

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



DANIELA PAULA DE TOLEDO THOMAZELLA

**“Estudo da via alternativa de transporte de elétrons de
Moniliophthora perniciosa e *Moniliophthora roreri*: possível papel no
desenvolvimento dos patógenos e infecção do cacaueiro”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Daniela Paula de Toledo Thomazella
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

A large, stylized handwritten signature in blue ink, likely belonging to the orientador.

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Co-Orientadora: Dra. Johana Rincones Perez

Campinas, 2010

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

T368e	Thomazella, Daniela Paula de Toledo Estudo da via alternativa de transporte de elétrons de <i>Moniliophthora perniciosa</i> e <i>Moniliophthora roreri</i>: possível papel no desenvolvimento dos patógenos e infecção do cacauzeiro / Daniela Paula de Toledo Thomazella – Campinas, SP: [s.n.], 2010. Orientadores: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Johana Rincones Perez. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. <i>Moniliophthora perniciosa</i>. 2. <i>Moniliophthora roreri</i>. 3. Oxidase alternativa. 4. Mitocôndria. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães. II. Perez, Johana Rincones. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título. (scs/ib)
--------------	--

Título em inglês: The mitochondrial alternative oxidase of *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri*: its possible function in fungal development and pathogenesis.

Palavras-chave em inglês: *Moniliophthora perniciosa*; *Moniliophthora roreri*; Alternative oxidase; Mitochondria.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Gisele Monteiro, Paulo Arruda, Luis Eduardo Soares Netto, Marcelo Menossi Teixeira.

Data da defesa: 09/12/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 09 de Dezembro de 2010.

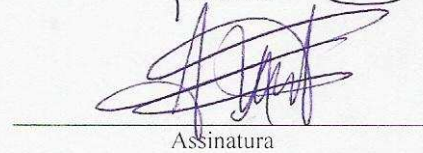
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira
(Orientador)



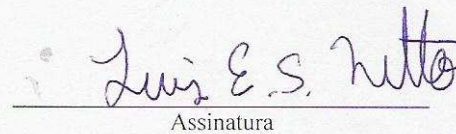
Assinatura

Profa. Dra. Gisele Monteiro



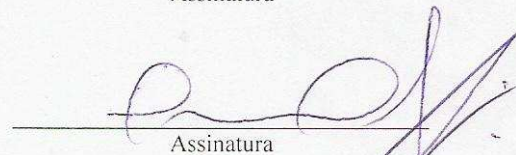
Assinatura

Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira



Assinatura

Prof. Dr. Paulo Arruda



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo

Assinatura

Prof. Dr. José Andrés Yunes

Assinatura

**Dedico esta tese ao meu avô
Pedro (*in memoriam*), um eterno
exemplo de inteligência, trabalho,
dedicação e honestidade.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais Elvira e Daniel e aos estimados familiares tio Pedrinho, Tata e vó Genoveva, por terem zelado pela minha educação e por todo amor, carinho, ajuda e incentivo que sempre me deram. Vocês foram e são fundamentais para o meu crescimento pessoal e formação profissional!

Ao Paulo, pelo apoio imensurável, amor e companheirismo. Muito obrigada por me fazer uma pessoa cada vez melhor!

Aos meus irmãos Mônica e Fábio, que são constantes motivos de orgulho e admiração. Obrigada pelo amor e amizade!

Aos meus queridos tios e primos (em especial à Ana, tia Claudi, tia Selma, tia Liz, tio Flávio e tio Zezinho), à Sílvia, ao Zé Paulo e ao Caio. Agradeço pela torcida, pelo incentivo e por todo amor e carinho por mim manifestados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gonçalo Pereira, por todos os ensinamentos, pelo companheirismo, pela amizade e confiança. Obrigada também por fornecer uma excelente infra-estrutura para a pesquisa, como temos no LGE.

À co-orientadora Johana Rincones por todo o apoio e auxílio.

À Eliane, Welbe e aos “novatos” Mari e Jonatas, pela constante disponibilidade em ajudar e resolver as burocracias dos projetos de pesquisa.

À Dona Ernê, pelo apoio técnico, prestatividade e boas risadas.

À Professora Dra. Ione Salgado, ao Halley, à Elzira e Jusceley, pela confiança, carinho e apoio na padronização de protocolos e realização de experimentos fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Lyndel Meinhardt pela oportunidade de realização do doutorado sanduíche em seu laboratório no USDA.

À Profa. Dra. Gisele Monteiro e aos Profs. Drs. Luis Eduardo Soares, Marcelo Menossi e Paulo Arruda pela participação na banca examinadora desse trabalho.

A todos os pesquisadores, funcionários, alunos e ex-alunos do LGE pela troca de experiências e pelo auxílio durante estes anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP.

À FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro.

Aos queridos “amigos da faculdade” Pri, Kívia, Sil, Halley, Kelly, Lucia e Marcel. Agradeço pela amizade, conselhos, companheirismo, pelos exemplos de dedicação e perseverança e por todo o apoio e incentivo.

Aos queridos “amigos de Pereiras” Lê, Laís, Mariane e Marina, Ju, Pam e Ká. Obrigada por me receberem sempre de braços abertos na pequena e saudosa cidade.

Ao Rafael da pós-graduação, pela ajuda com as burocracias e dúvidas relacionadas à bolsa CAPES PDEE como também às documentações da pré-banca e defesa de tese.

Enfim, agradeço a todos aqueles, que direta ou indiretamente, me ajudaram a concluir esta etapa tão importante da minha carreira científica.

**“Que o teu trabalho seja
perfeito para que, mesmo depois
da tua morte, ele permaneça.”**

Leonardo da Vinci

ÍNDICE

<u>INTRODUÇÃO GERAL</u>	1
Importância econômica do cacaueteiro.....	1
O fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i> e a doença Vassoura de bruxa.....	2
Tentativas de controle da doença e o Projeto Genoma Vassoura de bruxa.....	4
O fungo <i>Moniliophthora roreri</i> e a doença <i>Frosty Pod Rot</i> do cacaueteiro.....	8
Vias mitocondriais de transporte de elétrons: diversidade de componentes e funções.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
<u>OBJETIVO GERAL</u>	18
<u>CAPÍTULO I</u> : A enzima mitocondrial oxidase alternativa tem participação central no desenvolvimento da fase biotrófica de <i>Moniliophthora perniciosa</i> , agente etiológico da doença Vassoura de bruxa do cacaueteiro.....	19
RESUMO.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
<u>CAPÍTULO II</u> : Estudos bioquímicos e moleculares da enzima mitocondrial oxidase alternativa de <i>Moniliophthora roreri</i> , um importante patógeno do cacaueteiro.....	65
RESUMO.....	66
INTRODUÇÃO.....	67
MATERIAL E MÉTODOS.....	69

RESULTADOS.....	73
DISCUSSÃO.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
<u>CONCLUSÕES GERAIS:</u>	85
<u>PERSPECTIVAS:</u>	86
<u>ANEXO A:</u> O processo de senescência em <i>Moniliophthora perniciosa</i>	87
INTRODUÇÃO.....	87
MATERIAL E MÉTODOS.....	89
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
<u>ANEXO B:</u> Comparação do genoma mitocondrial dos patógenos do cacaueiro <i>Moniliophthora perniciosa</i> e <i>Moniliophthora roreri</i>	96
INTRODUÇÃO.....	96
MATERIAL E MÉTODOS.....	99
RESULTADOS.....	102
DISCUSSÃO.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
<u>ANEXO C:</u> Production of Calcium Oxalate Crystals by the Basidiomycete <i>Moniliophthora perniciosa</i> , the Causal Agent of Witches' Broom Disease of Cacao.....	108
<u>ANEXO D:</u> The mitochondrial genome of the phytopathogenic basidiomycete <i>Moniliophthora perniciosa</i> is 109 kb in size and contains a stable integrated plasmid.....	116
<u>ANEXO E:</u> A genome survey of <i>Moniliophthora perniciosa</i> gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao.....	133

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Esquema representativo do ciclo de vida de <i>M. perniciosa</i> em <i>T. cacao</i>	4
Figura 2. Ciclo da doença <i>Frosty Pod Rot</i> ou Monilíase causada pelo fungo <i>M. roreri</i>	9
Figura 3. Esquema simplificado mostrando as três etapas da respiração celular: glicólise, ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons.....	11
Figura 4. Esquema representativo da cadeia de transporte de elétrons, incluindo as vias principal e alternativa.....	12

CAPÍTULO I

Figura 1. Esquema representativo do gene <i>aox</i> de <i>M. perniciosa</i>	35
Figura 2. Análise de <i>Southern blot</i> utilizando-se DNA genômico de <i>M. perniciosa</i>	37
Figura 3. Alinhamento da sequência de aproximadamente 255 aminoácidos da AOX de plantas, algas (Viridiplantae) e fungos (Fungi).....	39
Figura 4. Filogenia das sequências de AOX de plantas e fungos disponíveis no NCBI.....	41
Figura 5. Padrão de consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas do micélio necrotrófico de <i>M. perniciosa</i>	42
Figura 6. Expressão relativa do gene <i>Mp-aox</i> nas diferentes fases de desenvolvimento de <i>M. perniciosa</i> , obtida através de ensaios de <i>Real time RT-PCR</i>	43
Figura 7. Expressão relativa do gene <i>Mp-aox</i> em resposta a inibidores da cadeia respiratória principal (NO e azoxistrobina), obtida através de ensaios de <i>Real time RT-PCR</i>	44
Figura 8. Análise da emissão de NO por plântulas de cacau sadias (controle) e infectadas usando o método fluorimétrico DAF-2.....	45

Figura 9. Emissão de NO verificada pelo método fluorimétrico DAF-2 e utilizando-se como controle o <i>scavenger</i> de NO cPTIO.....	47
Figura 10. Crescimento <i>in vitro</i> dos micélios biotrófico (B) e necrotrófico (N) de <i>M. perniciosa</i> em meio MYEA contendo os inibidores da via principal (azoxistrobina), da AOX (SHAM) ou de ambos (SHAM + azoxistrobina).....	48
Figura 11. Manutenção da fase biotrófica de <i>M. perniciosa</i> na presença do inibidor da via principal azoxistrobina.....	49
Figura 12. Efeito dos inibidores azoxistrobina e SHAM sobre o estabelecimento e progressão da doença Vassoura de bruxa.....	51
 <u>CAPÍTULO II</u>	
Figura 1. Esquema representativo do gene <i>aox</i> de <i>M. roreri</i>	73
Figura 2. Alinhamento de aproximadamente 240 resíduos de aminoácidos da AOX de <i>Arabidopsis thaliana</i> e fungos.....	76
Figura 3. Detecção da atividade da enzima oxidase alternativa em mitocôndrias isoladas de <i>M. roreri</i>	77
Figura 4. Expressão relativa do gene <i>Mr-aox in planta</i> em três pontos distintos de desenvolvimento da doença FPR.....	78
Figura 5. Expressão relativa do gene <i>aox</i> de <i>M. roreri</i> após tratamento com 30 mg/L de azoxistrobina durante 4 horas.....	78
Figura 6. Padrão de crescimento do micélio necrotrófico de <i>M. perniciosa</i> e do micélio de <i>M. roreri</i> em resposta aos inibidores azoxistrobina e SHAM.....	79

ANEXO A

Figura 1. Aspecto morfológico do micélio necrotrófico de <i>M. pernicioso</i> em estágio inicial de desenvolvimento e em processo de senescência.....	89
Figura 2. Comparação das diferenças de crescimento dos micélios necrotrófico em estágio inicial de crescimento (novo) e senescente.....	92
Figura 3. Diferenças de crescimento entre os micélios em estágio inicial de crescimento (N) e senescente (S).....	93
Figura 4. Expressão do gene <i>Mp-aox</i> no micélio em estágio inicial de crescimento (1) e senescente (2).....	94

ANEXO B

Figura 1. Confirmação experimental da presença dos plasmídeos mitocondriais de <i>M. roreri</i>	103
Figura 2. Ensaio semi-quantitativo (RT-PCR) mostrando a presença de transcritos de todas as polimerases plasmidiais de <i>M. roreri</i>	104

LISTA DE TABELAS

ANEXO B

Tabela 1 – *Primers* para os ensaios de RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*).....101

LISTA DE ABREVIACÕES

acetil CoA: acetil coenzimaA

ADP: adenosina difosfato

AMP: adenosina monofosfato

AOX: “alternative oxidase”/oxidase alternativa

ATP: adenosina trifosfato

BSA: “bovine serum albumin”/albumina soro bovina

cDNA: “complementary DNA”/DNA complementar

cPTIO: 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido

CTAB: “cetyltrimethyl ammonium bromide”/ brometo de cetiltrimetilamônio

DAF-2: 4,5 diaminofluoresceína

DAF-2T: 4,5 diaminofluoresceína triazol

DNA: “deoxyribonucleic acid”/ácido desoxirribonucléico

***dpo*:** gene codificante para a DNA polimerase

DTT: ditionitrito

EDTA: ácido etileno diamino tetra acético

EGTA: ácido etileno glicol-bis (beta-aminoetil éter) N,N,N',N' – ácido tetra acético

EROs: espécies reativas de oxigênio

ESTs: “expressed sequence tags”

Ext1: NADH desidrogenase alternativa externa 1

Ext2: NADH desidrogenase alternativa externa 2

FADH₂: flavina adenina dinucleotídeo

FPR: “Frosty Pod Rot”

gDNA: “genomic DNA”/DNA genômico

GMP: guanosina monofosfato

HR: “hypersensitive response”/resposta hipersensitiva

Int1: NADH desidrogenase alternativa interna

MES: ácido 2-morfolinoetanosulfônico monohidratado

Mp-aox: “*Moniliophthora perniciosa* alternative oxidase gene”

Mr-aox: “*Moniliophthora roreri* alternative oxidase gene”

mtDNA: “mitochondrial DNA”/DNA mitocondrial

MYEA: “malt yeast extract agar”

NAD⁺/NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada/forma reduzida)

NCBI: “National Center for Biotechnology Information”

NO: “nitric oxide”/óxido nítrico

NOC-5: 3-(2-hidroxi-1-(1-metiletil)-2-nitroso-hidrazino)- 1-propanamina

ORF: “open reading frame”

PDA: “potato dextrose agar”

PEG-8000: polietilenoglicol 8000 kDa

pMR1: plasmídeo de *Moniliophthora roreri* 1

pMR2: plasmídeo de *Moniliophthora roreri* 2

pMR3: plasmídeo de *Moniliophthora roreri* 3

PMSF: fenilmetilsulfonilflúor

RNA: “ribonucleic acid”/ácido ribonucléico

rRNA: “ribossomal RNA”/RNA ribossômico

rpo: gene codificante para a RNA polimerase

RT-PCR: “reverse transcription - polymerase chain reaction”

