones selecionados para caracterização mais detalhada e análise do perfil de expressão durante o período de 5 a 60 dias.

7. Confirmação da expressão diferencial

a) Northern blot e Slot blot :

Na tentativa de confirmar a expressão diferencial dos transcritos envolvidos na biodegradação da madeira foram testadas as metodologias de *Northern blot* e *Slot blot*, porém estas técnicas, além de extremamente trabalhosas, não apresentaram resultados conclusivos e, devido ao tempo que requeriam para seu desenvolvimento partiu-se para uma técnica mais rápida a de PCR quantitativo em Tempo Real.

b) Análise da expressão diferencial dos fragmentos pela técnica RT-PCR quantitativo:

Após a análise no GenBank dos fragmentos diferenciais isolados pela técnica de *display* diferencial, foram selecionados fragmentos com homologias a alguns genes envolvidos na biodegradação de madeira e, realizada a confirmação e quantificação da expressão dos mesmos em diferentes dias de cultivo dentro do período de análise.

Foram selecionados os clones Pt103C6+ isolado com o *primer* OPJ01/T12NC que apresentou similaridade com oxalato descarboxilase/oxidase; Pt202C2+ isolado com o primer OPJ10/ T12NC com similaridade a celobioidrolase e Pt201G1+ isolado com o *primers* OPJ10/T12NG com similaridade manganês superóxido dismutase.

b.1) Expressão de Oxalato Oxidase:

Oxalato oxidase é expresso predominantemente em plantas superiores, catalisa a reação de oxidação do oxalato com dependência de oxigênio para dióxido de carbono e peróxido de oxigênio. A oxalato oxidase melhor caracterizada é em plantas principalmente em cereais como trigo e cevada. A importância fisiológica desta enzima foi originada pela observação de que germinina, uma proteína produzida durante o inicio da germinação de trigo, gera peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação de oxalato e acredita-se que a

produção do peróxido esteja relacionado a mecanismo de defesa em resposta a patógenos em plantas (Svedruzic *et al.*, 2005).

Estudos recentes em *C. subvermispora* mostraram que oxalato oxidase apresenta uma estrutura bastante conservada com duas isoformas C e G que mostraram identidade com oxalato descarboxilase bacteriana que também são bicupins (estrutura de β -barril duplicado) (Escutia *et al.*, 2005).

No presente trabalho foi encontrado um fragmento com similaridade a oxalato oxidase, porém também apresentou homologia com uma oxalato descarboxilase.

O fragmento que apresentou homologia com oxalato oxidase/descarboxilase neste trabalho foi submetido à análise em PCR em tempo real para a medida da expressão durante o crescimento de *C. subvermispora* nos períodos de 5 a 60 dias. O fragmento foi isolado a partir do *fingerprint* da técnica de *display* diferencial no décimo dia de crescimento em cavacos de *P. taeda*. Nas autoradiografias foi observada a expressão acentuada deste fragmento a partir do quinto dia até o vigésimo, sendo que no décimo dia apresentou-se com maior expressão que nos outros dias de cultivo, já a partir do décimo quinto dia a expressão começou cair notoriamente apresentando-se no vigésimo dia a expressão com pouca expressão.

Quando analisada a expressão deste fragmento em PCR em tempo real, foi observado que houve expressão do quinto dia de cultivo, acentuando-se no décimo dia e caindo notoriamente do décimo quinto dia. Não foi possível medir a expressão do vigésimo dia com esta técnica, provavelmente por algum problema na amostra de cDNA. Mas pelo padrão comparado pela observação da expressão entre a técnica de *display* diferencial e RT-PCR pode-se inferir que expressão deste fragmento acompanha o observado pela autorradiografia de display diferencial.

Não foi possível obter uma boa qualidade de autorradiografias da técnica de *display* diferencial para os transcritos em *Eucayiptus grandis*, porém as amostras de cDNA obtidas foram submetidas a análise em PCR em tempo real, e foi observada expressão da oxalato oxidase/descarboxilase a partir do quinto dia de cultivo até o sexagésimo, sendo que o maior pico de expressão foi observado no quadragésimo dia (**fig. 8**).

Em trabalhos envolvendo a expressão de oxalato oxidase em *C. subvermispora*, a atividade desta enzima foi medida entre dez e quinze dias de cultivo em meio liquido (Aguilar *et al.*, 1999; Escutia *et al.*, 2005), coincidindo com o padrão de expressão da enzima em *P. taeda*.

A comparação da expressão de oxalato oxidase/descarboxilase entre as madeiras de *Pinus* e *Eucalyptus* mostrou que a enzima tem maior expressão nos primeiros dias de cultivo em *Pinus* diferentemente do que acontece com *Eucalyptus*, onde a expressão maior ocorre nos últimos dias de cultivo deste trabalho, isso provavelmente se deva a que a estrutura da madeira de *Pinus* denominada como madeira mole é mais susceptível à degradação por microrganismos do que as madeiras duras como do *Eucalyptus* (Blanchete *et al.*, 1988; Blanchete *et al.*, 1994).



Figura 8. Resultado de PCR em tempo real relativo à expressão de oxalato oxidase/descarboxilase de *Ceriporiopsis subvermispora* crescido em madeiras de *P. taeda* e *E. grandis* nos períodos de 5 a 60 dias de cultivo. As medidas são comparativas em relação ao gene constitutivo gdh. A especificidade de expressão em madeira foi comprovada pela medida em micélios crescidos em meio líquido nos quais o nível de expressão de CsOxO foi nulo.

b.2) Expressão de Celobioidrolase:

Celobioidrolases são enzimas responsáveis pela degradação da celulose mineralizada. Análise no GenBank mostrou homologia do fragmento Pt202C2 com celobioidrolase de *Coriolus versicolor*, fungo de degradação branca. A análise da expressão gênica do fragmento por RT-PCR mostrou que há um aumento de expressão nos primeiros dias de cultivo tanto em *Pinus* como em *Eucalyptus*, sendo que a expressão em *Pinus* é bastante acentuada no décimo dia comparando a expressão em *Eucalyptus* (**fig. 9**).

Em trabalho recente foi mostrado que houve o decréscimo dos cristais de celulose a partir dos 14 de cultivo do fungo de degradação parda *Fomitopsis palustris* coincidindo com o padrão de expressão observada pelo PCR em tempo real em *C. subvermispora*. Diversos estudos envolvendo identificação de celulases em meio líquido foram realizados até o momento, porém uma análise molecular dessas enzimas durante o processo de degradação de madeira por fungos ainda não foi realizada. Sabe-se que pela análise em diversos meios de cultivo tanto de fungos de degradação branca como parda, as enzimas 1,4- β glucanase, celobioidrolase, 1,4- β manase e 1,4- β xilanase podem ser encontradas independentemente do tipo de meio utilizado (Valaskova e Baldrian, 2006)



Figura 9. Resultado de PCR em tempo real relativo à expressão de celobioidrolase de *Ceriporiopsis subvermispora* crescido em madeiras de *P. taeda* e *E. grandis* nos períodos de 5 a 60 dias de cultivo. As medidas são comparativas em relação ao gene constitutivo *gdh*. A especificidade de expressão em madeira foi comprovada pela medida em micélios crescidos em meio líquido nos quais o nível de expressão de CsCELH foi nulo.

b.3) Expressão de manganês superóxido dismutase:

Um fragmento que apresentou homologia com a enzima superoxido dismutase foi isolado pela técnica de display diferencial no vigésimo dia de cultivo do fungo *C*. *subvermispora* em *Pinus taeda*. Quando se utilizou a técnica PCR em tempo real para quantificar a expressão do fragmento, foi observado que houve maior expressão do quinto ao décimo dia e depois caiu notavelmente nos dias posteriores até o sexagésimo(**fig. 10**). Já observando o padrão de expressão do fragmento em *Eucalytus grandis* houve aumento de expressão a partir do vigésimo dia aumentando notavelmente no último dia de cultivo (60 dias).

No basidiomiceto de degradação branca *P. chrysosporium*, a manganês peroxidase oxida oxalato produzindo CO_2 e um radiacal formato, que posteriormente reage com O_2 originando uma segunda molécula de CO_2 e superoxido dismutase. Superoxido dismutase é reduzido por Mn2+ originando peroxido de hidrogenio e Mn3+, os quais aceleram a reação da MnP. Similarmente, glioxilato é oxidado por MnP produzindo formato e radicais formato a partir de ácidos orgânicos. Oxalato e glioxilato foram encontrados em meio líquido em *C. subvermispora* (Urzua *et al.*, 1998) o que indica uma semelhança no mecanismo de degradação por MnP entre *P. chrysosporium* e *C. subvermispora* onde a superoxido dismutase acelera a atividade de MnP.



Figura 10. Resultado de PCR em tempo real relativo à expressão de manganês superóxido dismutase de *Ceriporiopsis subvermispora* crescido em madeiras de *P. taeda* e *E. grandis* nos períodos de 5 a 60 dias de cultivo. As medidas são comparativas em relação ao gene constitutivo *gdh*. A especificidade de expressão em madeira foi comprovada pela medida em micélios crescidos em meio líquido nos quais o nível de expressão de CsSOD foi nulo.

A análise da expressão dos três genes estudados mostrou que a expressão na madeira de *Pinus taeda* (softwood) acontece com maior intensidade nos primeiros 15 dias de cultivo, diferentemente do que acontece em *Eucalytus grandis* (hardwood), onde se observa que a expressão dos genes acontece após os 15 dias de cultivo.

Reid e Paice (1994) realizaram um estudo de branqueamento da polpa Kraft por *Tramentes versicolor*, utilizando madeiras duras e moles e foi observado que este organismo coloniza preferencialmente madeiras duras e que degradam melhor o tipo de lignina de madeiras duras compostas por unidades guaiacila e siringila, do que madeiras moles compostas por unidades de guaiacila. Ligninas contendo guaiacila e siringila são mais rapidamente polimerizadas por estes fungos e parece que a estrutura do seringila aumenta a resistência da degradação nas madeiras duras *C. subvermispora* parece acompanhar este padrão, colonizando melhor *Eucalyptus* do que *Pinus* como mostra a figura 1, porém no padrão da expressão dos genes estudados não se observa uma relação direta entre preferência de colonização e expressão gênica.

Dois fatores que influenciam a degradação da madeira são a concentração de lignina e a composição dos seus monômeros. Angiospermas e várias espécies de madeiras denominadas duras que apresentam grandes quantidades de guacilpropano nas unidades de sua lignina e oferece maior resistência na degradação por fungos de degradação branca (Blanchete *et al.*, 1988; Blanchete *et al.*, 1994). A delignificação da madeira também é afetada pelo tipo de lignina, madeiras ricas em siringil lignina podem ser delignificadas extensivamente, já madeiras com baixa quantidade de sirigil que guacil lignina apresentamse não seletiva para a degradação (Agosin *et al.*, 1990; Blanchete *et al.*, 1991).

Em trabalho publicado por Ferraz *et al.*, 2001, ficou demonstrado que madeiras duras como *E. grandis* e *E. globulus* e, madeiras moles como *P. radiata* apresentaram um padrão de susceptibilidade à degradação semelhante àqueles submetidos à degradação por *T. versicor*, fungo de degradação branca.