Seq 1: sequência genômica do gene *Mr-aox*

Seq 2: região codante do gene *Mr-aox*

Seq A: sequência genômica do gene *Mp-aox*

Seq B: região codante do gene *Mp-aox*

SD: “standard deviation”/desvio padrão

SHAM: ácido salicil hidroxâmico

SDS: dodecil sulfato de sódio

TIR: “terminal inverted repeats”/repetições terminais invertidas

tRNA: “transfer RNA”/RNA transportador

RESUMO

Moniliophthora perniciosa e *Moniliophthora roreri* são basidiomicetos fitopatogênicos, causadores de duas das mais devastadoras doenças fúngicas do cacau: a Vassoura de bruxa e a *Frosty Pod Rot* (Monilíase), respectivamente. Apesar do grande impacto socioeconômico dessas doenças, aspectos importantes relacionados ao metabolismo destes patógenos ainda não são suficientemente compreendidos. O estudo do metabolismo mitocondrial é particularmente relevante, pois compreende processos celulares vitais para a sobrevivência do organismo, como a regulação da produção de energia (ATP) e a manutenção do balanço *redox* da célula. Este trabalho teve como objetivo entender a importância da enzima mitocondrial oxidase alternativa (AOX) no metabolismo e desenvolvimento dos fungos *M. perniciosa* e *M. roreri*. A AOX é uma oxidase terminal capaz de realizar o transporte de elétrons mitocondrial, catalisando a redução do oxigênio a água, de maneira desacoplada da síntese de ATP. Em *M. perniciosa*, a expressão do gene *aox* (*Mp-aox*) mostrou-se bastante relacionada ao ciclo de vida hemibiotrófico deste fungo. Níveis de expressão relativamente elevados deste gene foram observados no micélio biotrófico cultivado *in vitro*. De acordo, grande sensibilidade à inibição da via alternativa também foi verificada nesta fase micelial, sugerindo que a AOX tem participação no desenvolvimento deste primeiro estágio de *M. perniciosa*. Curiosamente, a inibição *in vitro* da cadeia respiratória principal retardou a transição da fase biotrófica para a necrotrófica. Além disso, o uso combinado de inibidores da via principal e da AOX resultou em total inibição do desenvolvimento do fungo *in vitro* como também preveniu o estabelecimento da doença em plântulas de cacau. Com base nesses dados, o presente trabalho sugere um modelo no qual a participação diferencial das vias de transporte de elétrons (principal e alternativa) regula o desenvolvimento do micélio biotrófico e a transição de fase de *M. perniciosa*. Este é o primeiro trabalho em que se apresentam fortes

evidências para uma função da AOX no desenvolvimento *in planta* e ciclo de vida de um fungo fitopatogênico. Como em *M. perniciosa*, o gene *aox* de *M. roreri* (*Mr-aox*) foi induzido em resposta ao fungicida azoxistrobina (inibidor do complexo III), sugerindo que a AOX tem participação na proteção do patógeno contra o estresse oxidativo gerado pela inibição da via principal. Apesar da indução do gene *Mr-aox*, *M. roreri* mostrou-se consideravelmente sensível ao fungicida. Deste modo, é possível que a ativação da AOX em *M. roreri* não seja suficiente para contornar os efeitos tóxicos da azoxistrobina e, conseqüentemente, que este fungo seja mais suscetível ao estresse oxidativo gerado pelo inibidor. Finalmente, a adição conjunta da azoxistrobina com um inibidor da AOX inibiu completamente o desenvolvimento *in vitro* de *M. roreri*. Com base nos resultados apresentados, sugere-se que a AOX tenha uma função relevante no metabolismo destes patógenos e que a inibição conjunta das vias principal e alternativa seja uma estratégia em potencial para o controle das doenças Vassoura de bruxa e *Frosty Pod Rot*.

ABSTRACT

Moniliophthora perniciosa and *Moniliophthora roreri* are phytopathogenic basidiomycetes, which cause two of the most devastating fungal diseases of cacao: the Witches' Broom and Frosty Pod Rot diseases, respectively. Despite the great socioeconomic impact of the diseases, important aspects of the metabolism of these pathogens are not sufficiently understood. The mitochondrial metabolism is particularly important since it is associated with many cellular processes of crucial importance for the organism survival, such as the regulation of energy production (ATP) and the maintenance of the cellular *redox* balance. This study aimed to understand the importance of the mitochondrial enzyme alternative oxidase (AOX) in the metabolism and development of the cacao pathogens *M. perniciosa* and *M. roreri*. AOX is a non-phosphorylating ubiquinol oxidase which catalyzes the reduction of molecular oxygen to water. In *M. perniciosa*, the expression of *aox* gene (*Mp-aox*) was closely related to the hemibiotrophic lifestyle of this fungus. High levels of *Mp-aox* transcripts were observed in the biotrophic mycelium and, accordingly, it showed an elevated sensitivity to AOX inhibitors, suggesting that AOX has a role in the development of the biotrophic phase. Interestingly, the *in vitro* inhibition of the cytochrome-dependent pathway prevented the transition from biotrophy to necrotrophy. Furthermore, the combined use of an inhibitor of the cytochrome pathway with an AOX inhibitor completely impaired the *in vitro* fungal growth as well as prevented the establishment of the disease in cacao seedlings. Based on these data, this study suggests a model in which the involvement of the different pathways of electron transfer (cytochrome and alternative routes) regulates the development of the biotrophic mycelium and the phase transition of *M. perniciosa* *in planta*. This is the first report presenting strong evidences for a role of AOX during the *in planta* development and life cycle of a phytopathogenic fungus. Like *M. perniciosa*, the *aox* gene

of *M. roreri* (*Mr-aox*) is up-regulated after exposure of the fungal mycelium to the fungicide azoxystrobin (a potent inhibitor of complex III), suggesting that AOX plays a protective role against the deleterious oxidative stress produced by the compound. However, even with the increased expression of *Mr-aox*, *M. roreri* growth was highly sensitive to the fungicide. Therefore, it is possible that AOX activation was not enough to overcome the toxic effects of the cytochrome pathway inhibition and, consequently, *M. roreri* presented a high susceptibility to oxidative stress. Finally, the combined application of azoxystrobin and an AOX inhibitor completely impaired the *in vitro* development of *M. roreri*. Thus, based on these results, we suggest that AOX has a role in the metabolism of these cacao pathogens and the concomitant inhibition of both cytochrome and alternative pathways may be an efficient strategy for the control of Witches' Broom and Frosty Pod Rot diseases.

INTRODUÇÃO GERAL

Importância econômica do cacau

O cacau (Theobroma cacao L.) é uma planta tropical pertencente à família Malvaceae e nativa das regiões tropicais das Américas, sendo, portanto uma planta característica de climas quentes e úmidos (Motamayor et al. 2002). No Brasil, esta cultura é originária da região amazônica e foi posteriormente levada à região Sul da Bahia, onde encontrou um dos melhores solos e clima para a sua expansão. O fruto do cacau apresenta grande valor econômico, pois suas amêndoas são a matéria prima para a fabricação de diversos produtos utilizados pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, como também para a produção do chocolate, uma especiaria apreciada mundialmente (Purdy & Schmidt 1996).

Apesar dos principais países produtores de cacau localizarem-se na região tropical do globo, o cacau é um produto de importância para as indústrias chocolateiras de todo o mundo. O consumo mundial de amêndoas de cacau é de mais de três milhões de toneladas anuais e estima-se que as indústrias de chocolate movimentem cerca de 60 bilhões de dólares anualmente. O oeste da África supre a maior parte desta demanda mundial, destacando-se como principais países produtores de cacau a Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Camarões (ICCO 2009). Atualmente, o Brasil responde por menos de 5% da produção mundial, de modo que não é auto-suficiente e precisa importar esta matéria prima para suprir a demanda da indústria chocolateira nacional. No entanto, até 1990, o Brasil ocupava uma posição de destaque entre os principais produtores mundiais, com uma produção anual de aproximadamente 400 mil toneladas (ICCO 2009; Meinhardt et al. 2008). O principal motivo desta drástica redução da produção nacional foi o aparecimento da doença Vassoura de bruxa do cacau na principal região produtora de cacau do Brasil (sul da Bahia). Esta doença, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, foi

identificada nesta região inicialmente em 1989 e, desde então, tem causado severos danos econômicos para a cacauicultura brasileira (Pereira et al. 1989).

Atualmente, a doença *Frosty Pod Rot*, causada pelo fungo *Moniliophthora roreri*, também tem sido considerada uma grande ameaça para a cacauicultura brasileira, que lentamente se recupera dos danos causados pela Vassoura de bruxa. Até o momento, esta doença não foi registrada no Brasil, no entanto os pontos vulneráveis para sua entrada são evidentes, dentre eles: Amazonas, Acre e Roraima, devido à proximidade e contato dessas regiões com alguns países da América do Sul em que a doença já é uma realidade (Peru, Equador, Colômbia, Venezuela) (Evans 2007). A agressividade da doença e sua fácil disseminação têm preocupado o Ministério da Agricultura e os produtores brasileiros, uma vez que o seu aparecimento no Brasil é iminente.

O fungo *Moniliophthora perniciosa* e a doença Vassoura de bruxa

O fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora é o agente etiológico da doença Vassoura de bruxa do cacaueiro (Aime & Phillips-Mora 2005). O ciclo de vida deste patógeno é denominado hemibiotrófico, sendo composto de duas fases distintas: a fase biotrófica (infectiva/parasítica) e a fase necrotrófica (saprofítica) (Meinhardt et al. 2008).

Os esporos haplóides de *M. perniciosa* infectam os tecidos meristemáticos do cacaueiro, tais como gemas vegetativas e almofadas florais, germinando sobre a superfície de tecidos meristemáticos úmidos ou lesados. A infecção típica (vassoura vegetativa) se inicia quando o tubo germinativo dos basidiósporos (propágulos infectivos do patógeno) penetra no tecido meristemático de gemas apicais em atividade da planta (Griffith et al. 2003; Meinhardt et al. 2008). Nesta primeira fase, denominada biotrófica (haplóide – *n*), o fungo coloniza os tecidos

vivos do hospedeiro, formando hifas intumescidas e sem grampos de conexão (Evans 1980; Meinhardt et al. 2006; Silva 1999). Além disso, o micélio é monocariótico e cresce lentamente no espaço intercelular do tecido vegetal, o qual se acredita ser um ambiente consideravelmente pobre em nutrientes (Divon & Fluhr 2007). A resposta do hospedeiro à infecção é localizada e resulta em hipertrofia e hiperplasia das células, perda da dominância apical e proliferação de ramos laterais, tendo como consequência a formação de galhos anormais conhecidos como vassoura verde (Evans 1980; Meinhardt et al. 2008). Grandes quantidades de glicerol foram encontradas neste estágio da doença (vassoura verde) e especula-se que o acúmulo desta fonte de carbono possa ter relação com a progressão da doença e desenvolvimento do fungo na fase biotrófica, uma vez que este nutriente está praticamente ausente na vassoura seca (Scarpari et al. 2005).

O estágio de vassoura verde tem uma duração de dois a três meses, quando a vassoura inicia um processo de necrose, alteração esta associada à mudança do fungo para a fase necrotrófica (Meinhardt et al. 2008; Wheeler 1985). Neste segundo estágio, ocorre a dicarionização do micélio ($n + n$), as hifas tornam-se mais finas, com grampos de conexão e são encontradas inter e intracelularmente (Meinhardt et al. 2006; Meinhardt et al. 2008; Mondego et al. 2008; Silva 1999). Após a morte das vassouras, o micélio necrotrófico frutifica formando os basidiomata (Wheeler 1985). Nestas estruturas encontram-se células especializadas que formam o basídio ($2n$), onde ocorre a cariogamia e a meiose, com consequente formação dos basidiósporos (n). Somente na fase necrotrófica e em condições úmidas, os esporos podem ser produzidos (Meinhardt et al. 2008; Purdy et al. 1996). Como períodos intermitentes de umidade e seca são necessários para a proliferação do fungo, a região sul do estado da Bahia oferece condições climáticas que favorecem a produção de basidiósporos praticamente o ano todo (Figura 1).

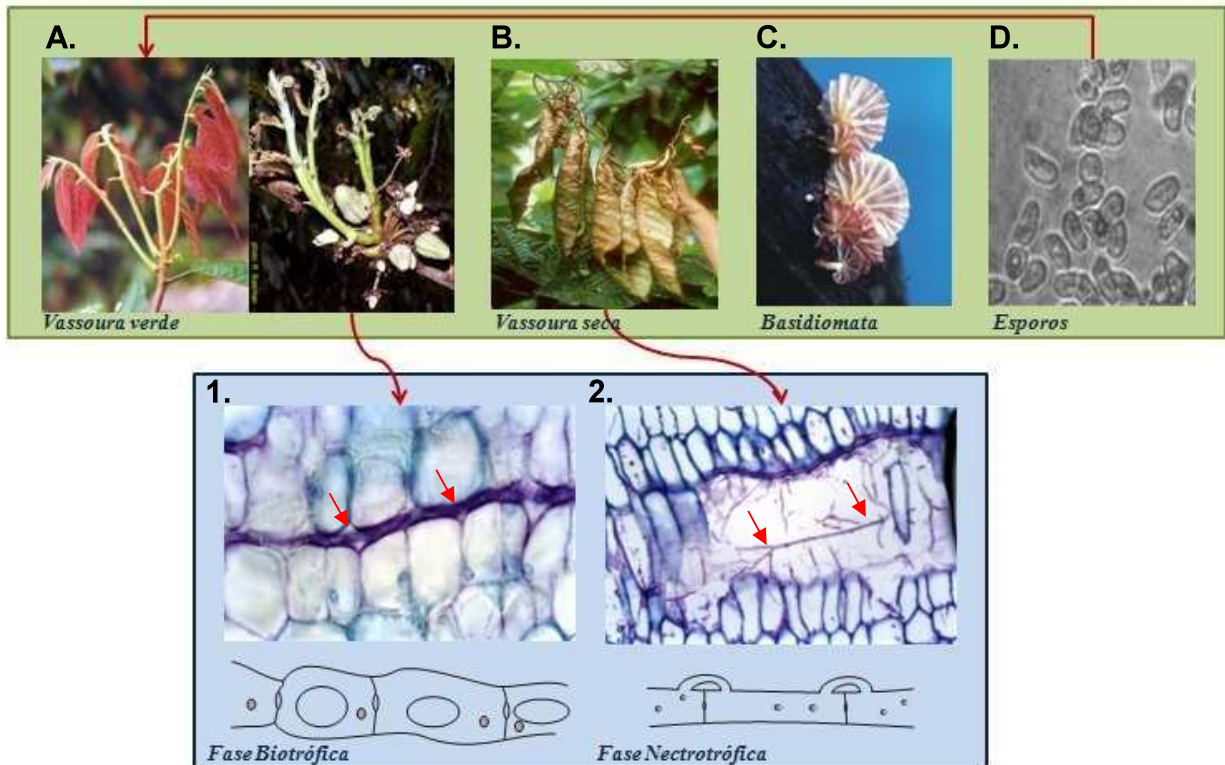


Figura 1. Esquema representativo do ciclo de vida de *M. perniciosa* em *T. cacao*. Na primeira fase da doença (estágio de vassoura verde) (A) o micélio biotrófico (n) (1) infecta os tecidos vivos do hospedeiro. Após dois a três meses, ocorre a necrose do tecido vegetal, iniciando assim o estágio de vassoura seca (B). Paralelamente à morte do tecido vegetal, o fungo adquire seu estágio necrotrófico caracterizado pela formação de hifas dicarióticas ($n + n$) com grampos de conexão (2). Este micélio coloniza o tecido necrosado do hospedeiro (B), onde, posteriormente, ocorre a formação dos cogumelos ($n + n$) contendo os basídios ($2n$) (C), que são as estruturas responsáveis pela formação dos esporos (n) do fungo (D). Os esporos são então transportados pela água ou pelo vento até os tecidos meristemáticos do cacaueiro e ali germinam, desenvolvendo-se como um micélio biotrófico (n) e reiniciando o ciclo da doença.

Tentativas de controle da doença e o Projeto Genoma Vassoura de bruxa

Os países produtores de cacau da América do Sul e das ilhas do Caribe são as principais regiões afetadas pela Vassoura de bruxa (Evans 1980; Purdy et al. 1996). Além do impacto econômico causado pela doença no Brasil, destacam-se ainda os danos sociais decorrentes desta crise, visto que a cacauicultura é uma importante fonte geradora de empregos diretos e indiretos na região sul da Bahia.