CONCLUSÕES

Análise dos transcritos isolados pela técnica DDRT-PCR :

- A técnica de *Differential Display Reverse Transcription-PCR* possibilitou a triagem de fragmentos expressos diferencialmente durante o crescimento do fungo em *P. taeda* utilizando 3 *primers* aleatórios. Foram isolados 91 fragmentos com expressão diferencial, sendo que a maioria mostrou homologia com proteínas hipotéticas o que era esperado, pois *C. subvermispora* é um fungo relativamente pouco estudado quanto à Biologia Molecular, apesar de ser amplamente utilizado em estudos mais específicos como nos processos de biodegradação da lignina.
- A análise dos fragmentos diferenciais no GenBank possibilitou um melhor conhecimento do genoma do fungo *C. subvermispora* no que se refere ao metabolismo geral do fungo quando crescido em madeira.
- Não foi possível obter autorradiografias dos transcritos do fungo quando crescido em *E. grandis* devido, provavelmente, a contaminantes encontrados na madeira o que dificultou a marcação por radioisótopos dos cDNAs.
- Os fragmentos que apresentaram similaridade com genes envolvidos na degradação da madeira acompanharam um padrão semelhante de expressão quando comparado com a técnica de PCR quantitativo em tempo real, o que indica que DDRT-PCR foi eficiente como técnica semiquantitativa sem apresentar falsos positivos neste trabalho.

Análise dos fragmentos expressos diferencialmente utilizando a técnica RT PCR Quantitativo

- Com a técnica RT-PCR quantitativo foi possível a análise dos transcritos do fungo quando crescido em *E. grandis*, o que possibilitou um estudo comparativo da expressão gênica entre as duas madeiras *Pinus* e *Eucalyptus* assim como a confirmação da expressão diferencial dos fragmentos escolhidos neste trabalho.
- De modo geral a técnica mostrou que os genes escolhidos neste estudo são mais expressos nos primeiros dias de cultivo em *P. taeda*, já em *E. grandis* os mesmos genes foram expressos com maior intensidade nos últimos de dias de cultivo. Este resultado não contraria o que usualmente se encontra na literatura, onde fungos de degradação branca degradam mais eficientemente madeiras duras como *Eucalyptus* do que madeiras moles como *Pinus*.
- O padrão de expressão gênica de oxalato oxidase observado neste trabalho correlaciona-se com os resultados da análise bioquímica dos extratos de cultura do fungo em *P. taeda*, já que se observou um aumento significativo da expressão em 10 dias de cultivo e diminuiu após os 15 dias.
- Não se encontraram genes com similaridade a LiP e lacases no cultivo do fungo em *P. taeda* durante o período estudado, coincidindo com a análise dos estudos de atividade enzimática realizados com esta madeira.
- Transcritos com similaridade a MnP também não foram observados, apesar de que foram encontrados possíveis genes que estariam envolvidos na sua atividade, como a manganês superóxido dismutase e oxalato oxidase que geram peróxido de hidrogênio o qual acelera a atividade de manganês peróxidase sugerindo que a enzima estaria sendo expressa.
- O padrão de expressão de oxalato e manganês superóxido dismutase são parecidos, tanto em *Pinus* (no início do cultivo) quanto em *Eucalyptus* (no final do cultivo) o que indica que a oferta de peróxido de hidrogênio depende da madeira que o fungo coloniza.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSIN E, BLANCHETE RA, SILVA H, LAPIERRE C, CEASE K R, IBACH R E, ABAD A R, MUNGA P "Characterization of palo podrido, a natural process of delignification on wood" *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 65-74 (1990).
- AGUIAR AM, SOUZACRUZ PB, FERRAZ A . "Oxalic acid, Fe3+-reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*". *Enzyme and Microbial Technology 38:* 873-878 (2006).
- AGUILAR C, URZÚA U, KOENING C, VICUÑA R "Oxalato oxidase from *Ceriporiopsisi subvermispora*: biochemical and cytochemical studies". *Arch. Biochem. Biophys.* 366: 275-282 (1999).
- AKHTAR ME, FERRAZ A. "Biopulping technology transfer to Latin America NASDA project report (dados não publicados)" (1998).
- AKHTAR, M., BLANCHETTE, R. A., KIRK, T. K. "Fungal delignification and biomechanical pulping of wood. In: Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology" *New York:Springer-Verlag Berlin Heidelberg* 57: 159-195, (1997).
- ALEXOPOULUS CJ, MIMS CW, BLACKWELL M, Introductory mycology. *New York : John Wiley & Sons*, 1996.
- ALIC M, AKILESWARAN, GOLD MH "Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from *Phanerochaete chrysosporium*". *Biochim. Biophys. Acta 1338:* 1–7 (1997).
- ARO N, PAKULA T, PENTILLA M "Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi" *FEMS Microbiol. Rev.* 29:719-739 (2005).
- ARST JR HN, BIGNELL E, TILBURN J. "Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*" *Mol. Gen. Genet.* 245: 787–790 (1994).
- ASSMANN E M, OTTOBONI L M M, FERRAZ A, RODRIGUEZ J, DE MELLO M P. " Iron –responsive genes of *Phanerochaete chrysosporium* isolated by differncial display reverse transcription polymerase chai reaction" *Env. Mribiol.* 5 (9) 777-786, (2003).

- BALDRIAN P "Fungal laccases occurrence and properties". *FEMS Microbiol Rev.* 30(2): 215-242, (2006).
- BAJPAI P, MISHRA SP, MISHRA OP, KUMAR S, BAJPAI PK, SINGH S. Biochemical pulping of bagasse. *Biotechnol Prog.* 20(4):1270-1272, (2004).
- BLANCHETTE RA, KRUEGER EW, HAIGHT JE, AKHTAR ME, AKIN DE. "Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*". J. Biotechnol. 53:203-213 (1997).
- BLANCHETE RA, OBST JR, TIMELL TE. "Biodegradation of compression wood and tension by white-and brown-rot fungi" *Holzforschung*. 48: 34-42 (1994).
- BLANCHETE RA. "Delignifications by wood-decay fingi" Annual Review of *Phytopatology*. 29: 381-398 (1991).
- BLANCHETE R A, OBST J R, HEDGES J I, WELIKY K "Resistence of hardwood vessel to degradation by white rot basidiomycetes" *Can. J. Bot.* 66: 1841-1847 (1988).
- BUCHER VV, POINTING SB, HYDE KD, REDDY CA. "Production of wood decay enzymes, loss of mass, and lignin solubilization in wood by diverse tropical freshwater fungi". *Microb Ecol.* (3):331-337, (2004).
- CARPITA N, SABULARSE D, MONTEZINOS D, DELMER DP, "Determination of the pore size of cell walls of living plant cells" *Science* 205:1144-1147 (1979).
- COLLINS PJ, DOBSON A. "Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes* versicolor". Appl Environ Microbiol. 63(9):3444-3450, (1997).
- DANIEL G "Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation". *FEMS Microbiol. Rev. 13*:199-233 (1994).
- DEZOTTI M, INNOCENTINI-MEI LH, DURAN N. "Sílica immobilized enzyme catalyzed removal of chlorolignins from Eucalyptus Kraft effluent". *Journal of Biotechnology* 43: 161-167 (1995).
- EGGER C, TEMPU, ERICKSSON KE. "The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purication and characterization of laccase" *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1151-1158 (1996).

- ENOKI M, WATANABE T, HONDA YE, KUWAHARA M. "A novel fluorescent dicarboxylic acid, (Z)-1-7-nonadecadiene-2,3-dicarboxylic acid, produced by the fungus *Ceriporiopsis subvermispora*". *Chem. Letters* 54-55 (2000).
- ENOKI M, WATANABE T, NAKAGAME S, KOLLER K, MESSNER K, HONDA YE KUWAHARA M. "Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*". *FEMS Microbiol. Letters* 180:205-211 (1999).
- ENOKI A., ITAKURA S., TANAKA H. 'The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi'. *J. Biotechnol.* 53: 265-272 (1997).
- ERIKSSON K.-E.L., BLACHETTE R.A., ANDER P. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components, Springer Verlag, Heidelberg, 407p. (1990).
- ESCUTIA RM, BOWATER L, EDWARDS A, BOTTRILL AR, BURRELL MR, POLANCO R, VICUÑA R, BORNEMANN S " Cloning and sequencingof two *Ceriporipsis subvermispora* bicupin oxalate oxidase allelic isoforms: implication for the reaction specificity of oxalate oxidase and decarboxilase" *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3608-3616 (2005).
- FENGEL D, WEGENER G "Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions". De Gruyter, Berlin New York (1984).
- FERRAZ A, CORDOVA A M, MACHUCA A "Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*". *Enzyme and Microbial Technology* 32: 59-65 (2003).
- FERRAZ A, PARRA C, FREER J, BAEZA J, RODRIGUEZ J. Occurrence of ironreducing compounds in biodelignified palo podrido wood samples. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47: 203-208 (2001).
- FERRAZ A, MENDONÇA RE, SILVA FT. "Organosolv delignification of white- and brown-rotted *Eucalyptus grandis* hardwood". J. Chem. Technol. Biotechnol., 75:18-24 (2000).
- FERRAZ A, DURÁN N. "Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*". *Biodegradation*, 6:265-270 (1995).
- FERRAZ A, BAEZA JE, DURÁN N. "Softwood biodegradation by an ascomycete *Chrysonilia sitophila* (TFB 27441 strain)". *Letters Appl. Microbiol.* 13:86-91 (1991).
- FLOURNOY DS, KIRK TK, HIGHLEY T, "Wood decay by brown-rot fungi: changes in pore structure and cell wall volume". *Holzforsch* 45: 383-388 (1991).
- GASKELL J, STEWART P, KERSTEN PJ, COVERT SF, REISER J, CULLEN D. "Establishment of genetic linkage by allele-specific polymerase chain reaction: application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*" *Biotechnology 12:* 1372–1375, (1994).
- GIARDINA P, PALMIERI G, FONTANELLA B, RIVIECCIO V, SANNIA G "Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust". *Arch Biochem Biophys* 376:171–179 (2000).
- GIARDINA P, PALMIERI G, SCALONI A, FONTANELLA B, FARACO V, CENNAMO G, SANNIA G. "Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*". *Biochem. J.* 34: 655-663 (1999).
- GLENN JK, AKILESWARAN L, GOLD MH. "Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*". *Arch Biochem Biophys.* 251(2):688-96 (1986).
- GLENN JK, MORGAN MA, MAYFIELD MB, KIWAHARA M, GOLD MH "An extracellular H₂O₂ requirin enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*" *Biochem. And Biophys. Res. Comm. 114*: 1077-1083 (1983).
- GOLD MH, ALIC M. "Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*" *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57(3): 605-622 (1993).
- GOLD M H, WARIISHI H, VALLI K. "Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*"In WHITAKER, J.R.; SONNET, P.E. ED. Biocatalysis in agricultural biotechnology. Washington: American Chemical Society, 1989. p. 127-140. (ACS Symposium Series, 389).

- GUERRA A, MENDONCA R, FERRAZ A. "Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*" *Enzyme and Microbial Technology 33*: 12-18 (2003).
- GOODELL B, JELLISON J, LUI J, DANIEL G, PASZCYNSKI A. FEKETE F, KRISHNAMURTHY S, JUN L, XU G. "Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal bidegradation of wood". J. Biotechnol., 53, 133-162 (1997).
- GUTIERREZ A, DEL RIO JC, MARTINEZ-INIGO MJ, MARTINEZ MJ, MARTINEZ AT. "Production of new unsaturated lipids during wood decay by ligninolytic basidiomycetes" *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1344-1350 (2002).
- HAEMMERLI SD, LEISOLA MS, SANGLARD D, FIECHTER A, "Oxidation of benzo(a) pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. Veratryl alcohol and stability of ligninase". *J Biol Chem* 261(15): 6900-6903 (1986).
- HAMADA N, FUSE N, SHIMOSAKAM, KODAIRA R,AMANOY, KANDA T, OKAZAKIM "Cloning and characterization of a new exo-cellulase gene, *cel3*, in *Irpex lacteus*" *FEMS Microbiol. Lett.* 172: 231-237 (1999).
- HAMMEL KE, "Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi". *New J. Chem.* 20, 195-198 (1996).
- HAMMEL KE, JENSEN KA JR, MOZUCH MD, LANDUCCI LL, TIEN M, PEASE EA, "Ligninolysis by a purified lignin peroxidase". *J. Bio.l Chem.* 268(17):12274-12281 (1993).
- HAROLD JR., S.B. Taxonomy of industrially important white-rot fungi. In: Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry, ed Young, R. e Akhtar, M. New York. John Wiley & Sons, p.259-272. (1998).
- HASPER AA, VISSER J, GRAAFF LH "The Aspergillus niger transcriptional activator XlnR, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression" Mol. Microbiol. 36: 193-200 (2000).
- HEIDORNE FO, MAGALHÃES PO, FERRAZ AL, MILAGRES AMF. "Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispora* grown on

wood under biopulping conditions". *Enzyme and Microbial Technology, Irlanda (38):* 436-442, (2006).

- HIBBETT DS, DONOGHUE MJ "Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes". *Syst. Biol.* 50 (2): 215-242. (2001).
- IGARISHI K, SAMEJIMA M, ERICKSSON K E L. "Cellobiose dehydrogenase enhance *Phanerochaete crysosporium* cellobiohydrolase I activity by relieving product inhibition". *Eur. J. Biochem.* 253: 101-106 (1998).
- JELLISON J, CHANDHOKE V, GOODELL B, FEKETE F. "The isolation and immunology of iron-binding compounds produce by *Gleophyllum trabeum*". Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 805-809 (1991)
- JENSEN JR, BAO KW, KAWAI S, SREBOTNIK EE, HAMMEL K. "Manganesedependent Cleavage of Nonphenolic Lignin Structures by *C. subvermispora* in the Absence of Lignin Peroxidase". *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:3679-3686 (1996).
- KAPICH, A.N., PRIOR, B.A., LUNDELL, T., HATAKKA, A. "A rapid method to quantify peroxidant activity in cultures of wood decaying white-rot fungi". *Journal of Microbiological Methods*. 61: 261-271, (2005).
- KAPICH AN, JENSEN KAE, HAMMEL KE "Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation". *FEBS Letters* 461:115-119 (1999).
- KARAHANIAN E, CORSINI G, LOBOS S, VICUÑA R "Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*". *Biochem. Biophys Acta 1443*, 65–74. (1998).
- KIRK TK, CULLEN D. Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. New York, John Wiley and Sons, p. 273-308 (1998).
- KIRK TK, SCHULTZ E, CONNORS WJ, LORENZ LF, ZEIKUS JG."Influrnce of culture parameters on lignin metabolismby *Phanerochaete chrysosporium*" *Arch. Microbiol. 117*: 227 (1978).
- LI D, ALIC M, GOLD MH. "Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene transcription" *Appl Environ Microbiol.* 60: 3447-3449 (1994).

- LOBOS S, LARRONDO L, SALAS L, KARAHANIAN E, VICUNA R. "Cloning and molecular analysis of a cDNA and the Cs-mnp1 gene encoding a manganese peroxidase isoenzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*". *Gene*. 206(2):185-93 (1998).
- LOBOS S, LARRAÍN J, SALAS L, CULLEN DE, VICUNA, R. "Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*". *Microbiology* 140: 2691-2698 (1994).
- LOGEMANN J, FRITSCH EF, WILLMITZER L." Improved method for the isolation of RNA from plant tissues". *Analytical Biochemistry 163*:16-20 (1987).
- MAI C, KILES U, MILITZ H "Biotechnology in the wood industry" *Appl. Microbiol. Biotechnol.63:* 477-494 (2004).
- MAKELA M, GALKIN S, HATAKKA A, LUNDELL T "Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi" *Enzyme and Microbial Technology*: 30: 542-549 (2002).
- MANUBENS A, AVILA M, CANESSA P, VICUNA R. "Differential regulation of genes encoding manganese peroxidase (MnP) in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*".*Curr Genet*. 43(6): 433-438 (2003).
- MARDONES L; GOMIDE JL, FREER J, FERRAZ A, RODRIGUEZ J. "Kraft pulping of Eucalyptus nitens wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*". J. Chem. Technol. Biotechnol. 81, 608-613, (2006).
- MARGOLLES-CLARK M, ILMÉN M, PENTTILÄ M. "Expression patterns of 10 hemicellulase genes from filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources" J. Biotechnol. 57: 167–179 (1997).
- MERSLEN T, JONG DE, FIELD J A "Manganesse regulation of veratryl alcohol in whiterot fungi and its indirect effecton lignin peroxidase" *App. Environ. Microbiol.* 61: 1881-1887 (1995).

MESSNER K, FACKLER K, LAMAIPIS P, GINDL W, SREBOTNIK E, WATANABE T. "Overview of white-rot research: where we are today". *ACS Symp. Ser.* 845:73–96, (2003).

- MESSNER K, KOLLER K, WALL M B, AKHTAR M, SCOTT G R. "Fungal treatment of wood chips for chemical pulping" p 385- 419 in Raymond A. Young and Massod Akhtar (ed), Environmental Friendly Technologies for the pulp and paper industry. John Wiley & Sons. Inc., Madison, Wisconsin, 1998.
- MILAGRES AMF, ARANTES V, MEDEIROS CL, MACHUCA A. "Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching". *Enzyme Microb. Technol.* 30: 562-565 (2002).
- MINUSSI R.C., DE MORAES S.G., PASTORE G.M., DURAN N. "Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores". *Lett Appl Microbiol 33*: 21-25 (2001).
- MONDEGO J.M.C., GUERREIRO F.O., BENGTSON M.H., DRUMMOND R.D., FELIX J.M., RAMIRO D.A., MALUF M.P., SOGAYAR M.C., MENOSSI M. "Isolation and characterization of Coffea genes induced during coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) infestation. *Plant Science*, *Amsterdam*, *169*: 351-360 (2005).
- MONGOMERY H. J, MONREAL C M, YOUNG J C, SEIFERT K A "Determination of soil fungal biomass from saoil ergosterol analyses". *Soil Biol. Bichem.* 32: 1207-1217 (2000).
- ODIER E, MOZUCH MD, KALYANARAMAN B, KIRK TK, "Ligninase-mediated phenoxy radical formation and polymerization unaffected by cellobiose:quinone oxidoreductase". *Biochem.* 70: 847-852 (1988).
- ORTH AB, TIEN M. "Biotechnology of lignin biodegradation." In: Kuck (Ed). The mycota II. Genetics and biotechnology". *Springer- Verlag Berlin Heidelberg* 289-302. (1995).
- PARRA C, RODRIGUEZ J, BAEZA J, FREER J, DURAN N. "Iron-binding catecholsoxidating lignin and chlorolignin". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25, 399-402. (1998a).
- PARRA C, SANTIAGO MF, RODRIGUEZ J, DURAN N. "Hydroxamate iron complex with phenoloxidase activity acting on lignin and chlorolignins". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 719-722. (1998b)

- PASZCZYNSKI A, CRAWFORD R, FUNK D, GOODELL B. "De novo synthesis of brown rot 4,5-dimethoxycatechol and 2, 5-dimethoxyhydroquinone by the fungus *Gloeophyllum trabeum*". Appl. Environ. Microbiol., 65, 674-679. (1999)
- PASZCZYNSKI A, CRAWFORD RL, BLANCHETE, RA, "Delignification of wood chips and pulps using natural and synthetic porphyrins: models of fungal decay". *Appl Environ Microbiol* 54: 62-68 (1988).
- POLANCO R, LOBOS S, VICUÑA R. "Binding of nuclear proteins to the promoter of the laccase gene *Cs-lcs 1* from basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*" *Enzyme and Microbial Technology 30*: 525-528 (2002).
- POULUS T L, PATTERSON WR, SUNDARAMOORTHY M. "The crystal structure of ascorbate ang manganes peroxidase: the role of non-haem material on catalytic mechanism" *Biochem. Society Transaction.* 23: 228-232 (1995).
- QIAN Y, GOODELL B, FELIX CC "The effect of low molecular weight chelators on iron chelation and free radical generation as studied by ESR measurement". *Chemosphere* 48: 21-28 (2002).
- RAJAKUMAR S, GASKELL J, CULLEN D, LOBOS SE, VICUÑA R. "Lip-like genes in *Phanerochaete sordida* and *Ceriporiopsis subvermispora*, white-rot fungi from which lignin peroxide has not been detected". *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2660-2663 (1996).
- RAMOS J, ROJAS T, NAVARRO F, DAVALOS F, SANJUAN R, RUTIAGA J, YOUNG RA. "Enzymatic and fungal treatments on sugarcane bagasse for the production of mechanical pulps". *J Agric Food Chem.* 52:5057-5062, (2004).
- REID ID, PAICE MG. "Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes" *FEMS Microbiol. Rev. 13:* 369-376 (1994).
- RODRÍGUEZ J, FERRAZ A, DE MELLO MP. ACS Symposium Series 845: Role of Metals in Wood Biodegradation. In *Wood deterioration and preservation: advances in our changing world*. Goodell B., Nicholas D.D., Schultz T.P. (Eds.). Portland: Oxford University Press, pp. 154-174. (2003)
- RODRÍGUES J, CONTRERAS D, PARRA C, FREER J, BAEZA J, DURÁN N. "Pulp mill effluent treatment by Fenton-type reactions catalized by iron complexes". *Wat. Sci. Tech.* 40: 351-355. (1999)

- RODRÍGUEZ J, OSES R, PARRA C, FREER J, BAEZA J, "Siderophore Production by Lignin Degrading Fungi". Proceeding of the 5th Symposium of Chemistry of Lignins and Other Wood Components (Curitiba, Brazil): 601-604 (1997).
- RUTTLMANN-JOHNSON C, SALAS C. L, VICUÑA R. In 5th international conference on biotechnology in the pulp and paper industry (Kuwahara M., and Shimada M., eds.) pp 243-248, UNI Publishers Co. Ltd. Kyoto, Japan. (1992).
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS TE "Molecular cloning: a laboratory manual 2nd. Ed., Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. (1989).
- SARKANEN S, RAZAL RA, PICCARIELLO T, YAMAMOTO E, LEWIS NG, "Lignin peroxidase: toward a clarification of its role in vivo". *J Biol Chem* 266(6):3636-3643 (1991).
- SCOTT GM, AKHTAR M, LENTZ MJE, SWANEY RE Engineering, scale-up, and economic aspects of fungal pretreatment of wood chips. In: Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry, ed Young, R. e Akhtar, M. New York. John Wiley & Sons, p.341-384. (1998).
- SETHURAMAN A, AKIN DEE, ERIKSSON K-EL "Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*" *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27: 37-47 (1998).
- SHIMADA M, AKAMTSU Y, TOKIMATSU T, MII K, HATTORI T "Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular compound involved in brow-rot and white-rot wood decays" Journal of Biotechnology 53: 103-113 (1997).
- SOKOLOVSKY V, KALDENHOFF R, RICCI M AND RUSSO V.E.A. "Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*" Max Planck Institut für molekulare Genetik (http://www.fgsc.net/fgn37/sokol), (1995).
- SOUZACRUZ PB, SIIKAAHO M, FREER J, FERRAZ A. "Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispora* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips". *Enzyme and Microbial Technology* 34: 228-234, (2004).
- SREBOTNIK E, JENSEN K, KAWAI SE, HAMMEL K. "Evidence that *Ceriporiopsis* subvermispora degrades nonphenolic lignin structure by a one-electron-oxidation mechanism". Appl. Environ. Microbiol., 63:4435-4440 (1997).