Apesar desta grande importância socioeconômica, ainda não existe uma estratégia efetiva e economicamente viável para o controle da doença (Meinhardt et al. 2008). Dentre as tentativas já utilizadas para combate ao fungo, destacam-se a poda fitossanitária, o controle biológico, o desenvolvimento de variedades de cacau resistentes e o uso de fungicidas. A poda fitossanitária consiste na remoção das partes infectadas da planta para assim interromper o ciclo da doença e diminuir o inóculo (Lima et al. 1991). O controle biológico é realizado com o uso do fungicida biológico TRICOVAN contendo fungos do gênero *Trichoderma*. Estes são capazes de inibir a esporulação de *M. pernicioso*, reduzindo as taxas de infecção (Bastos & J.Dias 1992). Apesar de interessantes, estas estratégias não são suficientes para o controle do patógeno. Da mesma forma, variedades resistentes à Vassoura de bruxa ainda não foram desenvolvidas. Atualmente, existem apenas variedades tolerantes, sendo necessário o uso conjunto de outras estratégias de controle nas áreas em que estas são cultivadas (Pires J & E Luz 1995). Finalmente, dentre os fungicidas recomendados para controle da Vassoura de bruxa destacam-se o Folicur (Bayer) e Cobre Sandoz BR. O Folicur pertence ao grupo químico dos triazóis e atua na síntese do ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana celular do fungo. O Cobre Sandoz BR é um fungicida à base de cobre, cuja ação tóxica sobre *M. pernicioso* ainda não é suficientemente conhecida. Ambos são complementares às outras técnicas mencionadas, pois o uso destas drogas isoladamente não mostra bom controle da doença (Bastos 1989).

Outras drogas com ação anti-fúngica também vem sendo testadas na tentativa de controle da Vassoura de bruxa como, por exemplo, os fungicidas a base de estrobilurinas sintéticas ou azoxistrobinas (fungicidas da classe QoI). As estrobilurinas constituem uma das principais classes de fungicidas utilizada para controle de pragas na agricultura. Estes químicos atuam inibindo a cadeia respiratória mitocondrial através da ligação específica ao centro Qo do

citocromo bc1 (complexo III), e sua toxicidade está relacionada à redução da produção de energia e ao estresse oxidativo gerado nestas situações (Balba 2007; Bartlett et al. 2002). Apesar de efetivas no controle de vários fitopatógenos, estes químicos não são suficientes para combater a Vassoura de bruxa, uma vez que *M. perniciosa* provavelmente possui mecanismos para resistir à toxicidade dessas moléculas (Pereira, G. A. G, comunicação oral).

Visando aprimorar os conhecimentos sobre o fungo *M. perniciosa*, no ano de 2000 foi iniciado o Projeto Genoma Vassoura de bruxa (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura). Este projeto tem permitido a elucidação de importantes aspectos do patógeno relacionados ao ataque à planta. A compreensão desses mecanismos poderá definir os caminhos para combatê-lo, seja por meio da síntese de drogas inibitórias para proteínas candidatas ou mediante a manipulação genética do patógeno. Sob a coordenação do Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, o projeto foi inicialmente financiado pela Secretaria de Agricultura do Estado da Bahia e pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e envolveu as seguintes instituições: o LGE (Laboratório de Genômica e Expressão) da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), a UESC (Universidade Estadual Santa Cruz), a UFBA (Universidade Federal da Bahia), a CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), o CENARGEN-EMBRAPA e a UEFS (Universidade Estadual de Feira de Santana).

As primeiras análises do genoma de *M. perniciosa* foram publicadas recentemente com ênfase nos genes potencialmente envolvidos com o desenvolvimento da doença, como as citocromo P450 monooxigenases, elementos transponíveis, prováveis elicitores de defesa, efetores de patogenicidade, enzimas de degradação de parede celular vegetal, proteínas relacionadas à metilotrofia e biossíntese de hormônios vegetais pelo fungo. A identificação de tais genes permitiu a formulação de hipóteses acerca de processos e mecanismos relacionados à

patogenicidade deste fungo como também ao desenvolvimento da doença. (Mondego et al. 2008). Além disso, dados de bibliotecas de ESTs e microarranjos mostraram diferenças interessantes na expressão de genes entre os estágios biotrófico e necrotrófico de *M. perniciosa* cultivado *in vitro*. Em sua fase biotrófica, o fungo aparentemente encontra-se em intensa atividade metabólica, porém este metabolismo não é direcionado para o crescimento celular, mas sim para a síntese de metabólitos secundários e proteínas envolvidas na sobrevivência e interação com o cacaueiro (Rincones et al. 2008).

Atualmente, a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) aprovou o projeto temático referente ao estudo integrado e comparativo de três doenças fúngicas do cacau incluindo a Vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*), a doença *Frosty Pod Rot* (*Moniliophthora roreri*) e o Mal do facão (*Ceratocystis cacaofunesta*). Dentre os aspectos que serão estudados incluem-se a finalização do sequenciamento e comparação dos genomas destes patógenos como também estudos de transcriptômica e metabolômica. Através de uma colaboração recentemente estabelecida com o Centro de Ciências Genômicas da Universidade da Carolina do Norte (CCGS), um grande conjunto de dados está sendo gerado, utilizando-se as novas tecnologias de sequenciamento da Illumina/Solexa™ e por meio do método de pirosequenciamento (sequenciador 454 da Roche). A análise destes dados permitirá o entendimento de importantes aspectos do metabolismo e dos mecanismos de patogenicidade destes três patógenos, servindo de base para direcionar estudos de processos específicos, bem como auxiliando no desenvolvimento de possíveis estratégias para controle destas importantes doenças fúngicas do cacaueiro.

O fungo *Moniliophthora roreri* e a doença *Frosty Pod Rot* do cacaueiro

Assim como *M. perniciosa*, *M. roreri* também causa uma doença bastante devastadora no cacaueiro: a doença *Frosty Pod Rot* (FPR) ou Monilíase (Evans 2007; Meinhardt et al. 2008). Esta doença é endêmica da América do Sul e de alguns países da América Central. Inicialmente, foi registrada no Equador, de onde se disseminou para Colômbia, Venezuela, Panamá, Costa Rica, Nicarágua, Peru, Honduras e Belize. Nestes países, as perdas na produção causadas pela doença variam de 25 a 100% (Evans 2007).

Inicialmente, *M. roreri* foi classificado como um ascomiceto anamórfico, sendo denominado *Monilia roreri*, principalmente devido à presença de conídios (únicos propágulos infectivos conhecidos) nesta espécie (Evans 2007). No entanto, Evans em 1978 fez uma crítica reavaliação da classificação deste fungo e a presença de doliporo (estrutura característica de basidiomicetos) confirmou a sua classificação no grupo Basidiomycota (Evans et al. 1978). Estas peculiaridades, em especial a presença de conídios, tornam o ciclo de vida deste patógeno bastante único entre os Agaricales.

Apesar do grande impacto sócio-econômico causado por *M. roreri*, aspectos importantes do seu ciclo de vida são ainda pouco conhecidos. Sabe-se que *M. roreri* infecta exclusivamente os frutos do cacaueiro, os quais se apresentam altamente susceptíveis nos primeiros 90 dias de crescimento. Além disso, *M. roreri* possui um ciclo de vida hemibiotrófico, uma vez que apresenta uma fase biotrófica caracterizada pela colonização dos tecidos vivos do hospedeiro e uma fase necrotrófica na qual o fungo se desenvolve concomitantemente com a morte do fruto (Evans et al. 2002) (Figura 2). No entanto, os aspectos morfológicos e moleculares característicos das duas fases miceliais de *M. roreri* (biotrófica e necrotrófica) como também os fatores que desencadeiam o processo de transição de fase neste fungo não são conhecidos.

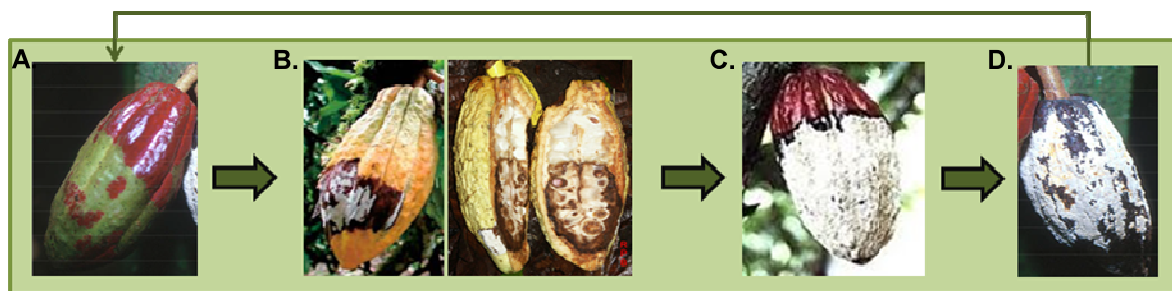


Figura 2: Ciclo da doença *Frosty Pod Rot* ou Monilíase causada pelo fungo *M. royeri*. Os esporos de *M. royeri* infectam os frutos em desenvolvimento do cacaueiro. A doença apresenta uma fase inicial caracterizada pela presença de inchaços e pigmentações no fruto infectado (A). Após algum tempo, inicia-se um processo de necrose e o desenvolvimento de manchas necróticas na superfície do fruto (B), as quais são posteriormente substituídas por uma camada branca de esporos (C). Ao final da infecção, o fruto encontra-se completamente necrosado e coberto por esporos (D).

Os sintomas iniciais da doença incluem modificações relacionadas ao inchaço e alteração da pigmentação dos frutos, a qual é seguida pela formação de uma densa camada superficial de esporos. A área do fruto com esporulação rapidamente se dissemina e a densidade de esporos é estimada como sendo de aproximadamente 44 milhões de conídios por centímetro quadrado (Evans 1981). Estes esporos exercem múltiplas funções funcionando não apenas para troca de material genético, mas também para dispersão, infecção e sobrevivência. Sua disseminação natural ocorre pelo vento ou por meio de chuva e eles permanecem viáveis por um longo período de tempo (Evans 2007).

Apenas recentemente a comunidade científica tem voltado esforços para compreender a biologia e interação deste patógeno com o cacaueiro. Em 2008, iniciou-se o sequenciamento do genoma de *M. royeri* e análises genômicas iniciais já revelaram peculiaridades desta espécie. Além disso, um estudo do genoma mitocondrial de *M. royeri* assim como a análise de genes específicos possivelmente relacionados a mecanismos de patogenicidade do fungo já estão em andamento e poderão revelar aspectos interessantes da biologia deste importante patógeno.

Vias mitocondriais de transporte de elétrons: diversidade de componentes e funções

A mitocôndria é uma organela central no metabolismo da maioria dos eucariotos, uma vez que participa de inúmeros processos celulares importantes, tais como a síntese de ATP, a geração de estresse oxidativo, o controle do balanço *redox* da célula, da homeostase de cálcio e do processo de morte celular, dentre outros (Nelson & Cox 2008). Dentre estes processos, a produção de energia através da realização da respiração celular, é uma das principais funções desta organela. Em condições aeróbicas, este processo ocorre de maneira bastante regulada, resultando na produção de dióxido de carbono e água. Durante a respiração, a transferência de um par de elétrons da molécula de carbono inicial até o oxigênio é indireta e complexa, envolvendo a redução das coenzimas NAD^+ e FAD em reações da glicólise e do ciclo de Krebs. Os elétrons associados às coenzimas reduzidas (NADH e FADH_2) são subsequentemente transferidos para a cadeia de transporte de elétrons, onde uma série de reações de oxidação e redução ocorre de maneira sequencial. A energia gerada pelo fluxo de elétrons nesta cadeia é utilizada para a translocação de íons hidrogênio da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas. Finalmente, a energia armazenada nesse gradiente de prótons (força próton motiva) é utilizada para a síntese de ATP (Nelson et al. 2008) (Figura 3).

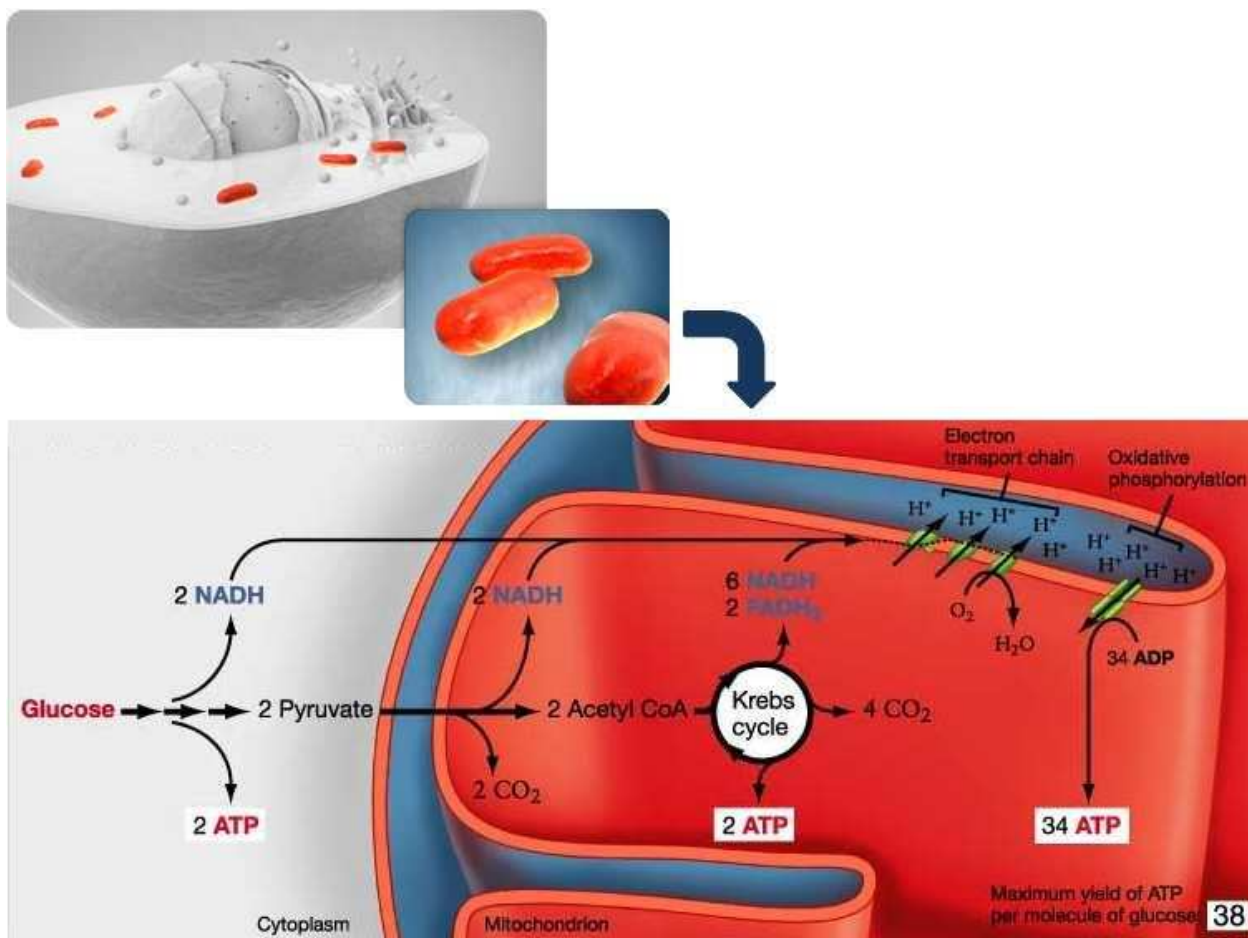


Figura 3. Esquema simplificado mostrando as três etapas da respiração celular: glicólise, ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons. A primeira etapa envolve a oxidação da glicose (glucose) a duas moléculas de piruvato (pyruvate) com concomitante redução de coenzimas ($\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$) e síntese de ATP. Esta primeira etapa ocorre no citoplasma da célula. Posteriormente, o piruvato é direcionado à matriz mitocondrial e oxidado a duas moléculas de acetil CoA (acetyl CoA). Estas moléculas participam do ciclo de Krebs (Krebs cycle) onde, após uma série de reações químicas, contribuem para a geração das coenzimas reduzidas (NADH e FADH_2) e ATP. Finalmente, estas coenzimas são oxidadas na cadeia de transporte de elétrons e o gradiente de prótons formado é utilizado para a síntese de grandes quantidades de ATP pelo complexo enzimático da ATP sintase.

Em mamíferos, a transferência de elétrons das coenzimas reduzidas para a molécula de oxigênio ocorre através de complexos respiratórios multi-protéicos em uma via linear de transporte de elétrons denominada cadeia respiratória principal. No entanto, em plantas e muitos

fungos este sistema é mais complexo e variável, envolvendo centros *redox* alternativos, como as enzimas NADH desidrogenases alternativas (externas e/ou internas) e oxidase alternativa (AOX) (Joseph-Horne, Hollomon, & Wood 2001) (Figura 4).

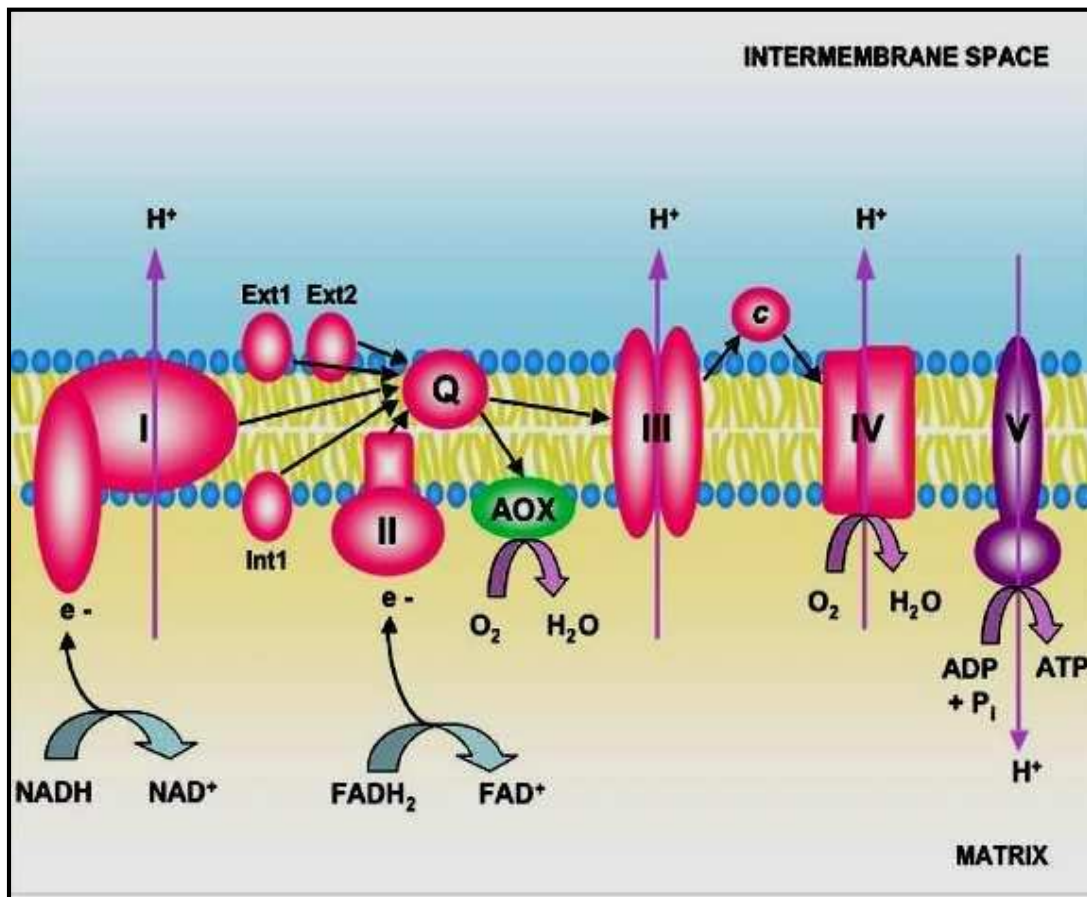


Figura 4. Esquema representativo da cadeia de transporte de elétrons, incluindo as vias principal e alternativa. No processo de transporte de elétrons pela cadeia respiratória principal (complexos I, II, III e IV), ocorre a transferência dos elétrons provenientes dos co-fatores reduzidos NADH e FADH $_2$ para os complexos respiratórios I e II, respectivamente. Ambos os complexos catalisam a redução da ubiquinona, que funciona como um mediador entre estes complexos iniciais e o complexo III. Os elétrons da ubiquinona são então transferidos para o complexo III e deste para o citocromo c. Finalmente, o complexo IV recebe os elétrons do citocromo c e catalisa a redução do oxigênio a água. Adicionalmente a esta via, existem também enzimas alternativas como a oxidase alternativa (AOX), as NADH desidrogenase alternativas externa (Ext1 e Ext2) e a NADH desidrogenase alternativa interna (Int1). Essas enzimas desacoplam o transporte de elétrons da produção de ATP, pois não contribuem para a formação do gradiente de prótons e, conseqüentemente, para a geração de energia celular.

As NADH desidrogenases alternativas catalisam a oxidação do NADH matricial ou citoplasmático, reação que também é catalisada pelo complexo I. No entanto, as mesmas não bombeiam prótons para o espaço intermembranas e, portanto, não contribuem para a formação do gradiente eletroquímico necessário para a síntese de ATP (Melo et al. 2001; Velazquez & Pardo 2001). A oxidase alternativa realiza a transferência de elétrons diretamente da ubiquinona reduzida para o oxigênio, assim como o complexo IV da via principal, no entanto, sem o concomitante bombeamento de prótons para o espaço intermembranas e consequente síntese de ATP (Vanlerberghe & McIntosh 1997). Além disso, por diminuir os níveis de ubiquinona reduzida, a atividade da AOX é também capaz de impedir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) resultante da inibição da cadeia respiratória principal (Maxwell, Wang, & McIntosh 1999).

A AOX está presente em diversos organismos como plantas superiores, muitos fungos, protistas, algumas bactérias e alguns poucos animais. Devido ao fato desta enzima desacoplar o transporte de elétrons da síntese de ATP, a elucidação da função deste *bypass* da cadeia de transporte de elétrons é ainda objeto de inúmeras pesquisas (Ho et al. 2007; Magnani et al. 2007; Magnani et al. 2008). Uma consequência importante deste desacoplamento é o fato da energia produzida pela oxidação das moléculas ser liberada na forma de calor. Esta produção de calor tem importante participação no ciclo reprodutivo de plantas da família Araceae, que utilizam o aumento de temperatura pela atividade da AOX para volatilização de aminas e atração de insetos polinizadores (Wagner et al. 2008).

Em plantas não termogênicas e nos demais organismos, a função da AOX ainda não foi completamente elucidada. A regulação da expressão gênica e atividade da enzima respondem a

fatores que variam desde o estresse oxidativo até o estágio de desenvolvimento do organismo (Joseph-Horne et al. 2001; Martins et al. 2010). Evidências sugerem que a AOX está relacionada à adaptação dos organismos às flutuações ambientais: estresse oxidativo, frio, condições anaeróbicas, mudanças das fontes de alimento e temperatura estão entre os fatores que influenciam a expressão ou atividade da enzima (Akhter et al. 2003; Clifton et al. 2005; Donofrio et al. 2006; Huang, von, & Durner 2002; Juszczuk & Rychter 2001; Juszczuk, Wagner, & Rychter 2001). Esta regulação é essencial para atender às necessidades metabólicas do organismo e pode ser mais eficientemente manejada pela modulação expressional do gene da oxidase alternativa, uma vez que esta enzima é estruturalmente mais simples que os complexos respiratórios III e IV da via principal (Joseph-Horne et al. 2001).

Nos últimos anos, com o advento dos fungicidas a base de estrobilurinas, demonstrou-se grande interesse no estudo da AOX de fungos fitopatogênicos, uma vez que foi verificada uma importante participação da enzima como mecanismo de resistência a essas drogas (Wood & Hollomon 2003). Estes químicos possuem alta especificidade como também atividade fungicida e são utilizados no controle de muitas doenças fúngicas. A toxicidade dessas moléculas é exercida pela redução da síntese de ATP como também pela geração de espécies reativas de oxigênio associada à inibição da cadeia de transporte de elétrons principal (Balba 2007; Bartlett et al. 2002). A AOX é capaz de prevenir os efeitos tóxicos dessas moléculas, impedindo a geração de estresse oxidativo, extremamente danoso à célula (Wood et al. 2003). Apesar da função da AOX na resistência a esta classe de fungicidas ser bastante estudada em patógenos de plantas (Gong et al. 2009; Ishii et al. 2009; Yukioka et al. 1998), o papel deste *bypass* no desenvolvimento *in planta* e ciclo de vida de fungos fitopatogênicos ainda não foi compreendido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aime M.C. & Phillips-Mora W. (2005) The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. **97**, 1012-1022.
2. Akhter S. et al. (2003) Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect.Immun.* **71**, 5794-5802.
3. Balba H. (2007) Review of strobilurin fungicide chemicals. *J Environ.Sci.Health B* **42**, 441-451.
4. Bartlett D.W. et al. (2002) The strobilurin fungicides. *Pest.Manag.Sci.* **58**, 649-662.
5. Bastos C. (1989) Avaliação de Fungicidas Sistêmicos no Controle da Vassoura-de-Bruxa do Cacaueiro. *Agrotrópica* **1**, 128-132.
6. Bastos C. & J.Dias (1992) Redução na Produção de Basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso* por *Trichoderma viride*. *Summa Phytopathologica* **18**, 235-238.
7. Clifton R. et al. (2005) Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol.Biol.* **58**, 193-212.
8. Divon H.H. & Fluhr R. (2007) Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS Microbiol.Lett.* **266**, 65-74.
9. Donofrio N.M. et al. (2006) Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal.Genet.Biol.* **43**, 605-617.
10. Evans H.C. (1980) Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' broom disease of cocoa. *Trans.Br.Mycol.Soc.* **74**, 515-526.
11. Evans H.C. (1981) Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. *Phytopathol.Pap.* **24**, 1-44.
12. Evans H.C. (2007) Cacao diseases-the trilogy revisited. *Phytopathology* **97**, 1640-1643.
13. Evans H.C. et al. (2002) What's in a name? *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa? *Mycologist* **16**, 148-152.
14. Evans H.C. et al. (1978) On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Can.J.Bot.* **56**, 2528-2532.
15. Gong S. et al. (2009) Inhibitory effect of bionic fungicide 2-allylphenol on *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr.) *in vitro*. *Pest.Manag.Sci.* **65**, 1337-1343.
16. Griffith G.W. et al. (2003) Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany* **41**, 423-435.
17. Ho L.H. et al. (2007) Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development. *Plant Physiol* **143**, 1519-1533.
18. Huang X., von R.U., & Durner J. (2002) Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* **215**, 914-923.

19. ICCO. ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, Vol. XXXIV, No.4, Cocoa year 2007/08. <http://www.icco.org/statistics/production.aspx> . 2009. 3-3-2009.
Ref Type: Electronic Citation
20. Ishii H. et al. (2009) Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest.Manag.Sci.* **65**, 916-922.
21. Joseph-Horne T., Hollomon D.W., & Wood P.M. (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim.Biophys.Acta* **1504**, 179-195.
22. Juszczuk I.M. & Rychter A.M. (2001) [Regulation of alternative oxidase activity]. *Postepy Biochem.* **47**, 318-327.
23. Juszczuk I.M., Wagner A.M., & Rychter A.M. (2001) Regulation of alternative oxidase activity during phosphate deficiency in bean roots (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol Plant* **113**, 185-192.
24. Lima E. et al. (1991) Frequência da Poda Fitossanitária no Controle da Vassoura-de-bruxa do Cacaueiro. *Agrotrópica* **3**, 75-80.
25. Magnani T. et al. (2007) Cloning and functional expression of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. *FEMS Microbiol.Lett.* **271**, 230-238.
26. Magnani T. et al. (2008) Silencing of mitochondrial alternative oxidase gene of *Aspergillus fumigatus* enhances reactive oxygen species production and killing of the fungus by macrophages. *J.Bioenerg.Biomembr.* **40**, 631-636.
27. Martins V.P. et al. (2010) The involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelia-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell.*
28. Maxwell D.P., Wang Y., & McIntosh L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 8271-8276.
29. Meinhardt L.W. et al. (2006) In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis pernicios*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Curr.Microbiol.* **52**, 191-196.
30. Meinhardt L.W. et al. (2008) *Moniliophthora pernicios*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Mol.Plant Pathol.* **9**, 577-588.
31. Melo A.M. et al. (2001) The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria. *J Biol.Chem.* **276**, 3947-3951.
32. Mondego J.M. et al. (2008) A genome survey of *Moniliophthora pernicios* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC.Genomics* **9**, 548.
33. Motamayor J.C. et al. (2002) Cacao domestication I: the origin of the cacao cultivated by the Mayas. *Heredity* **89**, 380-386.
34. Nelson,D.L. & Cox,M.M. (2008) Lehninger Principles of Biochemistry. Fifth edition - Ed. W.H.Freeman 1119p.
35. Pereira J.L. et al. (1989) La primera aparición de la "escoba de bruja" en la principal área productora de cacao del Brasil. *Turrialba* **139**, 459-461.

36. Pires J & E Luz (1995) Resistência à Vassoura-de-Bruxa na espécie *Theobroma cacao*. *Fitopatologia Brasileira* **20**, 303.
37. Purdy L.H. & Schmidt R.A. (1996) STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: biology, epidemiology, and management. *Annu.Rev.Phytopathol.* **34**, 573-594.
38. Rincones J. et al. (2008) Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Mol.Plant Microbe Interact.* **21**, 891-908.
39. Scarpari L.M. et al. (2005) Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. *J Exp.Bot.* **56**, 865-877.
40. Silva S.D. (1999) Histologia da Interação *Crinipellis perniciosa* em Cacaueiros Suscetível e Resistente à Vassoura-de-Bruxa. *Fitop Brasileira* **24**, 54-59.
41. Vanlerberghe G.C. & McIntosh L. (1997) ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annu.Rev.Plant Physiol Plant Mol.Biol.* **48**, 703-734.
42. Velazquez I. & Pardo J.P. (2001) Kinetic characterization of the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Biochem.Biophys.* **389**, 7-14.
43. Wagner A.M. et al. (2008) Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: the role of the alternative oxidase. *Biochim.Biophys.Acta* **1777**, 993-1000.
44. Wheeler B.E.J. (1985) The growth of *Crinipellis perniciosa* in living and dead cocoa tissue. *Symp.Ser.Br.Mycol.Soc.* **10**, 103-116.
45. Wood P.M. & Hollomon D.W. (2003) A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest.Manag.Sci.* **59**, 499-511.
46. Yukioka H. et al. (1998) Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim.Biophys.Acta* **1442**, 161-169.

OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo compreender a importância da enzima mitocondrial oxidase alternativa dos fungos *Moniliophthora perniciosa* e *Moniliophthora roreri* no metabolismo e desenvolvimento destes patógenos como também durante o desenvolvimento das doenças Vassoura de bruxa do cacaueiro e *Frosty Pod Rot*.