- SREBOTNIK E, JENSEN K A JR, HAMMEL K E "Fungal degradation of recalcitrant nonphenolic lignin structures without lignin peroxidase" *Proc Natl Acad Sci U S A*. (26): 12794–12797 (1994).
- STEWART P, KERSTEN P, VANDEN WYMELENBERG A, GASKELL J, CULLEN D. "Lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*: complex regulation by carbon and nitrogen limitation and identification of a second dimorphic chromosome" *J. Bacteriol.* 174: 5035-5042 (1992).
- STEWART P AND CULLEN D "Organization and differential regulation a cluster of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*" J. Bacteriol.181: 3427-3432 (1999).
- SVEDRUZIC D, JONSSON S, TOYOTA CG, REINHARDT LA, RICAGNO S, LINDQVIST Y, RICHARDS NG. "The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms". Arch Biochem Biophys. 433:176-92 (2005).
- TANAKA H., ITAKURA S., ENOKI A. "Hidroxyl radical generation by an extracellular lowmolecular- weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*". J. Biotechnol. 75: 57-70. (1998).
- TELLO M, CORSINI G, LARRONDO LF, SALAS L, LOBOS S, VICUNA R. "Characterization of three new manganese peroxidase genes from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*". *Biochim Biophys Acta.* 1490(1-2):137-44 (2000).
- TEPFER M, TAYLOR IEP, "The permeability of plant cell walls as measured by gelfiltration chromatography". *Science: 213*, 761-763. 1981.
- TIEN M, KIRK TK "Lignin –degradingenzyme from hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds" Science 221: 661-663 (1983).
- URZÚA U, KERSTEN PJ, VICUÑA R "Kinetics of Mn3+-Oxalate Formation and Decay in Reactions Catalyzed by Manganese Peroxidase of *Ceriporiopsis subvermispora*". *Arch. Biochem. Biophysics 360:* 215–222, (1998).
- VALASKOVA V, BALDRIAN P "Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*". *Res Microbiol.* 157(2):119-124 (2006).

- VALLIM MA, JANSE BJH, GASKEL J, PIZZIRANI-KLEINER AA, CULLEN D "*Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase and cellobiose dehydrogenase transcripts in wood". *Appl, Enviro. Microbiol.* 64: 1924-1928. (1998).
- WATANABE T, KATAYAMA S, ENOKI M, HONDA Y, KUWAHARA M "Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese-dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Bjerkandera adusta*" *Eur. J. Biochem.* 267: 4222-4231 (2000).
- WELSH J, PRETZMAN C, POSTIC D, SAINT GIRONS I, BARANTON G, MC CLELLAND M. "Geomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phyletic groups". *Int J Syst Bacteriol.* 42(3):370-7 (1992).
- WHITELEY CG, LEE DJ. "Enzyme technology and biological remediation" *Enzyme Microb. Technol.* 38: 291-316, (2006).
- WONG KK, MC CLELLAND M "Stress-inducible gene of *Salmonella typhimurium* identified by arbitrarily primed PCRofRNA".*Proc Natl Acad Sci U S A*. *91*(2): 639-43 1994.
- XU G, GOODELL B. "Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi: chelatormediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose". *J. Biotechnol.* 87: 43-57. (2001).
- ZAPANTA L S END TIEN M "The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation" *Journal of Biotechnology* 53: 93-102 (1997).

Seqüências dos transcritos de *C. subvermispora* isolados a partir do cultivo em P. taeda e obtidas utilizando-se o *primer* –OPJ01/T12VC

I. PT51C3+

II.PT52C3+

 $GGGGGCTCAAACTAATATATTTTATGGACACTCTCATCGTGGGTATTCGACAAGGTTGGAGCAGGCTCGTCCACCTTCAGTG\\GTCATCGTCCTCGGGACGACTGCATACGAAGCCGTCCTTTACATAGATCCTCTTGTTGTGCGCGCAGAACCGTTGGTACTT\\TCCTGGACATATGGACCCTTACTGAGCTCGTGCCTTCCTGTTATGCCGGGA$

РТ52С3-

 $\label{eq:constraint} TCCCGGCATNAACAGGGAAGGGCACGAGGCTCAGTAAGGGTCCATATGTCAGGGAAAGTACCAACGGTTCTGCGCGCACA ACAAGGAGGGATCTATGTNAAAGGGACGGCTTCGTATGCAGTCGTCCCGAGGGACGATGACCACTGNAAGGTGGGACGA GCCTGCTCAACCTTGTCGAATATCCACGATGAGAGGGTGTCATAAAATATATTAGTTTGAGCCCC \\$

III. PT101C3+

AGTGGAGGTNNTNTATTCGCATATTCGGAGGATGTTNGCGGGGGGGNGNACTTGTGGCATNGGGNACCCCNCCNCTCCNCGN CCGGNCANCTNNNCTNCTNCTNTNTGCTACCANNNCAANNANATCNNANNNGTNCNAATTNCCNCNNACCNTNNTNNNC ANTCCTTNCCNNTACTCAANTTTTATTNCCNNNNNCNTTATANTCNACCANTCCTTCTCTNCNCTANCCTANCANNCTAAN CANTCNTCTTCCTCNGNNCATC

PT101C3-

CCCCGGCCATAAACAGGCGAGTGGTCCGNAAAAGGCGGCAAGGCAGTGTACTTTGCAAGATATCCCCATGCCATCTACGT CTCGTTCTCAGAGTCTANTGCTTACCCTATGCTGGGCCTTTCCCGACGAGCGGCACCATTGTAAACTAGCCATCCACACCC GCATCTCTTATTCAGCCCAGACTTTGACTTTGCGACCCCTCCATAATCTTCCAATTAGCTGCCTATGCATATCCAGTTATCT ACACTGTAAANAATCCATCGACC

IV. PT103C6+

V. PT104AC4 +

GGGGGAGGCCACATGTTNTTTTTAAATTTAAAAANGGGGAGGAAAANAANNANNAAAANGNGGGGGNNCCTCNTCCCCN GCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

VI. PT104C3+

PT104C3-

CCCTNTGGTCGACCTGCAGGCGGNCGCGAATTNNTTTTGATTCCCGGCNTAATTACCTGGGNTTGGTAATAAGTCATNANG TACGCTGGCAAGCAGTAAATGGNCGAATTCGCGGTTCCTGAAATTCNGNTTTAGTGCCNAATTACCNATAATNGTCAANN GNAGCNNTNGAGTACCACNGGGGTTATTCGCCNTGTGAAGCNATTTNATNTNNNATANTNAANNTNTCCNATTTTNGGN NACCCTNCC

VII. PT151C3+

PT151C3-

VIII. PT401AC2+

PT401AC2-

IX. PT401C3+

X. PT402C4+

PT402C4-

XI. PT404C3+

CCCGGCTAACACATAAATATTCGATTAGGATGCCTCTGTAATAGCTGCTTGTATTTAAAGGAAGCAATAACATCGGCTCCT AAAATATAGGCATCATTTTTATAGGCAACCTGACCAATAGCTATACCATAATCACTGGGCGAACCGGCGTTTTTAGCCCCG GTTAGTGAAACCTCGGTTNGAAAAAAACATGGCCCATGCTTTGCGCATAGAAACGGTACCTGTAAAAACCTAATTTAGAAC GTACATCTCCAATTATATAAGAGGGTCCGAGACCAAAACCCACTCCCATGTTTACGCGGGNTTACAGGGTANGGAACTGGT TTNGNGGNATTCATTATGGCTGGGGCATTATCTTAAGGGGATNTAAAACTGGTTTTCCAANCCCTCCCAANNGGTTGGGGC CGNNGGAGCCTTTTTATGCNGGNANCATTANGGAAATCCNGGGCCCCGGGGGGGCCNCCTTNGGGGGAANCCC **PT404C3-**

TGGGCCTGTTTTTTCTATCCCGAGGTTCACTAACCGGGGGCTAAAACGCCCGGTTCCCCAGNGATTATGGGATAACTATTGG NCCAGGTTGCCTATAAAAANGANGCCTATTTTTTAGGACCCCGNNGTTNTNGCTTTTTTTAAAA

XII. PT405C2+

PT405C2-

XIII. PT60 2C3+

PT 60 2C 3 -

TGTCTTTCTGCTCCTGCAGGGCGGNTTCCAGCTTCTCCGTTGCATTCTCGTCCTCTACCGGCTCATTCAGGTGTGAAGTGCC GGCTGCATTTTCGTCAGTATTGATATCCAATCTGTTGTCTTTTTCGGCAGATTCCGTTTTTTGCGTTATTTCTTGCTCTTCCAT AGTATGATTACGTTATGCCGGGA

XIV.PT603C1+

PT 60 3C 1-

 ${\tt TACACTTGTCCATTCATATGTTTTACTTGGCTCCACACCGTCATTCTGGATAAAACCCATATCAAANAACGNAAGCCGGGA TCATATGAATCGCGGCCGCCGCCGCCGACCNNAGGGAGAGTCCCAAGCGGGGAGNAAAGNCTNC}$

XV.PT603C2+

ACCGCTCTTTGGCTGTTCTTCTACGGAAATTATCGAATTCGGCCATCAGGCGCAGGTATTTGTCTTTCTGCTCCTGCAGGGGC GGTTTCCAGCTTCTCCGTTGCATTCTCGTCCTCTACCGGCTCATTCAGGTGTGAAGTGCCGGCTGCATTTTCGTCAGTATTG ATATCCAATCTGTTGTCTTTTTCGGCAGATTCCGTTTTTTTGCGTTATTTCTTGCTCTTCCATAGTATGATTACGTTATGCCGG GA

РТ603С2-

CCCGGCNTNACGTNNTCATACTATGGAAGAGCAAGAAATAACGCAAAAAAACGGAATCTGCCGAAAAAAGACAACAGATTG GATATCAATACTGACGAAAATGCAGCCGGCACTTCACACCTGAATGAGCCGGTAGAGGACGAGAATGCAACGGAGAAGC TGGAAACCGCCCTGCAGGAGCAGAAAGACAAATACCTGCGCCTGATGGCCGAATTCGATAATTTCCGTAGAAGAACAGCC AAAGAGCGGT