CAPÍTULO I

A enzima mitocondrial oxidase alternativa tem participação central no desenvolvimento da fase biotrófica de *Moniliophthora perniciosa*, agente etiológico da doença Vassoura de bruxa do cacaueiro

Daniela P. T. Thomazella, Paulo José Teixeira, Isabela Toni, Halley Caixeta Oliveira, Johana Rincones, Elzira E. Saviani, Ricardo A. Tiburcio, Odalys Garcia, Lyndel W. Meinhardt, Ione Salgado, Gonçalo A.G. Pereira

(Manuscrito em fase final de preparação)

RESUMO

Alguns dos fitopatógenos mais importantes da agricultura apresentam um ciclo de vida hemibiotrófico, com uma fase inicial biotrófica, seguida de uma fase necrotrófica caracterizada pela morte do tecido vegetal. Até o momento, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que distinguem estas duas fases de desenvolvimento e também sobre os fatores que regulam o processo de transição de fase. O agente etiológico da Vassoura de bruxa do cacaueiro, *Moniliophthora perniciosa*, é um basidiomiceto hemibiotrófico com uma fase biotrófica particularmente longa, responsável por ocasionar drásticas alterações na planta infectada. No presente trabalho, nós reportamos a identificação e caracterização, em *M. perniciosa*, de um gene codificante para a enzima oxidase alternativa (*Mp-aox*), cuja dinâmica de expressão mostrou-se bastante relacionada ao ciclo de vida hemibiotrófico deste patógeno. Níveis de expressão relativamente elevados do gene *Mp-aox* foram observados no micélio biotrófico de *M. perniciosa* cultivado *in vitro*. De acordo, verificou-se grande sensibilidade desta fase micelial à inibição da via alternativa, sugerindo que a AOX tem importante participação no desenvolvimento deste primeiro estágio do fungo. Curiosamente, a inibição *in vitro* da cadeia respiratória principal retardou a transição da fase biotrófica para a necrotrófica. Além disso, o uso combinado de um inibidor da via principal com um inibidor da AOX resultou em total inibição do desenvolvimento do fungo *in vitro* como também preveniu o estabelecimento da doença em plântulas de cacau. Com base nesses dados, um modelo no qual a participação diferencial das vias de transporte de elétrons (principal e alternativa) regula o desenvolvimento do micélio biotrófico e a transição de fase de *M. perniciosa* é apresentado.

INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao*) é uma commodity tropical, economicamente importante como matéria prima para a confecção do chocolate, um produto apreciado mundialmente. Nas últimas décadas, a produção mundial de cacau vem sendo ameaçada por muitas doenças fúngicas. Dentre elas, a Vassoura de bruxa, causada pelo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, é considerada o principal problema fitopatológico em muitos países da América Latina e Ilhas do Caribe (Purdy & Schmidt 1996). No Brasil, a cacauicultura foi drasticamente afetada e, em apenas 10 anos, a produção anual de amêndoas de cacau passou de 400.000 toneladas para apenas 100.000 toneladas (Meinhardt et al. 2008). Apesar da severidade da doença, nenhuma estratégia se mostrou efetiva no combate ao fungo e sua disseminação para os principais produtores de cacau do globo é um risco considerável, ameaçando assim as indústrias chocolateiras de todo o mundo (Griffith et al. 2003).

M. perniciosa é classificado como um fungo basidiomiceto hemibiotrófico com duas fases miceliais distintas em seu ciclo de vida (Griffith et al. 2003; Meinhardt et al. 2008). Na primeira fase, conhecida como fase biotrófica, o micélio é caracterizado por hifas monocarióticas de crescimento bastante lento, encontradas em baixa densidade no tecido infectado da planta (Evans 1980). Este micélio biotrófico coloniza o espaço intercelular dos tecidos meristemáticos do cacaueiro como almofadas florais, meristemas apicais e laterais e frutos jovens em desenvolvimento (Griffith et al. 2003). Quando a infecção ocorre no meristema de ramos, os sintomas da doença são manifestados pelo desenvolvimento hipertrófico e hiperplásico do tecido infectado, o que caracteriza o fenótipo conhecido como “vassoura verde”. Após dois a três meses, o fungo sofre alterações morfológicas permanentes, que coincidem com a necrose do tecido de cacau infectado (Meinhardt et al. 2008). Este segundo estágio micelial, conhecido como micélio

necrotrófico ou saprotrófico, apresenta intenso crescimento inter e intracelular e é caracterizado por hifas dicarióticas que apresentam estruturas típicas, denominadas de grampos de conexão (Evans 1980; Meinhardt et al. 2008). Os fatores envolvidos na transição da fase biotrófica para a fase necrotrófica do fungo ainda não são bem entendidos, mas parecem estar relacionados à disponibilidade de nutrientes e fontes de carbono para o patógeno (Meinhardt et al. 2006). Finalmente, seguindo ciclos alternados de chuva e seca, os cogumelos (basidiomata) frutificam sobre as vassouras necrosadas e produzem os esporos (basidiósporos), completando assim o ciclo de vida do patógeno (Griffith et al. 2003; Meinhardt et al. 2008).

Em 2000, o projeto genoma de *M. pernicioso* foi iniciado visando compreender a biologia deste fungo e elucidar mecanismos que estariam potencialmente envolvidos na interação do patógeno com o cacaueiro. A análise do genoma de *M. pernicioso* levou à identificação de um gene codificante para a enzima oxidase alternativa (AOX). A AOX é uma ubiquinol oxidase que catalisa a redução do oxigênio molecular a água, constituindo assim uma rota respiratória alternativa à cadeia respiratória principal (Siedow & Umbach 2000). Diferentemente da citocromo *c* oxidase (complexo IV), a transferência de elétrons pela AOX não está associada à síntese de ATP e a energia proveniente do transporte de elétrons é liberada na forma de calor (Elthon & McIntosh 1987; Joseph-Horne, Hollomon, & Wood 2001). Desta forma, o uso da via alternativa resulta em apenas um sítio acoplado para fosforilação oxidativa (complexo I) e a produção de energia diminui para aproximadamente um terço do ATP gerado pela via principal (Lorin, Dufour, & Sainsard-Chanet 2006).

A AOX ocorre em todas as plantas superiores, em alguns fungos, protistas, bactérias e alguns poucos animais (Chaudhuri, Ott, & Hill 2006; Joseph-Horne et al. 2001; McDonald, Vanlerberghe, & Staples 2009; Nakamura et al. 2010; Stenmark & Nordlund 2003). Embora

amplamente distribuída, a função precisa da enzima é bem caracterizada apenas em plantas termogênicas, como espécies pertencentes à família Araceae (Wagner et al. 2008). Durante o processo reprodutivo dessas plantas, a AOX é uma enzima muito importante, com a função de gerar calor para volatilização de aminas e consequente atração de insetos polinizadores (Wagner et al. 2008). Em tecidos não termogênicos como também nos demais organismos, as funções da via alternativa vêm sendo bastante discutidas. A função mais aceita para a enzima é sua participação na resposta ao estresse associado à restrição/inibição da via principal (Vanlerberghe & McIntosh 1997). Sob estas condições, a AOX é capaz de continuar o transporte de elétrons, desviando o fluxo dos complexos III e IV e, prevenindo assim, o estresse oxidativo associado com o aumento da geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Maxwell, Wang, & McIntosh 1999).

Nos últimos anos, tem surgido um forte interesse no estudo da AOX de fungos fitopatogênicos. Isto porque, verificou-se que esta enzima é um importante mecanismo de resistência desses organismos contra a toxicidade de fungicidas da classe QoI. Estas drogas têm como princípio ativo as estrobilurinas, potentes inibidores da via principal, sendo capazes de inibir seletivamente a cadeia respiratória de fungos (Bartlett et al. 2002). A toxicidade das estrobilurinas está principalmente relacionada à redução da síntese de ATP e ao aumento da produção de EROs mitocondrial. No entanto, a AOX é capaz de “tamponar” a toxicidade dessas moléculas, prevenindo a geração do estresse oxidativo (Affourtit, Heaney, & Moore 2000; Wood & Hollomon 2003; Yukioka et al. 1998). Enquanto a função da AOX na conferência de resistência a fungicidas da classe QoI tem sido bastante estudada, o papel da enzima no desenvolvimento *in planta* e ciclo de vida de fungos fitopatogênicos é ainda bastante discutido.

Neste estudo, nós apresentamos, pela primeira vez, fortes evidências para uma função

biológica da AOX no ciclo de vida de um fitopatógeno. O gene *aox* identificado no genoma do patógeno do cacaueiro *M. perniciosa* foi caracterizado e uma clara correlação entre o ciclo de vida hemibiotrófico do fungo e a funcionalidade da via alternativa foi observada. Finalmente, nós demonstramos que o uso combinado de um inibidor da AOX com um inibidor da via principal foi eficientemente capaz de inibir o desenvolvimento do fungo e prevenir o desenvolvimento da doença Vassoura de bruxa em plântulas de cacau.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico e condições de crescimento

Os experimentos foram realizados com o isolado FA553 de *M. pernicioso*. Este isolado foi coletado em Ilhéus, Bahia e apresenta patogenicidade a plantas de cacau suscetíveis. A manutenção do micélio necrotrófico *in vitro* foi realizada em meio padrão de crescimento do fungo MYEA – *malt yeast extract agar* (extrato malte 20g/L, extrato de levedura 5g/L, ágar 20g/L).

Cogumelos (basidiomata) e basidiósporos de *M. pernicioso* foram obtidos a partir do crescimento do micélio necrotrófico em substrato específico previamente descrito por Griffith e Hedger (Griffith & Hedger 1993). O substrato é composto por uma mistura de galhos e folhas triturados de cacaueiro (77% p/v), aveia (20% p/v), CaSO_4 (3% p/v) e água, sobre o qual é inoculado o micélio necrotrófico. Após a completa colonização pelo fungo, o substrato é pendurado em uma caixa de acrílico estéril e regado diariamente para obtenção dos cogumelos. Os basidiósporos produzidos são coletados em solução contendo glicerol 16%; MES 0,01M e Tween 20 0,01%; pH 6,1 (Frias, Purdy, & R.A.Schmidt 1995).

O micélio infectivo (biotrófico) foi gerado *in vitro* a partir da germinação de basidiósporos em meio específico para manutenção da fase biotrófica (extrato de levedura Difco™ 5g/L; glicerol 50 mL/L; K_2HPO_4 2,5 g/L; elementos traços 1 mL/L – $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/ml; MnSO_4 1,56 mg/ml; ZnCl_2 1,67 mg/ml; CoCl_2 2 mg/ml) (Meinhardt et al. 2006). A transferência do micélio biotrófico para qualquer outro meio rico em nutrientes induz a rápida transição para a fase necrotrófica.

Para análise de expressão gênica nos quatro estágios principais de desenvolvimento do fungo (esporos, cogumelos, micélio biotrófico e micélio necrotrófico), cultivaram-se ambos os

micélios biotrófico e necrotrófico em meio específico de manutenção da fase biotrófica (Meinhardt et al. 2006). As culturas foram mantidas a temperatura constante de 28°C e agitação de 120 rpm.

A expressão do gene *Mp-aox* em resposta ao fungicida azoxistrobina (30 mg/L) e ao doador de óxido nítrico (NO) NOC-5 (0,4 mM) foi verificada utilizando-se o micélio necrotrófico crescido em meio com baixo conteúdo de carboidratos – 1,7 g/L de *malt extract broth* (Difco), 5 g/L de extrato de levedura, 50 ml/L de glicerol. As culturas permaneceram sob agitação constante de 120 rpm e a temperatura de 28°C. Após 10 dias de crescimento, as culturas foram separadamente tratadas com azoxistrobina (30 mg/L) e com o doador de NO NOC-5 (0,4 mM) durante 4 horas. Como controle para a azoxistrobina utilizou-se também o tratamento do fungo com metanol, uma vez que este foi usado como solvente do fungicida.

A variedade “comum” de *Theobroma cacao* (Catongo) foi utilizada na realização dos experimentos. As plantas foram crescidas por aproximadamente três meses em ambiente controlado de casa de vegetação sob temperaturas médias de 26°C, umidade maior que 80% e fotoperíodo de 12h.

Caracterização básica do gene *Mp-aox* e análises de *Southern blot*

O gene *aox* de *Cryptococcus neoformans* (Genbank gene ID 4933396) foi usado como referência para identificação, através de tblastx, do contig genômico correspondente ao gene *aox* de *M. pernicioso* (*Mp-aox*). A sequência correspondente à região codante de *Mp-aox* foi obtida através de blastn do contig genômico contra o banco de ESTs de *M. pernicioso*. O software *ClustalW* foi utilizado para alinhar a sequência genômica com a região codante do gene *Mp-aox* para identificação dos exons e introns. A tradução da sequência de nucleotídeos foi realizada com

o software *Translate tool* (*Expasy Proteomics Server*) e a presença do peptídeo de direcionamento para a mitocôndria na região N-terminal da sequência da AOX foi avaliada com o software *Target P* (Henrik Nielsen et al. 1997; Olof Emanuelsson et al. 2000).

Complementando as informações sobre a AOX de *M. pernicioso*, a filogenia desta proteína foi realizada a partir do alinhamento de aproximadamente 255 aminoácidos de um conjunto de sequências de diversos organismos. O software *ClustalW* foi utilizado para o alinhamento destas sequências, que foram obtidas através de *tblastx* do gene *Mp-aox* contra o banco nt/nr do NCBI. A filogenia foi construída por verossimilhança máxima, utilizando-se o programa *Phyml*, o qual também foi utilizado para avaliação da confiabilidade dos ramos com 1000 *bootstraps*.

Finalmente, o número de cópias do gene *aox* no genoma de *M. pernicioso* foi determinado por meio da técnica de *Southern blot* (Sambrook & Russell 2001). O DNA genômico do micélio necrotrófico foi extraído através do método CTAB (Sambrook et al. 2001) e quantificado utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Aproximadamente 10 µg de DNA foram individualmente digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI (1), *Cla* I (2) e *Xho* I (3), que não cortam a região do gene *aox* e *Eco* RI (4), *Eco* RV (5) e *Hind* III (6) que têm um sítio de restrição dentro do gene. As enzimas foram selecionadas utilizando-se o software *Clone Manager* 4.

O DNA digerido foi transferido *overnight*, pelo método de transferência alcalina, para membranas carregadas Hybond N+ (*Amersham – GE Healthcare Life Sciences*), segundo protocolo padrão (Sambrook et al. 2001).

A pré-hibridização, hibridização e lavagem das membranas Hybond N+ (*Amersham – GE Healthcare Life Sciences*) contendo o DNA digerido foram feitas segundo Sambrook (Sambrook

et al. 2001). O tampão de hibridização – contendo formamida e PEG-8000 como intensificador do sinal radioativo – foi preparado da seguinte maneira: 50% de formamida, 0,12M de Na_2HPO_4 (pH 7,2), 7% de SDS, 0,25 M de NaCl, 1 mM de EDTA, 10% de PEG-8000 e 200 μl de DNA de esperma de salmão (10 mg/ml). Em virtude da presença da formamida, a pré-hibridização e hibridização foram conduzidas a 43°C.

Como molde para preparo da sonda, utilizou-se um fragmento de aproximadamente 1000 pb do gene *aox* obtido através de amplificação do DNA genômico, usando os *primers* AOXF - 5'-ATGCTTGCGATTCTGACTC-3' e AOXR - 5'-TGAGTGTCTGCGTTTCG-3'. Este produto foi marcado isotopicamente com ATP^{32} (> 3000 ci, *Amersham – GE Healthcare Life Sciences*) seguindo a técnica de hexaoligonucleotídeo aleatório (Feinberg & Vogelstein 1983), incorporado mediante polimerização com a enzima Klenow (*Amersham – GE Healthcare Life Sciences*). Após a marcação, a sonda foi purificada em coluna *Microspin HS300* (*Amersham – GE Healthcare Life Sciences*) e desnaturada a 95°C. Constatou-se a presença de radioatividade na sonda com medidor Geiger e adicionou-se a mesma à solução de pré-hibridização. O sistema permaneceu a 43°C *overnight* sob rotação constante no forno de hibridização. Após as lavagens para retirada da marcação inespecífica, a membrana foi exposta a uma auto-radiografia em filme IBF–Medix, durante três a quatro dias a -70°C.

Análise da expressão gênica por *Real time RT-PCR*

O RNA total do fungo nas diferentes condições experimentais foi extraído com o kit *RNeasy Mini Kit* da Qiagen segundo as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA foi tratado com *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen) e sua concentração e qualidade foram

verificados no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. A integridade do RNA foi avaliada em gel desnaturante de agarose (1%).

Uma quantidade padrão de RNA (1 µg) de cada condição foi utilizada para a síntese de cDNA com o kit *SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR* da Invitrogen, utilizando-se *random primers* para a transcrição reversa. O cDNA obtido foi utilizado para as reações de *Real time RT-PCR*.

Para a análise da expressão de cada gene, os *primers* específicos utilizados foram: A) para amplificação do gene *aox* AOXRTF 5'-GAC GTG CCT TTC GGA TAG AG-3' e AOXRTR 5'-CTT GCC AGG AGG AAT GGT T-3'; B) para amplificação do gene β -actina, ACTRTF 5'-CCC TTC TAT CGT CGG TCGT-3' e ACTRTR 5'-AGG ATA CCA CGC TTG GAT TG-3' e C) para amplificação do gene codificante para a proteína ribossomal L44, L44RTF 5'-CAACTCTCTTTGAAGCGTTGC-3' e L44RTR 5'-CGAGGAACATGACGCAATTA-3. A temperatura de anelamento de todos os pares utilizada nas reações de *Real time RT-PCR* foi de 53°C.

O *Real time* foi realizado com o kit SYBR® *Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems by Life Technology*) para detecção da fluorescência durante a amplificação no aparelho *StepOnePlus system* (*Applied Biosystems by Life Technology*) acoplado ao software *StepOnePlus*, em uma reação contendo: 8 µl de *Sybr Green PCR Master Mix*, 1 µl de *primer forward* a 5 µM, 1 µl de *primer* reverso a 5 µM e aproximadamente 25 ng de cDNA num volume final de 16 µl. As reações foram preparadas em placas de 96 poços, sendo que cada placa possuía dois conjuntos de reações: A) reações da curva padrão de cada gene composta por uma diluição seriada de 40ng/µl de cDNA (de 10^0 a 10^{-7}) para análise de regressão e B) as diferentes condições nas quais a

expressão gênica seria avaliada. O cDNA utilizado para a confecção da curva padrão foi um *pool* dos cDNAs de todas as condições analisadas. Todas as condições e pontos da curva padrão foram feitos em triplicata. Os ciclos utilizados na reação de *Real time RT-PCR* foram: um ciclo de 50°C por 2 min, um ciclo de 95°C por 10 min e, finalmente, 40 ciclos de: 95°C por 15 seg; 53°C por 30 seg e 60°C por 1 min. Uma análise da curva de dissociação foi conduzida para verificar a formação de dímeros de *primers* e amplificações inespecíficas.

Para tratamento dos dados obtidos, utilizou-se o método matemático da eficiência descrito por Pfaffl (2001) (Pfaffl 2001). Este método se baseia na eficiência dos *primers* na reação e na variação de Ct (*cycle threshold*) entre as amostras. A expressão relativa do gene *Mp-aox* foi normalizada pela média geométrica da expressão dos genes controle-endógenos codificantes para β -actina e proteína ribossomal L44, através da utilização do programa geNORM para Microsoft Excel (Vandesompele et al. 2002).

Isolamento de mitocôndrias e ensaios de consumo de oxigênio

O protocolo utilizado foi baseado na metodologia desenvolvida por Gredilla e colaboradores (Gredilla, Grief, & Osiewacz 2006). Foram utilizadas culturas líquidas de *M. perniciosus* crescidas durante sete dias em meio com baixo teor de carboidratos. Para obtenção das mitocôndrias purificadas macerou-se inicialmente 40 g de micélio (peso úmido) em 200 ml de tampão de extração contendo Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, BSA 0,1 %, DTT 2mM, PMSF 0,3 mM e Sacarose 400 mM, pH 7,5. A maceração foi realizada com um *bead beater*, utilizando-se dois pulsos de 15 segundos com intervalos de 1 minuto. Em seguida, o homogenato foi filtrado e o pH ajustado para 7,1. O filtrado obtido foi então centrifugado a 1000xg por 10 minutos e uma

segunda centrifugação a 19000xg por 20 minutos foi realizada com o sobrenadante. O pellet contendo as mitocôndrias foi lavado duas vezes com tampão de lavagem (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM e Sacarose 400 mM, pH 7,2) e ressuspendido em 250 µl do mesmo meio. A concentração de proteínas foi avaliada pelo método de Bradford, utilizando-se BSA como padrão (1976).

O consumo de oxigênio mitocondrial foi avaliado a 27°C utilizando-se um eletrodo de oxigênio do tipo Clark conectado a um oxígrafo (Hansatech). Aliquotas da suspensão mitocondrial (2 mg de proteína/mL) foram adicionadas à câmara de reação contendo 1 ml do tampão de respiração (Sacarose 330 mM; KH₂PO₄ 10 mM; MgCl₂ 5 mM; EGTA 1 mM; KCl 10 mM e BSA 0,1 %; pH 7,2). Para a análise do perfil de consumo de oxigênio, as mitocôndrias foram energizadas com NADH 1 mM, seguido da adição de ADP 300 µM. A atividade da AOX foi verificada na presença de antimicina-A 5 µM e foi avaliada pelo consumo de oxigênio residual estimulado por GMP 1 mM (estimulador específico da AOX de fungos) e inibido por *n*-propil galato 100µM (inibidor específico da AOX).

Ensaio *in vitro* de inibição do crescimento micelial de *M. pernicios* na presença dos inibidores azoxistrobina e SHAM

Os efeitos dos inibidores das vias de transporte de elétrons principal e alternativa foram avaliados sobre o crescimento *in vitro* das fases miceliais de *M. pernicios*. Para isto, foram utilizados como inóculo os micélios biotrófico e necrotrófico. A azoxistrobina (1 mg/L), inibidor específico do complexo III, foi utilizada como inibidor da via principal e o SHAM (0,75 g/L) como inibidor da via alternativa. Estas drogas foram adicionadas combinadas e separadamente ao

meio padrão de crescimento de *M. perniciosus* MYEA. Em seguida, os micélios biotrófico e necrotrófico foram inoculados nos meios com as diferentes combinações dos inibidores e o padrão de crescimento do micélio foi observado semanalmente e registrado por fotografias. A importância das vias respiratórias foi revelada através da análise dos efeitos destes inibidores respiratórios sobre o crescimento dos micélios. Além disso, a morfologia micelial também foi verificada. Após coloração das hifas com o corante Calcofluor White M2R (Fluorescent Brightener 28, Sigma), estas foram analisadas por microscopia ótica de epifluorescência sob luz ultravioleta (filtros 340 a 380 nm), em microscópio Olympus BX-51.

Medição fluorométrica da emissão de NO em plântulas de cacau infectadas com *M. perniciosus*

Meristemas apicais de plântulas de cacau saudáveis (controle) e no estágio de vassoura verde foram coletados para avaliação da emissão de NO utilizando-se o indicador fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2). A reação entre o DAF-2, uma molécula praticamente não fluorescente, e o NO, na presença de oxigênio, resulta na formação de um produto de elevada fluorescência, a triazolofluoresceína (DAF-2T) (Kojima et al. 1998). A fluorescência resultante do DAF-2T aumenta com a concentração de NO (Kojima et al. 1998; Nagata, Momose, & Ishida 1999).

Aproximadamente 80 mg de cada amostra foram incubados em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7.2) contendo DAF-2 25 μ M, durante 1 h, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após remoção do tecido, a solução foi diluída 2,5 vezes e o espectro de emissão de fluorescência entre 500 e 550 nm sob excitação de 495 nm foi obtido em um espectrofluorímetro Hitachi F-

2500 (Hitachi). As análises foram feitas em triplicatas e a solução de trabalho contendo DAF-2 sem o material vegetal foi utilizada como o branco.

Visando confirmar a especificidade de detecção do radical NO pelo método do DAF-2, o mesmo experimento foi repetido com uma amostra adicional de vassoura verde incubada com o *scavenger* de NO cPTIO (1mM) (Calbiochem), diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7.2). Neste caso, a presença do cPTIO mitigaria a fluorescência associada à presença do radical NO na amostra.

Efeito dos inibidores azoxistrobina e SHAM sobre o desenvolvimento da doença Vassoura de bruxa em plântulas de cacau

Os efeitos preventivos e curativos dos inibidores das vias principal (azoxistrobina) e alternativa (SHAM) sobre o estabelecimento e desenvolvimento da doença Vassoura de bruxa do cacaueiro foram verificados.

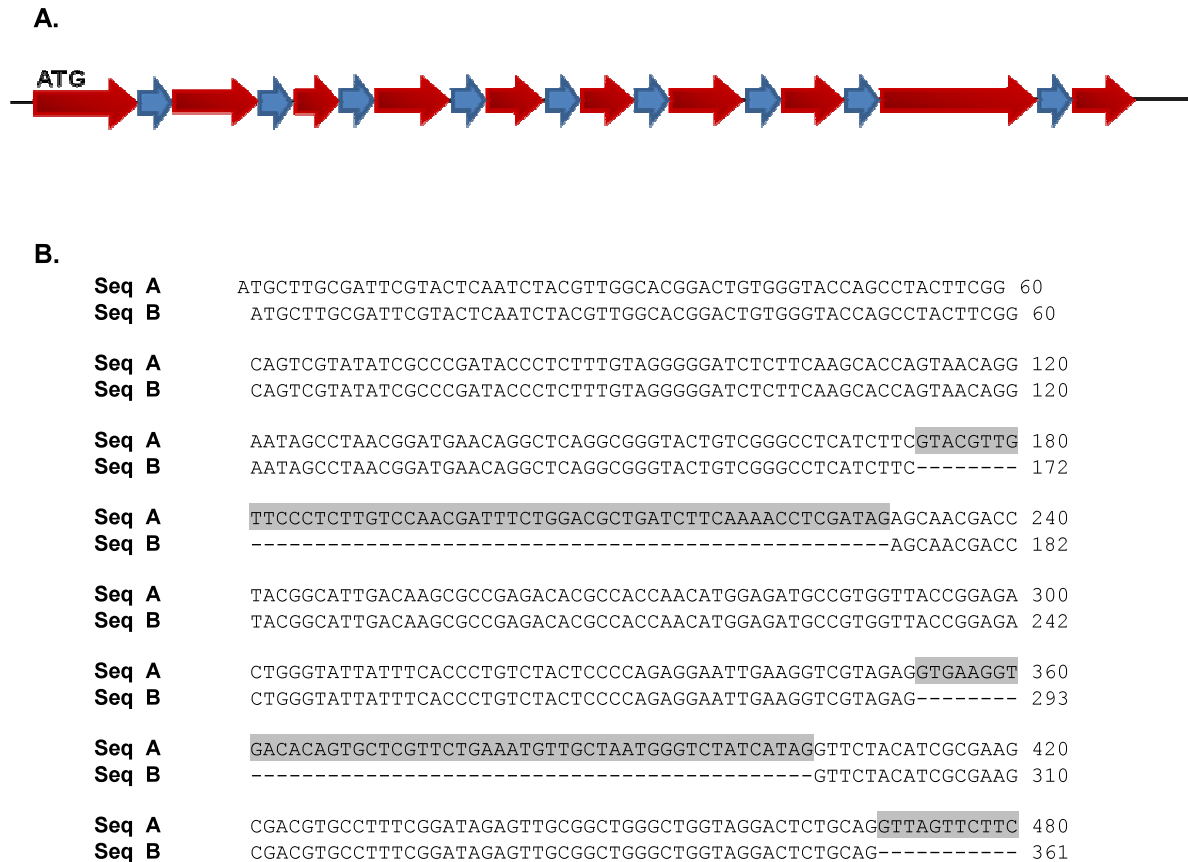
Um total de 45 plantas foram inoculadas com 60 µl de uma suspensão de esporos de *M. perniciosa* a uma concentração de $8,5 \times 10^6$ esporos/ml, conforme descrito por Frias (Frias et al. 1995). Estas plantas foram divididas em três grupos experimentais, sendo 15 plantas utilizadas como controle, 15 plantas tratadas com 150 ml das drogas 24h antes da infecção (tratamento preventivo) e 15 plantas tratadas com 150 ml das drogas 48h depois da infecção (tratamento curativo). As concentrações de azoxistrobina e SHAM utilizadas foram de 100 mg/L e 1 g/L, respectivamente. Os resultados foram registrados através de imagens fotográficas com a câmera digital Sony Cybershot W290. A porcentagem de plântulas infectadas em cada tratamento foi verificada através de inspeção visual das plantas e contagem do número de plantas doentes em

relação às sadias. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste estatístico de Fisher (*Fisher's exact probability test*) (Fisher 1958).

RESULTADOS

Identificação e caracterização básica do gene *aox* de *M. pernicioso* (*Mp-aox*)

O *screening* do banco genômico de *M. pernicioso* foi realizado utilizando-se a sequência do gene *aox* de *Cryptococcus neoformans* como referência. Com e-value de $1e^{-70}$, o *contig* correspondente ao gene *aox* de *M. pernicioso* (*Mp-aox*) foi identificado e o tamanho do gene foi determinado como sendo de 1616 nucleotídeos. Utilizando-se a sequência genômica, buscou-se, no banco de ESTs de *M. pernicioso*, a sequência correspondente à região codante deste gene (1137 nucleotídeos). O alinhamento entre a sequência genômica e a região codante permitiu a identificação de dez exons e nove introns (Figura 1). Estes com tamanho médio de 50 nucleotídeos, como verificado para os introns dos demais genes nucleares de *M. pernicioso*.