XVI.PT604C5+

Seqüências dos transcritos de *C. subvermispora* isolados a partir do cultivo em P. taeda e obtidas utilizando-se o *primer* –OPJ01/T12VG

I. PT54G4+

CCCGGCATAACGAATCCTACTCGGCAATGCTAACATGCTGTTTCCTGCTAGAATTATCGACATTATGTGGGACTACTTGGG GAACTATCAAGGACTATAGTTTAGCGGCCTATTCCCAAATGCCATGCGATCCTTGGTACCATCAGGCTTAACCCTGACACG ATTGTCACCCATAGCAGCCCTCCCCATTTGGATACCTCCCAA

PT54G4-

II. PT101G4+

III.PT151G1+

PT151G1-

PT151G2-

V.PT151G3+

CCCGGCATAAATAAAACTTTTTGTTGCTATTCTGAGAAAATGAGATGAANCAAGATCCNTGGTAATATAAGGAANGGCAA ATGCCACGATTAATAGNAATATACTACAAAAAATCATGCGGGAACTGGGAGATTCGAACTCACGACACTTAAGNAAAGG GNGCNGATTTTCAAGATCAGNGCCTTAAACCACTCGACCAAATTCCCCCCCTCTTTGCTAAAAGGCAAGAGCANAAGAAA ACAGATAAATTTTTAAAAAAGAAAAAAAAAAATAATTGGGNAACACTGGGGACTAACTATACACAACACTTAGCCAAAN **PT152G1-**

TTTTTTTTTTTTTTAANNTTTTNTGGGCTAAGGNGCGTGTATAGTTAGTNCACAGCCGTTAAACAATNATTTTTTTTC TTTTTTAAAAANNTANCGGGNTTCNTTTGCTCTTGCCTTTTACCAANAGAGGGGGGGAATTTGGTCGAGTGGNTTAAGGCAC TGATCTTGAAAATCAGCACACTTTACTTAAGNGTNCGTGAGTGGCGAATCTCACAGTACCCGCATGATTTTTTGNAGNATA NTACTATTAATCGGGGGCATTNGCCATTCCTTATATTAACCAGGNTCTTGANTCATCTCATTTTCTCANAANAGCAACTATCA GTTNTATTTATGCCGGG

VII.PT15 2G 2+

PT15 2G 2 -

PT401G3-

IX. PT401G4+

PT401G4-

Seqüências dos transcritos de *C. subvermispora* isolados a partir do cultivo em P. taeda e obtidas utilizando-se o *primer* –OPJ04/T12VC

I. PT101C1+

TCGNTAAACGAGAGTTTCCAAGGGGGCAGGTTGCGCCAAAATCGATTCCGAACACGGCCAAGGTGGTCGCTGGTAGCGAA AGGCCGATGCCTTTTNGGAACTGCCACGAGGGGCCAAAGCAGTTGGTGTGAAAGCAAGTTCGGACGACGTGCCCTATGGA CATACAGGCGTCGTGATCGATCCCAAGAACATGGTTTCTGTTCACACCTTTCAACCTTTCCAGACACCCCAACCACGTACT CAACACTGCCGCAGAGGTGTCATCGGGTCCCCCCACCCAGGAGGCGTCGTCTAGGGTCGCCAGTCACCATCTATCCGATTA GTGCTCTGTCGCCCGCAATTTGGTCCTTCCCGATGTAANTACGGGCCTTCAGCAATAGAAATATTACTTCACTCTCCGCAA AAAAAAAAA

II. PT101C4+

III. PT102C1+

PT102C1-

TCCGAACACGGGCTGGCACTCGACGTCGAATTTTCTTACGTCATGGACACCTTCGAGAATGTCGAGATCTACAACCTCGTC ATGAAGTTGCTCGGTATCGAGGAACACGCCGCTGTGACGAATGGCACGGAGGGTTTCTGGGACAAGTTCTTCTAGTCACC TGCCCAGTTTGAGTTTATGATTTCTCATGATTGCAATGTTTGGATAGACGATATCGTGCTGGGAAACGGTTTGTAGAGCTG TCGCATAGATCCGTAATTTGCGGCTGGTAGTGTACCATAGTTGTTCCGAGAGCATGTAATACATTATTATTCCGCGGGAAA AAAAAAAA

IV. PT103C1+

V. PT103C5+

VI. PT151C1+

CCGAACACGGTAAAAGACTGGATTGCCTTTGTATTCAAATCCATCATAGCTTATATCATCATCATATCAAAATGTTTGAGCAT TGGAGCATGGTACTGCAGGTCTTAATGTTCAAGCACTGCTTTGTAACAAAGCAAGGAGAGCTGTAATGATGTAGTGCTTTG TGAACATGCAGGGGAATGGTAGAAAGAGAGGGGGAAAGCATGACTTAGACCTTGTTTCTACTGATACTGTCTTGACTGCTG CTACTGAGCCGTTCTATTGGCTTCTGCTTTCAGCCTTCTATTCTTTGAAAACTTCCTGTAATTACTATAAAGTTGTCCGCTAA TATGGGCAATAAATACATTGGTAATATTTGCTGCATAATTTGCGCACTGCAGGTAAATTTAAAAAAATTCTATATAGACAC TATTACACACAACTTGTTCCAGACGTTTCTAGAAGATGATGTAGATCTGGCTAAAATGAGATGTGGGTCACATTATAAAACT GTCCTTGATATTATCATATCTCTCAATTTCTTACTGCATTAGTATAAGTCTCAGATTGAATGGAGACTTTGTGGACTCCCTT CTCATTATGATACAGACATGAGCCCATACAAGGGCCTGCAGTCCCAGGATATGAGATCAGTAGAAGATGTAGTATCAATGGTGAT AAAGTAAAACATATAGTACTGGCATCTCTTTTATCCTCAAGGTGGGGGTTGAAAAAGTGGGGGTTATCTTTGGGAACCCTAG GTATCCCAAACCCCACTTCCGGATTAATGACCTCCACCATGGCTAAAGGGGGACCCTTTGCTGCC VIL PT152C1+

CAGAAAAGGCACTATGATGAAGACAGGTCGAGATATTCTAGAATAATCGTCGCAAGAANTTGAAAAACAAATGTGCGTAC AGACCAAATCCAAAGCGTTCCAAAAACCTGAATGGCCTGAACGGACTCTCCNTACCGGGGTTCGGA

PT152C1-

VIII. PT152C2-

IX. PT201C2+

PT201C2-

X. PT201C3+

PT201C3-

XI. PT202C6+

CCGAACACGGAGANCAGGGAGGAAGACGGCGGAGTTGTATGAACTATCTTTATGCCCCATTGCCGGACGGCCTCGCGCAT ACCTCAGCATCCCTGCGCCACCCGTTGGTGGTCGCGAGCACGTATCCATATCCATGACCCATGCACGCATGCTTGATTTGT CTGCCGCGCATCCACCCCCTGTATAATAGTGTATATGGTAGTACAGCAATACAAGCAGGCCTACGCCTATACCCGCAAAA AAAAAAAAA

XII. PT203C1+

XIII. PT203C3+

XIV. PT401C2-

TCCGAACACGGGCAGGGTGGTNTCGTTCCGACGGGCGGGAGATCGGGTGTCGGTGTTGTTNGCGTGAGAGGGGCTGAGTT GGAATTTATCTATGCTGTCTTGAGATGCGTATCGCTGGACTTTTAGATTCCCTCGTAGATGTTCGAATGTGTACCAATCGAC ATGGCTGCGCAAAATAGGTTCATTGCAATGTTGCAAAACGACATCTAGAGTCATCAGCGATTCGTATCTCATCACCAAGTC AGAATCATATAATGGTATTCATAACGCATTTGAGCGGATCCTGCGGTTGCACACAAGTAGCTAGATTCGACCCATTTTGT ATGACACGTGGCAGAGCCTAGTAGCCACTCATTCCGTCCTATACACCTGTATTCACCAATCCGTAGCAGAGTGCAGTATTA TCCAGACCTAATGAGGACAGAACGGAGTGTGCCGACATGGGCCGACCATTTCCATCTGGGCAACTGGAAGAAAGGANGG AAGCCNCTTCTGGNCCNCTTCNGNANAGTAGCCATATNAATCCTCCCTGANGAGTTGACAAATACCCTNTGAATACTGTCC AANCNTTTNTNCNANANGNGGGTATAACGTTNNNGANGGGGANCTTCTATGTNCCCCGGANGCTNAAAAANGGCCAGGG NTACAAACCCCCCCCNCGGTTNTAAAANTGAACACCGCNCTTNTNTTTTGAAAANAAGGAAACCTTTCCCCCTNCCTTNC CCCGGNTGGGAAAAAAATCT

XV. PT401C2+

CCGNGNGANGGGAGGGAAGCGAAGACGAGGATAAGGATTCTTGATGTTCAGATAGCAGTAGAGCCGATGGTCAGTATNA CGAAACAGTCGACGAGGACTGTAGCACATGGGCCCTATGTCTAGCGATCCAGAGAGCATATGAAGCTCTCCATTCAGCAA CGTTATACGCACGTCTCGGATTAGAATGATTTGGACATGTAATTCATAGTGTATTTGTCAACTCATCAGAGAGGAATTATA TAGGCTACTATACTGAAGTGGACCATGAAGTGGCTTTCCATCCTTTCTTCCAGTTTGCCCAGATTGTAATGGTCGGCCCATG TCAGCACACTCCGTTCTGTCCTCATTAGGTCTGGATAATACTGCACTCTGCTACGGATTGGTGAATACAGGTGTATAGGAC GGAAATGAGTGGCTACTAGGCTCTGCCACGTGTCATACAAAAATGGGTCGAACTAGCTACTTGTGTGCAACCGCCAGGAT CGCTCAAATGCGTTATGAATACCTTATATGATCTGACTTGGGGATGAAANACAAACCCTGAGACTCTAGATGNCGNTTTTG CAACNTGCATGAACCANTTTGNCNACCCTNTCGATGGNCCNTTCCACATCTNCCAGGGATCTTAANGCCCGGNCCCTTTCA

XVI. PT401C4+

PT401C4-

GTGATTCCGAACACGGGCCAGGGTGGNTATCGTTCCGNACGGGCGGGTAGATCGGGTGTCGGTGTTGTTNGCGTGAGAGG GGCTGAGTTGGAATTTATCTATGCTGTCTTGAGATGCGTATCGCTGGACTTTTAGATTCCCTCGTAGATGTTCGAATGTGTA CCAATCGACATGGCTGCGCAAAATAGGTTCATTGCAATGTTGCAAAACGACATCTAGAGTCATCAGCGGATTCGTATCTCAT CACCAAGTCAGAATCATATAATGGTATTCATAACGCATTTGAGCGGATCCTGCGGTTGCACACAAGTAGCTAGATTCGACC CATTTTTGTATGACACGTGGCAGAGCCTAGTAGCCACTCATTCCGTCCTATACACCTGTATTCACCAATCCGTAGCAGAGT GCANTATTATCCAGACCTAATGAGGGACAGAACGGGAGTGGGCTGACATGGGGCCGACCATTACAATCTGGAGCAAACT GGGAAGAAAGGATGGGAAAGCCNCTTCATGGGNCCACTTTCNGNATAGGGAGCCTATATAANTTCCTCTCTGAAGGAGGTT GACCAAAACCACTATGGAATTNANTGGTCCAANTCTTCTAATCCNAAANGGNGNTTTAANNTNNTTGAAAGGAAGAAGANT TCTNATNCTCCCTGGGATNCCNAANANAANGNCCCATGNGGTNCAAGTCCCCCTCGAACNTNTTCNTAAAANTNANANCC GGTTCCTCNTGNTTTNGNAAAATAAGAANACTATTNCTNGGTCTTCNNTCCNCCCNGNNNGGGAACAAAATCCCCNGGNC XVII. PT402C1+

TTNGGGNTTTTTTGCCCAGCACAAGCACGTGATTNTTTTGCTACTTAGTTATCCCGTGTTCGGCTGAAACAATCNNNGACTT CTGTTAGAGGATTTAAACAATAATGTGTGTATAATGTGTTACCAGGAGCCGTGTTCGGA

PT402C1-

XVIII. PT402C4+

PT402C4-

CCAGTCGGGAAAACTGTCGNGGCNGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGANAGGCGGGTTGCGTATTGGGCGCTC TTCCCTTCCTCGCTCANTGAATCCTGCGCTCGGGCGTTCGCTGCGGGGAANGGTATCNCTCCTCCAAGGGGGGAATACGGT TNTCCCCCAATCCGGGGATACCCNGGAAAAAANTGNGNAGCAAAGGCCNCCAAAGGGCCNAACCNTNAAAAGGNCCGTT GTNGGGGNTTTTCTNAGGCNCCCCCCCGGAAAAAATN

XIX. PT403C+

Seqüências dos transcritos de *C. subvermispora* isolados a partir do cultivo em P. taeda e obtidas utilizando-se o *primer* –OPJ04/T12VG

I. PT105G1+

II. PT105G2+

PT105G2-

III. PT602G1+

Seqüências dos transcritos de *C. subvermispora* isolados a partir do cultivo em P. taeda e obtidas utilizando-se o *primer* –OPJ10/T12VC

I. Pt101C1+

ANATNNCCANNTNNNTTGAAACCTGAATGGGCCCGAGTTGCAGCTCCCGGCCGCCAGGCGGCGGCGGGGAATCGATAAG CCCGNTTTAACTATCAACCGAATGAGTAACGAACTGCTGTAAGCCAG

II. Pt102C3+

III. Pt103C3+

Pt103C3-

IV. PT151C2+

V. PT151C5+

AAGCCCGATTTTGANTACACGGTGATAGCACCCGTACGGACGCCTACTGGCCAGNATCTGAATGACGTCCAAGTCAGACA TTCTCGCTGGGTATACGCACCTGACGAAACGAGGTGCGCCGTTGACGGTGAGCGCTGTCCTTGCAGTTAGGTTATCATATT TGTTTATCGTTTGAGTCTNAGGGTN

PT151C5-

TTTTNNNAAGNCCGCGGNANGCCCGCNCGGGNGNAGNATTCGGCCAAAATATCGNANGCAAGGCGAGCACCTCAACGTN NGNACAACTGGGCCCACCAGGCGCTTNANCCCGCCANCATNTCACCTNCCGGAAGCCTAACACAACNCATGCANACGTTC TCATCAGGCTCGTNAAACGNAGNACCCANAAAAAAGTACTGCGATGTACATGGNAGCCACCTNANGCTNCCATNAGGTG NCCCGCACGGCNGANACCGTNCANTCCCACACACGTTCTTCAAGCGCACCTAACAGAANCANACGNNCCATAAACTGCCN AAGTNACCCTGNGTNTCCANANGNACANACNATANATGNAAACACCNAANCCGCNANGGAACAGCGNCNCACCGCAANC CGGCGCCACNCTCGTTTTAGACAGGNGCGNATCCCAGCGGNGCAAAGNCCCGGNCTNAGNGNCGTNNATANAAGANACC GCNCCANCAGCNNNCNNGCACGGGANNCTNAAANACNGGNCCTATNCAACCCNCNGACCNTTACCTCNANTCCCCNGC NACGGNNCNGGGTCGCTCCNATCACAACNCCACNATACNNCCCCCCNNCCCCCCTNANNTC

V. PT151C6+

AAGCCCGNGGTCTTGTNTGTCGTCGAANATCTTGAGNAGGTCGCCAGTATAAATCTTGAGGTGCCGCCGCAAGNACTTGC GCAGGTCGCCAGGTCTTGAGGTGTCGCCAAATACCTTGTAAATGTTCGCCAGTAGAGNATCTTGAGGCTATGCCGACAATC TTC

PT151C6-

TTTTGAAACCCNNTGNGANACNCCCAGGGCGTTGGNCCNACTATCCCCANATGGTCCGNACCTGTCAGGNCGGCACGCGA AATCTTACTCATTTTATTCAAGNCCCGAANGTATCATANAGAAGGNTNCTTTACTTNCCACTCCAGNATGCTCACCNCCAG ACCTTTCTGACGCCCNCGGGTTCANCGGGTAGGGACCGNCCANTACNTCCGNCTGACTACGTATACGGNATACTCGTCAC CTAGANTTACGGTTTCGNGTTACGGAACTGNCNAACGGTTCANNTNCATGACACCCGTTCTTTCAGGANCGNGCNTTGNG CTAGNTNANCTAATACNAAGNGGTGCGATAAAAGCCTNNTCNAACTGCCCGANCCTGNACGGNNANACTTCATAGGANG TTGCCGNNCCACNAGTNAAGGCANCCNNCNNGGNCCGANTAACCCTTCNNAGAANCATCTNTGGANCTCAAACNNNGTT AAANGNACNACTTNAGCGACGNATCCGTNCCCACAAGTCCCAANCGCNCAAAGGCNTCTCANGNTNNNANNAAGNANCC TCNCGGGTCNGATTNNNNCNCNTNCNGNACGGCACNTNCCCACNTNCCCNNCGGAANNTTCTNGCCCNCACANTANCNNC ANNANCACACCCCNCGTCCGGTACTTNACACNNAANGGNTCAAAGGTGACTAGNTANTAAAACATCTTNNGGNNCGATN CCCCTNCNACNGGCNCTNCTCNCNATCNTNNNNCNANNANGNACGCTCNGGNNNNNACACCCCCCNANNNNCANNACCN

VI. Pt153C2+

Pt153C2-

AATTNCNTNGNTGCCGCTTGGAGTGGATCGGNCAAAATATCGTATGAAGCGAGTCTTCAACGTTGTCAACTGGCCCACCA GGTGCTTATCCGCATCATTCACCTTCGAAGCCTCCACAACGATGATACGTCTCATCAGGCTGTAAATGAGAACCCATATAA ATGACTCGATGTCATGGTGCACCTTATGCTCCATAGGTGGCCCGACGGCGTTCTGTTCATTCCACACACGTTCTTCAAGCG ACTCTAACAGAACAACGGCCATAAACTGCAATGTACCCTGAGACTCAAACGATAAACAAATATGGATAACCTAACTGCAA GGACAGCGCTCACCGTCATCGGCGCACCTCGTTTCGTCAGGTGCGTTATCCCAGCGAGAAATGTCTGACTTGGACGTCATT CAGAATCTGGCCAGTAGGCGTCCGTACGGGTGCTATCACCGTGTATTCAACCCTCGGCCTTA

VII. Pt202C2+

CATGGAATCCCGTANGGTGACATCGCATTGACAAGCAACCCGGACACTTTTGTATACATATCGTACACTGGCAATCTACGC TNAAAACATCTCACGCCGCATCGGCGGGTTCGCCTGTGAGACAATGTCTGGAAGTACTCCTGGAACCATGTACCGGCCTC GGGCTTA

Pt202C2-

AATTTTTNTNGGCCGGTACATGGTTCCAGGGAGTGCTNGCATACATTGGATCTCACAGGCGNAACCCGCCGATGCGGCGT GAGAAGTTTTAGCCGTAAGAATGGCCCAGTGGTACCGAATANTGTATCAAAAAGTGGTCGGGTTGCTTGCCAATGNCGAA GGTCAACCATTNCGGGNAGTTTCCATG

VIII. Pt204C5+

AACCCGNGGTTCATGCTCAGGGCGCTACGCGTGCCAATCGCTGGAGTGACTGTTGGTGCTGGAGGTCTTACCTATGCCAAC TACAAATTTGAAGGTGAGTTATATTGATTAGTTGTTCAATACGGAGGGGTGACAGTCCTCGTGTGCTAACAGAGTTCAGGA AAAACGTCCGCAAACTGGATAGCGACCGCGCAGGATACTGCTGCAGACTTGCTCGATACCGCCTCGGGGCTTA Pt204C5-

AATNCCGTGGCGGTATCGAGCAAGTCTGCAGCAGTATCCTGCGCGGTCGCTATCCAGTTTGCGGACGTTTTCCTGAACTCT GTTAGCACACGAGGGACTGTCACCCCTCCGTTATTGAACAACTAATCAATATAACTCACCTTCAAATTTGTAGTTGGCATA GGTAAGACCTCCAGCACCAACAGTCACTCCAGCGATTGGCACGCGTAGCGCCCTGAGCATGAACCTCGGGCTT IX. Pt205C1+

Pt205C1-

X. PT205C5+

PT205C5-

TTTTTTTTTTTTTCCACTACATNACTACATACTTATTCAAATACAGTAAGAGTTACATCTACAGTTAATCGTGCACATGCA ACAAATGGTCTGATTGCATGGCACCAGAACATGTTGATTCCTTCGGCAGCACAGCTCATAGTTCATATGCCAGGAAGAAC AGTACTTCGCAGGCCAACTCGTACCCTAGACCATTTGCTGTAATAAGGACGGCACGCCTCGCGGATGGACGCTTCCATTCT GGTGAGAGAGGCAATTGAAGCGCTACATACCCTTCCCGGGGTTCTCTGTAACAGCTTGAGATTGTTAAGCACGTCATCCGGT GTCTCCGGTACATGTGCATTTGCAGGAATGGGGTCCACTTGAGAGCGTTCCGGAGCTCAAAGCTAGCATATTTGTATTGGT CGAGGATCGCCCGACACTCTTGAGAGGGTGCCATTATATCCCTCGGGGCTT

XI. PT206C3+

AAGCCCGAGGGATATAATTGGCACCCTCTCAAGAGTTGTCGGGCGATCCTCGACCAATACAAATATGCTAGCTTTGAGCA TCCGGAACGCTCTCAAGTGGACCCCATTCCTGCAAATGCACATGTACCGGAGACACCGGATGACGTGCTTAACAATCTCA AGCTGTTACAGAGAACCCGGGAAGGGTATGTAGCGCTTCAATTGCCTCTCTCACCAAAATGGAAGCNTCCNTCCGCGAGG CGNGCCGTCNTTATTACAGNAAANGGNCTANTNACNNTTCCCCNANAAATTTTT