Seq A	CGTGTATGCGGCATGGAAAATATGTAACGTCTCGAATTTAG	GTGGGGTTACAACTTTGT	540
Seq B	-----	GTGGGGTTACAACTTTGT	377
Seq A	AACGCGCTACAAGCACAAAACCATTCCTCCTGGTAAGAACATGACGCTTGCCGAACCTTCG		600
Seq B	AACGCGCTACAAGCACAAAACCATTCCTCCTGGTAAGAACATGACGCTTGCCGAACCTTCG		437
Seq A	TAAAGAGGGCTACCTTCTGGATGATAAGGCTTGGCTCAGC	GTCAGTCACGCAGCGTTCTA	660
Seq B	TAAAGAGGGCTACCTTCTGGATGATAAGGCTTGGCTCAGC	-----	477
Seq A	TCTCTGTTCCAACTCTCACCAGTATACAG	CGGATCCTGTTTCCTCGAGTCCATAGCGGGCG	720
Seq B	-----	CGGATCCTGTTTCCTCGAGTCCATAGCGGGCG	508
Seq A	TTCCGGGAATGGTGGCGGCGACAATACGACACCTAACAGTTTAAGGCTGATG	GTATGCC	780
Seq B	TTCCGGGAATGGTGGCGGCGACAATACGACACCTAACAGTTTAAGGCTGATG	-----	561
Seq A	ATTACCAACTAATGACAAGGCTTGCATTACTTAATTTGTCCCTTAG	CGCCGTGGTAACGG	840
Seq B	-----	CGCCGTGGTAACGG	575
Seq A	GTGGATTACACCTGCCTAGAAGAAGCAGAGAACGAGAGGATGCATCTCAT	GTGAGTGAT	900
Seq B	GTGGATTACACCTGCCTAGAAGAAGCAGAGAACGAGAGGATGCATCTCAT	-----	627
Seq A	GATATAGTGCTTCGGATGTCAAAGTCGTGTCACTAATGCTATGGTATAATAG	GACCTTCA	960
Seq B	-----	GACCTTCA	634
Seq A	TGACACTTCGAAAACCATCCATATTCTTCCGTGCTATGATATTAGGCGCACAGGGTGTCT		1020
Seq B	TGACACTTCGAAAACCATCCATATTCTTCCGTGCTATGATATTAGGCGCACAGGGTGTCT		694
Seq A	TTTACAACCTGTTCT	GTGAGTCCTCTTACAGCATTCGCGGTGGCTGATGCTGACTTCTTT	1080
Seq B	TTTACAACCTGTTCT	-----	709
Seq A	ACTTAGTCCTATCGTACATCATCTCTCCACGGATCTGTCACTCGTTTCGTTGGGTGTCTCG		1140
Seq B	-----TCCTATCGTACATCATCTCTCCACGGATCTGTCACTCGTTTCGTTGGGTGTCTCG		763
Seq A	AAGAAGAGGCCGTACTAACCTA	GTGAGTCCCATTTTGAAGTTGTCGACGAGCACTAATT	1200
Seq B	AAGAAGAGGCCGTACTAACCTA	-----	785
Seq A	CCCTGTCTTCAGT	TACAAAATGTATCAAAGACATCGAAGCTGGATACGTGCCTGAATGGTC	1260
Seq B	-----TACAAAATGTATCAAAGACATCGAAGCTGGATACGTGCCTGAATGGTC		833
Seq A	CGACATGCCAGCACCGAAGATCGCCATAGATTATTGGCGACTTCCTGCGGACGCTAAGCT		1320
Seq B	CGACATGCCAGCACCGAAGATCGCCATAGATTATTGGCGACTTCCTGCGGACGCTAAGCT		893
Seq A	ACTGGACGTCATCTATGCGGTGCGTTCCGATGAGACAACACATCGATTTCGTCACCATAG		1380
Seq B	ACTGGACGTCATCTATGCGGTGCGTTCCGATGAGACAACACATCGATTTCGTCACCATAG		953
Seq A	TCTAGCGAACTTGAATGGCGACGACGACGTAATCCGTTTGCTCTGATGGAACCCGACAT		1440
Seq B	TCTAGCGAACTTGAATGGCGACGACGACGTAATCCGTTTGCTCTGATGGAACCCGACAT		1013
Seq A	GCACACGAAAGGGAAGAAGATTGC	GTAGGTCTTTTGTGCTTCAGGAGATAACAAGTCG	1500
Seq B	GCACACGAAAGGGAAGAAGATTGC	-----	1039
Seq A	CTGACGCACATGCTAG	GTTTCGAACGCTCAGAGTCAGAGCAGTATCTCAAGGAGACTCACA	1560
Seq B	-----GTTTCGAACGCTCAGAGTCAGAGCAGTATCTCAAGGAGACTCACA		1081
Seq A	ACGTTCTTCGGGAACAACACGAGGCACACCCAGGGCCGAACGCAGGACACTCATGA		1616
Seq B	ACGTTCTTCGGGAACAACACGAGGCACACCCAGGGCCGAACGCAGGACACTCATGA		1137

Figura 1. Esquema representativo do gene *aox* de *M. pernicioso*. Em (A) apresenta-se uma ilustração da sequência genômica de *Mp-aox*, onde os exons são mostrados em vermelho e os introns, proporcionalmente dispostos, em azul. (B) Alinhamento entre a sequência genômica (Seq A) e região codante (Seq B) do gene *Mp-aox*. Os exons são separados por introns (em destaque) de aproximadamente 50 pb.

O gene *Mp-aox* está presente em uma única cópia no genoma de *M. pernicioso*

A análise de *Southern blot* do DNA genômico digerido de *M. pernicioso* mostrou um padrão coerente com a presença de uma única cópia do gene *Mp-aox* no genoma do fungo (Figura 2). As digestões do DNA com as enzimas de restrição que não apresentavam sítio internamente ao gene *Mp-aox* (*Bam* HI, *Cla* I e *Xho* I) mostraram uma única banda após a hibridização. Já as digestões com as enzimas que possuíam um sítio único de restrição na região do gene (*Eco* RI, *Eco* RV e *Hind* III) mostraram a presença de duas bandas.

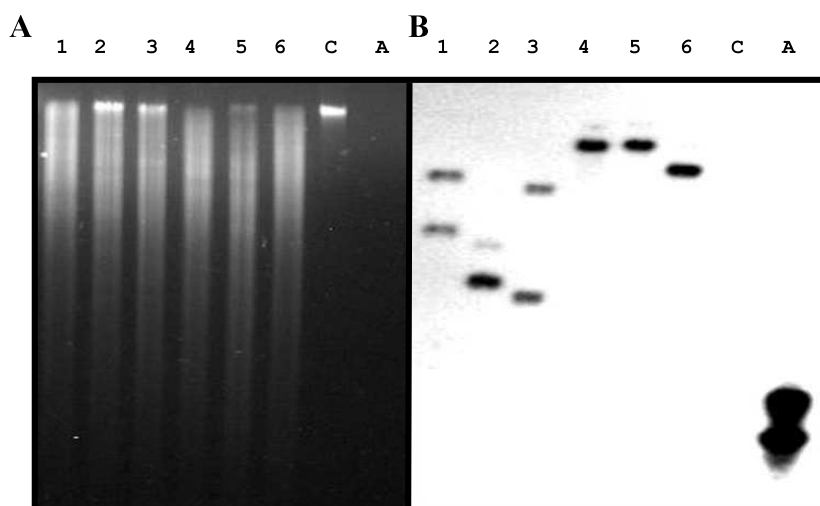


Figura 2. Análise de *Southern blot* utilizando-se DNA genômico de *M. pernicioso*. (A) Gel de agarose mostrando DNA total do fungo digerido com as enzimas *Bam* HI (1), *Cla* I (2) e *Xho* I (3), que não cortam internamente ao gene *Mp-aox*, e *Eco* RI (4), *Eco* RV (5) e *Hind* III (6), que cortam uma vez na região interna do gene. C – Controle: DNA genômico não digerido; A – Fragmento de aproximadamente 1.1 kb do gene *Mp-aox* usado como controle. (B) Membrana contendo os DNAs digeridos apresentados no gel anterior, após hibridização com a sonda correspondente ao gene *Mp-aox*.

A AOX de *M. pernicios*a possui homologia com as AOXs de outros organismos

A proteína codificada pelo gene *Mp-aox* é composta por 378 aminoácidos, sendo os 40 primeiros resíduos correspondentes ao peptídeo de sinalização para a mitocôndria. Muitas das regiões conservadas das proteínas AOX já descritas para outros fungos e plantas também foram encontradas na AOX de *M. pernicios*a (Figura 3). Dentre elas, identificaram-se as regiões que contêm os aminoácidos histidina (H) e ácido glutâmico (E), os quais supostamente interagem com os átomos de ferro no sítio ativo da enzima funcional (Moore, Umbach, & Siedow 1995; Siedow et al. 2000; Siedow, Umbach, & Moore 1995). Além disso, assim como outros fungos, a AOX de *M. pernicios*a não possui a cisteína conservada presente em praticamente todas as sequências de plantas superiores (Figura 3). Esta cisteína permite a dimerização da enzima em plantas, regulando assim sua atividade. Contrariamente, na maioria dos fungos, a AOX existe apenas como um monômero e a atividade da enzima é principalmente regulada por mononucleotídeos (AMP e GMP) (Umbach & Siedow 2000).

Figura 3. Alinhamento da sequência de aproximadamente 255 aminoácidos da AOX de plantas, algas (Viridiplantae) e fungos (Fungi). C1, C2, C3 e C4 correspondem aos domínios conservados da proteína. As regiões iniciais de alta variabilidade e baixa similaridade entre plantas e fungos, bem como a região terminal das sequências de fungo, que não tem correspondente em plantas, foram removidas. As setas vermelhas destacam os resíduos de histidina e ácido glutâmico ligantes do átomo de ferro do sítio ativo da enzima. A seta azul destaca a cisteína (C128 em *A. thaliana*) relacionada à dimerização da enzima em plantas e ausente em fungos.

Análise filogenética das oxidase alternativas

A construção da filogenia da AOX foi realizada utilizando-se sequências de diversas plantas, algas e fungos, incluindo-se *M. perniciosa*. Em fungos, a AOX é bastante conservada e sua filogenia acompanha a evolução das espécies, de modo que as espécies dos grupos de basidiomicetos e ascomicetos foram corretamente dispostas e *M. perniciosa* agrupou com os demais basidiomicetos, tanto patogênicos como não-patogênicos (Figura 4).

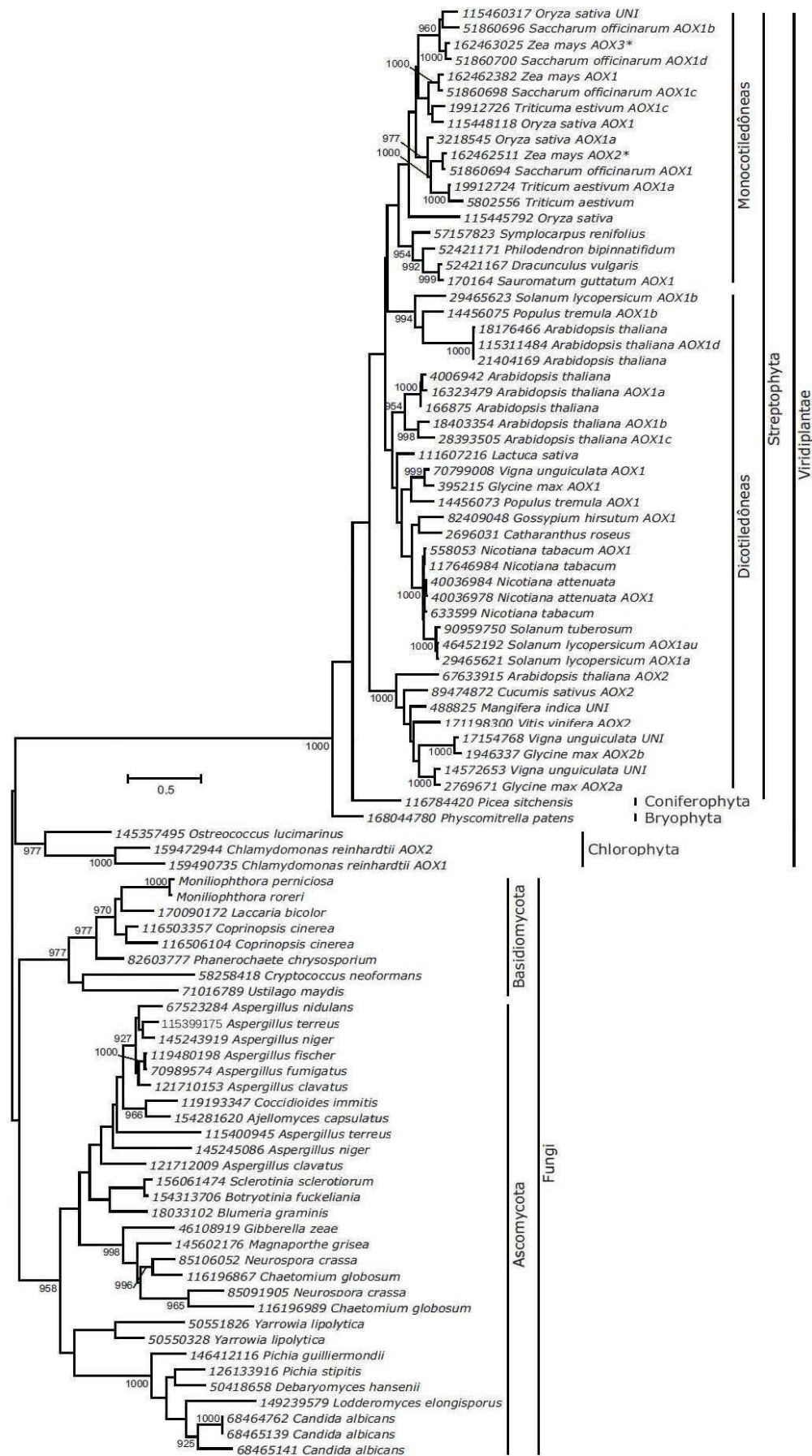


Figura 4. Filogenia das sequências de AOX de plantas e fungos disponíveis no NCBI. Valores de *bootstraps* maiores que 900/1000 são mostrados próximos aos respectivos ramos. Os grupos taxonômicos indicados foram obtidos no NCBI. A raiz foi posicionada entre Viridiplantae e fungos.

Deteção da atividade da AOX em mitocôndrias isoladas de *M. perniciososa*

Visando investigar a funcionalidade da oxidase alternativa de *M. perniciososa*, o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas foi avaliado. A participação de cada via respiratória foi verificada utilizando-se os inibidores clássicos da via principal (antimicina-A) e da AOX (*n*-propil galato).

O consumo de oxigênio pelo micélio necrotrófico é mostrado na figura 5. A aplicação da antimicina-A ao preparado mitocondrial inibiu parcialmente o consumo de oxigênio. A respiração restante foi induzida pelo GMP e em seguida inibida pelo *n*-propil galato, indicando assim a existência de uma via alternativa funcional nas mitocôndrias de *M. perniciososa*.

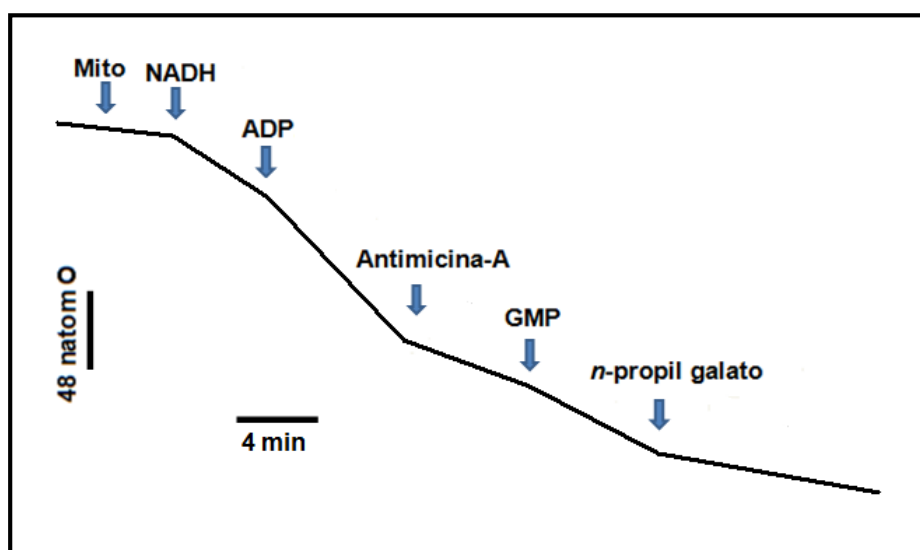


Figura 5. Padrão de consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas do micélio necrotrófico de *M. perniciososa*. NADH 2mM foi utilizado como substrato respiratório e ADP como substrato para o complexo enzimático ATP sintase. Após inibição da cadeia respiratória principal pela antimicina-A, o consumo de oxigênio foi estimulado pelo GMP e inibido pelo *n*-propil galato.