РТ206С3-

TGNNNNNNTCNNNNTTCCANGCNAGTTTCNAGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAGTGG ATTAAGCCCGAGGGACATAATTGGCACCCTCTCAAGAGTTGTCGGGCGATCCTCGACCAATACAAATATGCTAGCTTTGA GCATCCGGAACGCTCTCAAGTGGACCCCATTCCTGCAAATGCACATGTACCGGAGACACCGGATGACGTGCTTAACAATC TCAAGCTGTTACAGAGAACCCGGGAAGGGTATGTAGCGCTTCAATTGCCTCTCTCACCAGAATGGAAGCGTCCATCGCG AGGCGTGCCGTCCTTATTACAGCAAATGGTCTAGGGTACGAGTTGGCCTGCGAAGTACTGTTCTTCCTGGCATATGAACTA TGAGCTGTGCCGCCGAANGAATCAACATGTTCTGGTGCCATGCATTTTTTTCCTCGGCTTAGAAANAAAAATTGC

XII. PT206C4+

PT206C4-

XIII. PT206C6+

AAGCCCGAGGCAAATTACGTGGTAAAAAAAAAAAAAA

PT206C6-

TTTTTTTTTTTTTCCACGTAATTTGCCTCGGGCTT

XIV. PT207C1+

ATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGGAACCGTAAAAAG GCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCG AAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCT TACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTG TAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACGCTGCGCCTTATCGGTAACTATCGTCT TGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTANCANAACGAGGTATGTAA GGCGGGGGCTACAGAGTTCTTGAAGNGGGGGGCTAACTTCGGCTACNCTANAANAACAATTNTTTGNATCTGCGCTCTNGTG AAACCAGNTTNCTTCGGNAAAAA

PT207C1-

XV. PT207C2+

CACGGATAGCAATCTGACTTGANATGGACCTNGGCCTTNANNAAAATCCCGCCCCCCGGGGGGGNNANGNAAANTNNN CCCCCCACCCCCCCCCCCCTTNNGGGGNNATAAANNANATTTNNCGGNNCGTNGTTNTACCNCNTGGNGGGGGNAAAANN CGGAAACNNCCCCAATTTAANCACTTTNAGCCCNTCCCCCTTTCCCCNTTGNGTAATNNNNAAAAAAACCNNAAANGACGC CCTTCCCAACANTTNNCANCCTGAAGGG

PT207C2-

GNNNNNNNNNNTTCCNAGNNNNTTTCCAAGGNTCTCCATATGNTCNACCTGCANGCGGCCGCGAATTCACTAGTGGATT AAGCCCGAGGGGATAAGGCTCCTCTTCATATGCTCGTCTTCCTGCAGTGCCTCCTGTGGGTCGTTTCATTCGATTTCTTCTT TTTTTTCACCCCGTACCAATCTGCGTCGTCCCTGCGTCCCTGAATTTCTCCAGTTTTTACCCGGAGGACGCGTACAACTCG TAACGCGCTGGCAGCAGTCAAAAATGGCGCCCAGNGCAAAGNCAAATGGCCTACAAAGGGATCTGTNCTTCATTCCCCNC ATGTAGCAAACCAGCCTANAAACGGGCTTTGAGTATACATCATCAGNCATGATGGTNTCCAATGCATCTATACCTTGTTGA TCATCGCGGATAGCACTCTGNATTGGATATCCCCCCGGGGGNTTAATCAAATCCCCGGGCCNCCATGGCGGCGGGGAAAAT CAAACTTCGGGCCCAATTCCCCCTATAGGGNGGCGGTATAAAATTCACGGGCGGCGGCGTTTACAACGTCNNGATNGGAAAA ACCCGGGNGTTANCCCAANTTAACCCTTGGAAAAAAATCCCCNTTTCGCCCGGTGGGGTNANAACCAAAAAGNCCCCCC CGAATTGCCCCTTCCAAAAAGTTGCGCCAACCTGANN

XVI. PT207C4+

PT207C4-

XVII. Pt207C6+

Pt207C6-

Seqüências dos transcritos de *C. subvermispora* isolados a partir do cultivo em P. taeda e obtidas utilizando-se o *primer* –OPJ10/T12VG

I. Pt51G4+

AAGCCCGAGGATGTATGATGGTCTGCCCGCCTCGTTGTTGTGCAGA

II. Pt 52G1+

Pt52G1-

III. Pt52G1+

IV. Pt52G2+

Pt52G2-

V. Pt52G3+

AAGCCCGAGGACTTCCTCCTCAAGAAGGAGCTCGACGAGGCGCGGGGAGAAGCACAGCCACCGCTTCAAGGTGTACTACGT CCTCAACAACCCGCCGCCCAACTGGCAGGGCGGCGTCGGTTTCGTGTCCAAGGAGCAGATCGAGAAGCACCTGCCCCCGA

VI.Pt5 2G5+

AANCCCGTAGGACATCCTCCTCAAGAAGGATTTCGTTTTAGCTCGCGGANAAGNNACAGNCNCCGNTTCAAGGTGTACTA CGTCCTCAACAACCCGCCGCCCAACTGGCAGGGCGGCGGCGTCGGTTTCGTGTCCAAGGAGCAGATCGAGAAGCACCTGCCCC CGACAGACCACAACATCAAGGTTCTGCTTTGCGGCCCTCCGCCGATGATGACCGCTATGNAAAAAACATCTGGCCGATCT CNGCTATCCTGCACCGAGGACGGTCAGCAAGCTTGNACGATNAGGTATTCTTGTTCTAGGGCNTTGGTTGGCCTGACACAA NACGGGATTAGACGGCTGTCGNGTTNANCATGCNTGCTTCTCGATTTAACCNNGTTAATAAATCNC **Pt52G5-**

AAGCCCCGAGGTTTTTTTTTCCTCCTCAAGNAAGGAGCATCGACGAGTCTCGTCGGNAGTAAGCNACAGCTCACCGTCTTT CAAGGTGTTACTACGNTCCTCCAACAACTCCGCCGCCCAACCTGGCAGGNGNCGNGTCGTCGGGATTTCGTGTCCAAGGAG CAGCATCGAGNAANGTCTACCTTGCCCCCGACAGACCACNANCATTCCNANAGGTTCTTGCTTTGCGGCCCCTCCCGTCCG ATGATGNACCCGCTATGTAAAAAAAATCATTTCCTGGCCCGATCTCAGCTTAATTCCCTGCTANCCCGAGTGAACGGTTCC AGTCCTNAAGCCTTTGGNACCGAAATTTAGGGTTATTTTTCCNTTTTTCNTNTTTTNNGGGGGNGNN

VII. Pt53G3+

 $\label{eq:construct} CCNATTCCTTCTATTGGAGNTTNCTTTCCNANNNGANGNGATGTTTCCCCCCAACGNCATGNNNGNNCGTCGCTAATTNCG ATAGGACTTTTTTTTTAGGAACAAGGAGGGGCTATGCNACCNTTAGGAGGCCGNNNCNATTTTCGCGACAAGGNCCAA CCTCACGCGANGGTGATCTTGCGNCGGNGCTTGCTCCGGNNGTCGTCTCTNANGGAACGCTGACAGTCAGGACAACACAN TTGTCCATCCCTGCCATNTGATCTCCTCGGNCCTTA \\$

VIII. Pt54G4+

AAGCCCGAGGATGTATGATGGTCTGGCCCGCCTCGTTGTTGTGCAGA

PT54G4-

AAAAATCCNACCCGACGTTGCGNNNAGGCTCCTCCCGATATGGATCGGGACCTGCGANGCGNACTCNCGAAATTCACCTA GATGTATTCTGACACAACAACGAAGGCGGGGTCAGACCATCATACATCCGTCGGGGGCTT

IX. Pt15 2G6+

X. Pt152G4-

XI. Pt153G3+

Pt153G3-

XII. Pt153G5+

AAGCCCGGAGGTAAACAGCGCCTGGTGTCCTCACAACTGAAGGAGGGATCTGGATATCTGGACCTTGGATAGCAAGTCAG GATCTTATTGCAAGTGTATCGTGACAGAAGAAACGTAGATATCAAGA

XIILPt154G2+

AAGCCCGAGGGTAGAGGGGGGGACAGTATGTGGACAGCTAGACGCGGGACTGGCGAGACGACCAGCTAGTGTATTGGTGT XIV. Pt154G3+

AAGCCCGGAGGGACAAACATGACAAAGNACGACTAAAAGTTTCATAAAGCCGTCTCCAGGGATGGANCATGGTCTTAAC CCGGACACCGTCTTTCATAGGCTGTCCACAGGTACGCACACTTCCGTAATCATAACGTATGGACACGATCAGCCACGATGG XV. Pt201G1+

TCTTTCCCCANAGAAAATTTGGNTTGCCCCCCAGGGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATT AAGGCCCGAGGGTACAAGGGCGGCAAAAATTAGATAACCAATAATGGAGGCAGTGCCTCCATAATAGTGGTTAAACTATT CGCCCGCCTCGTTGTTGTGTAGAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCG TTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCAACCTAAATAGCTTGGCGTTA

Pt201G1-

AAGTGTAGTATCTGTTCTTAATAGTTTAACCACTATTATGGAGGCACTGCCTCCATTATTGGTTATCTAATTTTTGCCGCCC TTGTCCCTCGGGCTT

XVI. Pt201G2+

AAGGATGTTTGGACTAAGATTCCCTGGGTCGAGCGGTATGCCTGGTTCGGTGCGATGGAGAACCTGCAAGGGGTCAACCA AGCGAGTGTTCTTGATATCCTAGCCTCGGGCTTA

Pt201G2-

TAAGCCCGAGGCTAGGATATCAAGAACACCCGCTTGGTTGACCCCTTGCAGGTTCTCCATCGCACCGAACCAGGCATACC GCTCGACCCAGGGAATCTTAGTCCAAACATCCTT

XVII. Pt202G5+

AAGCCCGAGGGTGCGATAGCATGCGTAGGCGCAGGGAGGCACCCTGCGGACGATGTAAGGGACCAGCCGGCGCATGNAA AGGGAATTGACTTGAGAATATGGCTGCTATCTCGCAGAGGGATATGGTCCAGAAGCAGCTCTGGTGGGATGTGAGCAGGA ATATTTTTCCTGTTCTTCCTCGGGCTTA

Pt202G5-

GTATGTTCCAGTAATCAACCGACAGAGCCATCCTGCTCACATCCCACCAGAGCTGCTTCTGGACCATATCCCTCTGCGAGA TAGCAGCCATATTCTCAAGTCAATTCCCTAGCCCCGTTTCAAATGACCTCCTCCGCCCTCGTCACGTCCCCCGCCGAAGC TTCCCGCATCCGGCTGACTGAAACATTCATCGCCGGCTGGTCCTTCATCGTCGCAGGGTGCCTCCTGCGCCTCGCATGCTAT CGCACCCTCGGGCTT

XVIII. Pt202G2+

 ${\tt CTAGAAGGCTTCGCGGGTAGGCCTTCGATCATATTTGTTGACGCTGCTTTGCACTAGTGTATGCCAACGTTGATGATGGCA}$ CACGACAGGGAACAATACAGCCTTCCATCCACGAGCTGAGTGTTAAGCGAGTAGGGTGATCGTCACTTCCAAATTAGGAA GTCGGCAAATGAGAAGCTAGTGCGTGTGGCTGGTTTCACCGAGAGACTCGACCTGCCTTGTCACCGGCCACGCCTGCTTTC TTGTATTTATACCTTCACCGCCGGGTCCTTCTGGTTGCCCCTGAAACTGCACGCGACCCTCTGGNAGNGCTATAAGTCTTTTCCNCGGGCTTA

Pt202G2-

AAGCCCGGAGGGACTGGAATCCAAGAGTAGCTCCCGCAGCTATCATTCTGGCCGCAGCTGGGCAAGATGATCAGCAGGTG TATCTTCTGCGATGACTTCATATTTTTGGGTATAAATCCCACGAGTCGCCATATCTGTGCCGGGCTGTCGCCATCGTCTTG GCACACAACCAACCAAGCGTCAAGCATGCAGGGAGCATGGCGTACACGACGCTTACCCCTTTTCTTGTGTATCAACCCTAG AGCCTTCTAGTGCTGTTGCGGTCCGTTGCCAGTGATATCAAATGAGCAAACATACTCTCGGCAGATTCCTCGGGCTTA Pt203G1-

AAGCCCGAGGAATTGGTAGTTGGGCAGGATTTTCTATCGGGTGGTTATATTGGTCATTTTGGACTTTATTAATGGGTTGGG AAGCATTTGTTGCGGGAAAGATCCTTAATAGTTGGTTGCCGTTTATTCCGATTTGGGGCTATATGTTACTGGTGACAATAA GCCTAGTATGGGTAAATTTACGCAATGTCAAAAACTATGGTGAGTTTGAAATTCTGGTTTGCCATGATTAAAGTAGTTGCG ATTGTCCTCTTCTTGGTGATCGGAAGTTTAGCGGTTTTACACCTTTGGCCTCGGGCTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGC CTGCAGGTCGACCATATGGGAAGAGCTCCCCAACGCGTTGGATGCCATAGCTTGGAGTATTCTATAGGGTCACCTAAATAG CTNGGCGTAATCANGGCCATAGC

Pt204G3-

AAGCCCGAGGTCCAAAGGTGTAAAACCGCTAAACTTCCGATCACCAAGAAGAGGGACAATCGCAACTACTTTAATCATGGC AAACCAGAATTCAAACTCACCATAGTTTTTGACATTGCGTAAATTTACCCATACTAGGCTTATTGTCACCAGTAACATATA GCCCCAAATCGGAATAAACGGAAACCAACTATTAAGGATCTTTCCCGCAACAAATGCTTCCCAACCCATTAATAAAGTCC AAAATGGACCAATATAACCACCCGATAGAAAATCCTGCCCAACTACCAATTCCTCGGGCTT

XXI. Pt204G5+

AAGCCCGAGGAGATAGAGCATCACATGCGATACGGAAGTAGGAGATAAAAGGGGATCCTGGCCTTTCAATAGCTAATTTA CAGTGTGGGTGCGAGCTGGACAAATCATGGCTTGCGAGGCGAACTGGATCATATGTCCGAGGAAGCGTAGGGGGGCGACG GCATCTTTTACACAACGATGTCAGCCACTATCAAGATGTACAACGGTGAATCACGAACCTGAACGACGTGTATATACAAT GGCCGCCCTATATTGGTCCAATCCCACAATACCAAATTGTATTGAGAGAGCGACACCCCTCGGGCTTA **Pt204G5-**

TAATTCCGAGGGGTGTCGCTCTCTCAATACAATTTGGTATTGTGGGATTGGACCAATATAGGGCGGCCATTGTATATACAC GTCGTTCAGGTTCGTGATTCACCGTTGTACATCTTGATAGTGGCTGACATCGTTGTGTAAAAGATGCCGTCGCCCCCTACG CTTCCTCGGACATATGATCCAGTTCGCCTCGCAAGCCATGGATTTGTCCAGCTCGCAACCACACTGTAAATTAGCTATTGA AAGGCCAGGGATCCCTTTTATCTCCCTACTTCCGTATCGCATGGGGATGCTCTATCTCCTCGGGCTT

XXII. Pt402G3+

AAGCCCGAGGCCAACAGGCAGAGGGTCTTCGAGCGCGTGCTCGGCTGCTGCGATATATGCGAAATTCACGAGGCAAGTCTA CAGTCTCCGGGTTCGTACAGATCTCATACTGTAACACCCATTCGATGCCATGTCACTATGGTTCTGAAAGGTAGATATGCA CTACTTGCCTCCAGAGATGCACCACGGATTGTGGTGGTGTAGAATTGGTATGCACAAAGTGTAGAGGGCGCACACGGTGGGGCT TGGAGGGACCTCGTATTCAGATTTGAGTCGGTTGTGNACCAGGACANANACAATNTCTAGTTGTNAAANCCTNTTAACNA AGCAATTAANCNAAATCNATTCANGNGGGTNTATTTTTAANGTNACCANANTNANTTCCCC

Pt402G3-

CCTGGGAAGCGGAATTGTTGCAGCAGACGCCAGAAGCCATCTTCAAGTCCATGCGGAAGGTGCGGTTGTTTCCCGTCGTT GTTTCACAATTCGGGTTTATGTTTATAGGACCGAACGTTGCCTTGACTTGAACCAAAATTCGGTTTAACNAAGGGAAAAAA AATTCCTTCCCTTGGGNCCGNNGGNCCCCGGNAAAANGGGAAANGGGGNAAGGNGGGGAAGGCAATTAACCCCAAAAAT TTTTATTTNCCTTNCCAAANAAAACCCCCCCTTAANCCACAAATTNTTTTTAAACCCC

XXIII. Pt402G1+

Pt402G1-

XXIV. Pt403G3+

AAGCCCGAGGACAATGAAGGCGGAGNAGGATAAGCGGTGCATCGAGTGGACCGTGGACAATCAGTCGTTGCAGGGAACA TAGCAATGATCATGATAGCGAGCGGTAGGCTTGCCGATAGCACTGCAAGAGAAAAAGTCGAGGTAATGAGGGAGAGGAG AGCAGAATGAGGTTTCAAAGCAGCTGCTAAAAGCCCTCCAGAGGAGGAGGGGCGCCGAGTGGCCACCACCGGTAGGAA GCCCCAGGTGGGGGGTGNTCGGTTTTNCCCGGAATACCTGGTGGGGNTCCAATGGCCCGGCAACCCACCCCCTGGATTCGGTT TAAAAGGTTACGGTCCAAATCCCAATCGNTCCNAAATTTGGTTTTTTCCCCCTGGTTAACCTGGCCTTCCANCAATTTGGTT AANTGGAAAATCCANTTTNCC

Pt403G3-

XXV.Pt403G4+

ACTGGGGGNTCCGCAACGCTCGGCGATGGCNTCCCGTGTCCGNCCCAATGGGNCNGNGTCCGCCGCGGGGGAAAATNTCCG GANTNTNAGAGGCCCGGAGGGGTGACGCGTGAGATATTGTCTNTCGNGATGGCCCTTGNGGACCGNGTCNTCCCGTCCAC GNTTTTACCTTAGGGGGGAGCACNCACTGNGGCNCCCAATTTTAATGGCCTGGNTCCGTCCAATCCCCTTACCGACCAAGGA

XXVI. PT405G4+

AAGCCCGAGGGTTGAATACACGGTGATAGCACCCGTACGGACGCCTACTGGCCAGATTCTGAATGACGTCCAAGTCAGAC ATTCTCGCTGGGATACGCACCTGACGAAACGAGGTGCGCCGATGACGGTGAGCGCTGTCCTTGCAGTTAGGTTATCATATT TGTTTATCGTTTGAGTCTCAGGGTACATTGCAGTTTTATGGGGGCCCGNTTGGTTCTGTTAGAGTCGNCTTGGAAGAACGTGT GGTGGAAAATGAAAACCAAGGAAACCGCCCGTTCGGGGGGCCCAACCTTAATTGGGAAGGGCCCCAAAATTTAAAAAAGG GGGGGGGGGTTTGGGGGCCCCAAANCCCCCCCCAAAATTTGGGNGA

PT405G4-

TAGGGGGGGGGGGTTNCAAGATGTCCCAANGCGTTGGGACTCTCCCATATGGTCGACNGGGAGGCGGCGCGCGCAATTCACTA GTTNTTAAGCCCGAGGATGCCGCTTGGAGTGGANGGGCCAAAATATCGCTATGNAAGCGAGGTCTTCAACGTTTGGTCAA CATGGGCCCACCAGGCTGACTTATCCGGCATCATTCACCTTCGGAAGGCCNTCCACAACGGATGGATACGGTCGTCATCA GGGCTGGTAAAGTGGAGGAACCGCATATAGAATGGACTCGGATGGTCCNTGGATGCACCTNTATGGCTCCCATAGAGNTG TGNCCCGAACGGGGCGGTTCTGGTTCCAATTCCACACCACGNTTCNTTCNAAGNCGGANCTCCTAACTANCAAACCAACG AGNCCNATTAAAACCGTGGGCNANAN

XXVII. Pt405G5+

AAGCCCGGAGGGTTGAATACACGGGTGATAGCACCCGTACGGACGCCTACTGGCCAGATTCTGAATGACGTCCAAGTCAG ACATTCTCGCTGGGATACGCACCTGACGAAACGAGGTGCGCCGATGACGGTGAGCGCTGTCCTTGCAGTTAGGTTATCAT ATTTGTTTATCGTTTGAGTCTCAGGGTACAATTGCCAAAGTTTTTATGGGCCGTTTGTTCTGGTTAGGAGGTTCCGCCTTTTG AAAAGGAAAACGGTGGTTGGTTGGGGAAAATTGGAAAACCAAGGAAAACCGGCCCCGGTTCCGGGGGGGCCCCCCAAA CCCCCCCNTTAAATTTGGGGGGGGGAAAGGGNCCCAAATTTAAAAAAAGGGGGGGGGTTGGGCCCCNAANCCCCCCNAAA TTNG

XXVIII. Pt406G2+

AAGCCCGAGGTATGAGGTCGAAGGACCATGTCCGATAATGTACCGCTTGCAGTGCTGGTCCGCGAAAGCCTCCGAATGAA TGATGTGAGCCAGATGCTCGATGGTGATGTGCGCAAGGATACCCGGGTTCATTGATGCAAGGGCGAATTACTTCGTTCAA GAATGTGTCGTCCGAGAGGATAAGATCCGCGCTAGCCAGCACCCTCCAAGTGATGATGTCCATCTCTGTCTTCAGGTCCTC CACATGGGATCCTTTGCGAATTCCGNAAAGGCTGTTTGGAAAGCCCCCTTCCCCGGGGTTTTCCCCGNGAAAAANTTTCCC CGG

Pt406G3-

XXX. Pt407G4+

Pt407G4-

XXXI. Pt407G5+

XXXII. Pt408G3+

AAGCCCGAGGAAAAGACTTATAGCACTGCCAGAGGGTCGCGTGCAGTTCAGGGCAACCAGAAGGACCCGGCGGTGAGGG TATAAATACAAGAAAGCAGGCGTGGCCGGTGACAAGGCAGGTCGAGTCGCGGTGAAACCAGCCACACGCACTAGCTTC TCATTTGCCGACTTCCTAATTTGGAAGTGACGATCACCCTACTCGCTTAACACTCAGCTCGTGGGATGGAAGGCTGTATTGTT CCTGTCGTGTGCCATTATCAACGTTGGCATACACTAGTGCAAAGCA

Pt408G3-