A expressão do gene *Mp-aox* é regulada de acordo com as fases de desenvolvimento de *M. pernicioso*

Visando verificar a participação diferencial da AOX nas diferentes fases do fungo, analisou-se o perfil de expressão do gene *Mp-aox* durante o desenvolvimento *in vitro* de *M. pernicioso* (Figura 6). Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de transcritos deste gene entre os estágios de basidiósporos, micélio necrotrófico e cogumelos. No entanto, os transcritos do gene *Mp-aox* foram consideravelmente abundantes na fase biotrófica de *M. pernicioso* e uma indução de mais de seis vezes em relação aos demais estágios de desenvolvimento do fungo foi observada (Figura 6).

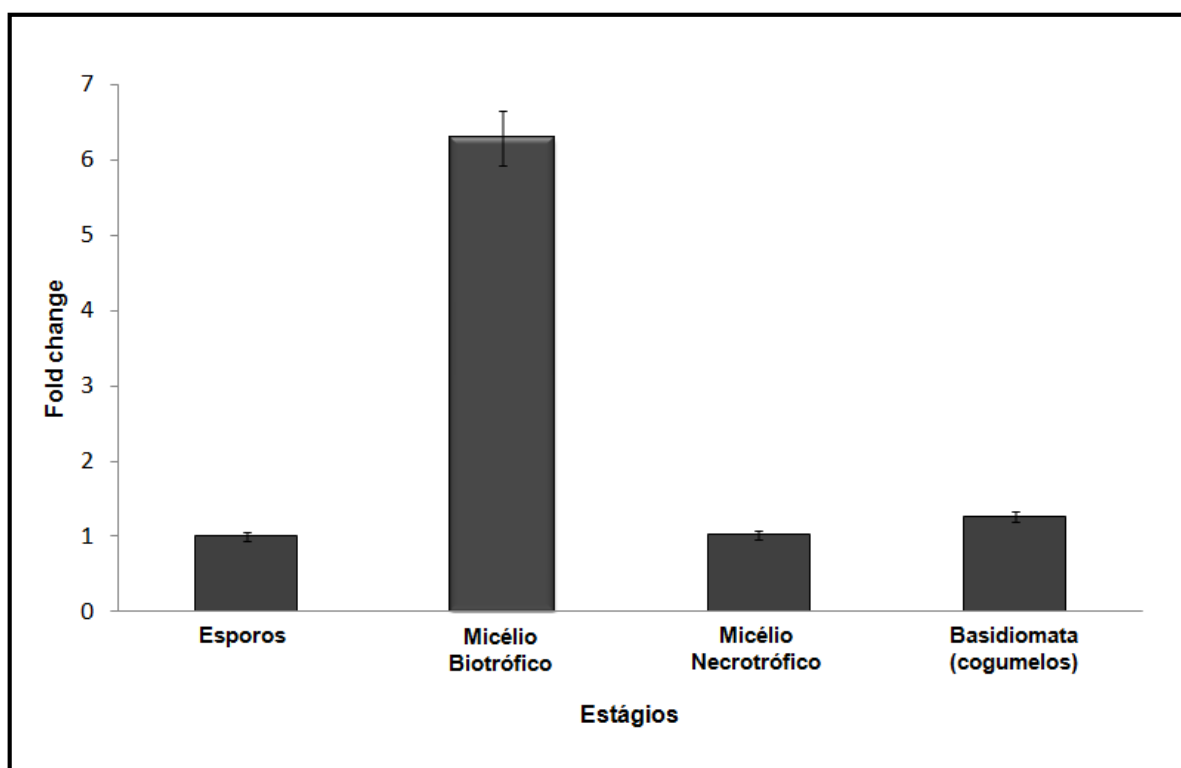


Figura 6. Expressão relativa do gene *Mp-aox* nas diferentes fases de desenvolvimento de *M. pernicioso*, obtida através de ensaios de *Real time RT-PCR*. Uma evidente indução de *Mp-aox* foi observada no micélio biotrófico.

O tratamento de *M. perniciosus* com inibidores da cadeia respiratória principal induz a expressão do gene *Mp-aox*

O gene *Mp-aox* apresentou uma considerável indução após o tratamento do micélio necrotrófico do fungo com o doador de NO NOC-5, havendo um aumento de aproximadamente 10 vezes na expressão deste gene, em relação ao micélio não tratado (Figura 7A). Adicionalmente, o fungicida azoxistrobina ocasionou um efeito similar, havendo indução aproximada de quatro vezes de *Mp-aox* (Figura 7B).

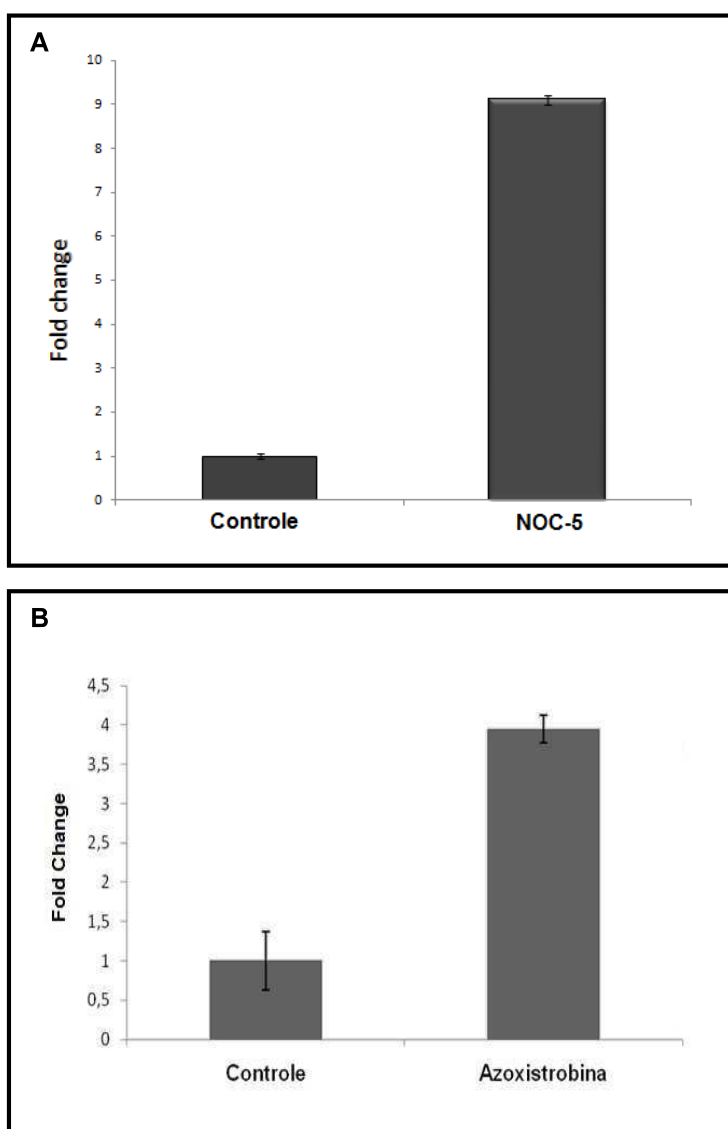
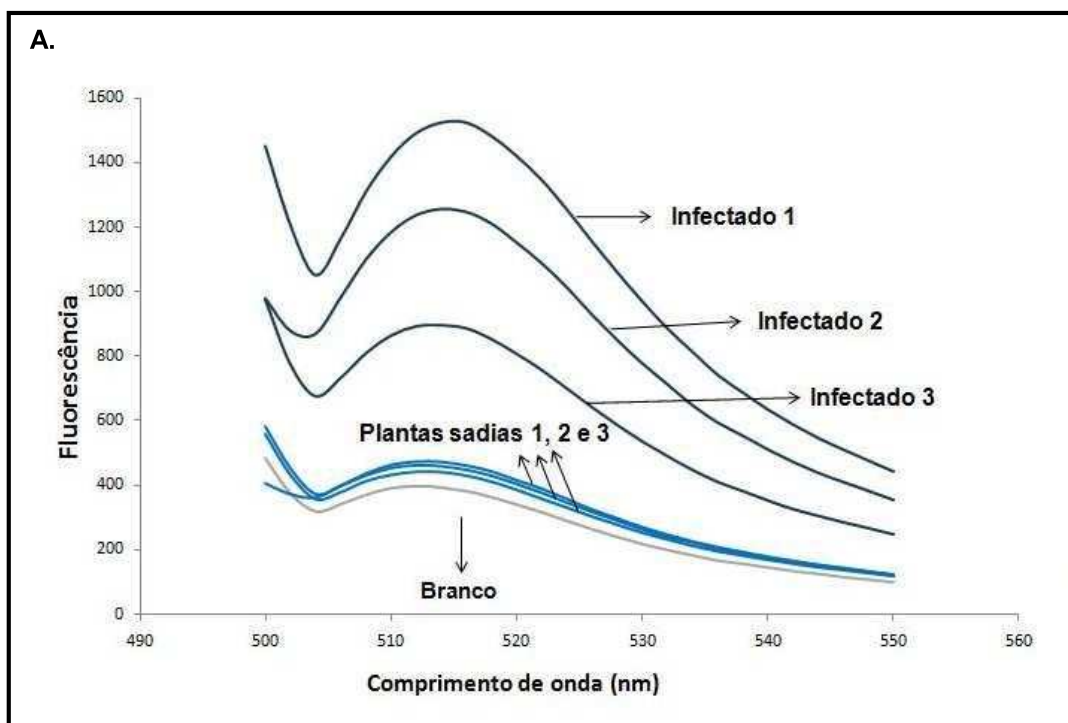


Figura 7. Expressão relativa do gene *Mp-aox* em resposta a inibidores da cadeia respiratória principal (NO e azoxistrobina), obtida através de ensaios de *Real time RT-PCR*. Verificou-se a indução do gene *Mp-aox* em resposta ao tratamento do micélio necrotrófico de *M. perniciosus* com (A) o doador de NO NOC-5 (0,4 mM) e (B) com o fungicida azoxistrobina (30 mg/L). Como controle para azoxistrobina, o micélio também foi tratado com metanol (solvente do inibidor).

Emissão de NO em plântulas infectadas por *M. perniciosus*

A emissão de NO por plântulas de cacau infectadas no estágio de vassoura verde foi comparada com a emissão do radical por plantas saudáveis da mesma idade. Nas três plantas infectadas avaliadas, a emissão de NO mostrou-se consideravelmente maior em relação ao conjunto de plantas saudáveis e, em média, a diferença entre os grupos de plântulas foi de aproximadamente 10 vezes (Figura 8A e 8B).



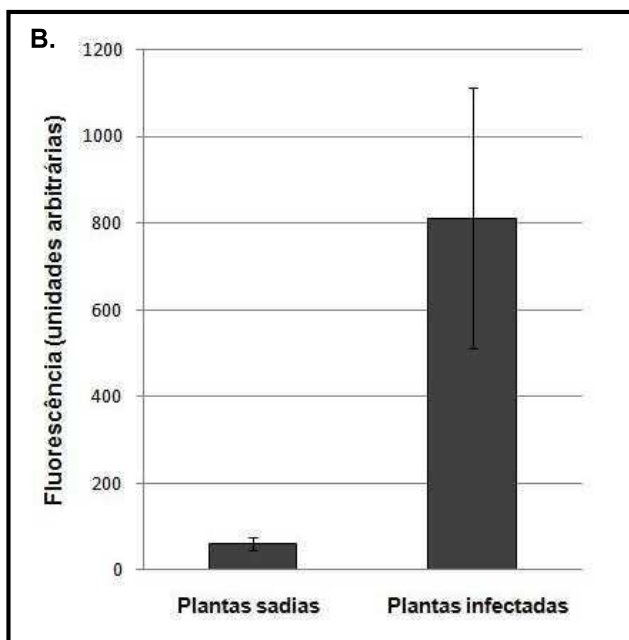


Figura 8. Análise da emissão de NO por plântulas de cacau saudáveis (controle) e infectadas usando o método fluorimétrico DAF-2. A) Espectro de fluorescência dos meristemas de três plantas saudáveis (controle) e três plantas infectadas no estágio de vassoura verde da doença. Branco: corresponde ao fluoróforo DAF-2 diluído em tampão fosfato (0.1 M, pH 7.2). (B) Média da fluorescência a 515 nm das triplicatas experimentais.

Uma vez que a fluorescência obtida pelo método fluorimétrico do DAF-2 pode ser inespecífica, o experimento foi repetido com uma amostra adicional constituída do meristema da planta infectada incubado com o *scavenger* de NO cPTIO. A redução da fluorescência a níveis próximos do controle confirmou a detecção específica do radical NO no estágio de vassoura verde da doença (Figura 9).

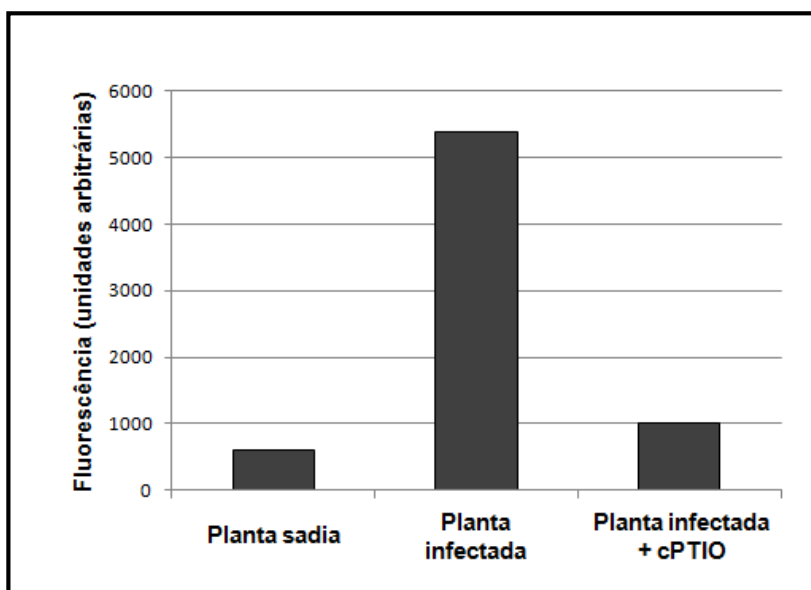


Figura 9. Emissão de NO verificada pelo método fluorimétrico DAF-2 e utilizando-se como controle o *scavenger* de NO cPTIO. A figura mostra os valores arbitrários de fluorescência a 515 nm de uma planta sadia, uma planta infectada e uma planta infectada tratada com o *scavenger* de NO cPTIO (1 mM).

A inibição conjunta da via principal e da AOX resulta na morte de ambas as fases miceliais de *M. perniciosa*

Embora a disponibilidade de ferramentas moleculares para verificar a função de genes específicos do fungo *M. perniciosa* ainda seja limitada (Caribe dos Santos et al. 2009; Lima et al. 2003), o uso de inibidores respiratórios específicos é uma alternativa interessante para a avaliação da importância das vias de transporte de elétrons durante o ciclo de vida deste fitopatógeno. Deste modo, utilizou-se a azoxistrobina e o SHAM para se verificar os efeitos da inibição das vias respiratórias principal e alternativa, respectivamente, no desenvolvimento *in vitro* dos micélios biotrófico e necrotrófico de *M. perniciosa*.

O fungicida azoxistrobina, potente inibidor do complexo III, não foi capaz de completamente inibir o desenvolvimento de ambas as fases miceliais do fungo (biotrófica e

necrotrófica) (Figura 10). Porém, uma completa inibição do crescimento micelial foi observada quando a azoxistrobina e o inibidor da AOX SHAM foram utilizados simultaneamente (Figura 10).

Curiosamente, verificou-se também que, enquanto o micélio necrotrófico foi capaz de crescer na presença de SHAM, o desenvolvimento do micélio biotrófico foi completamente inibido por esta droga (Figura 10).

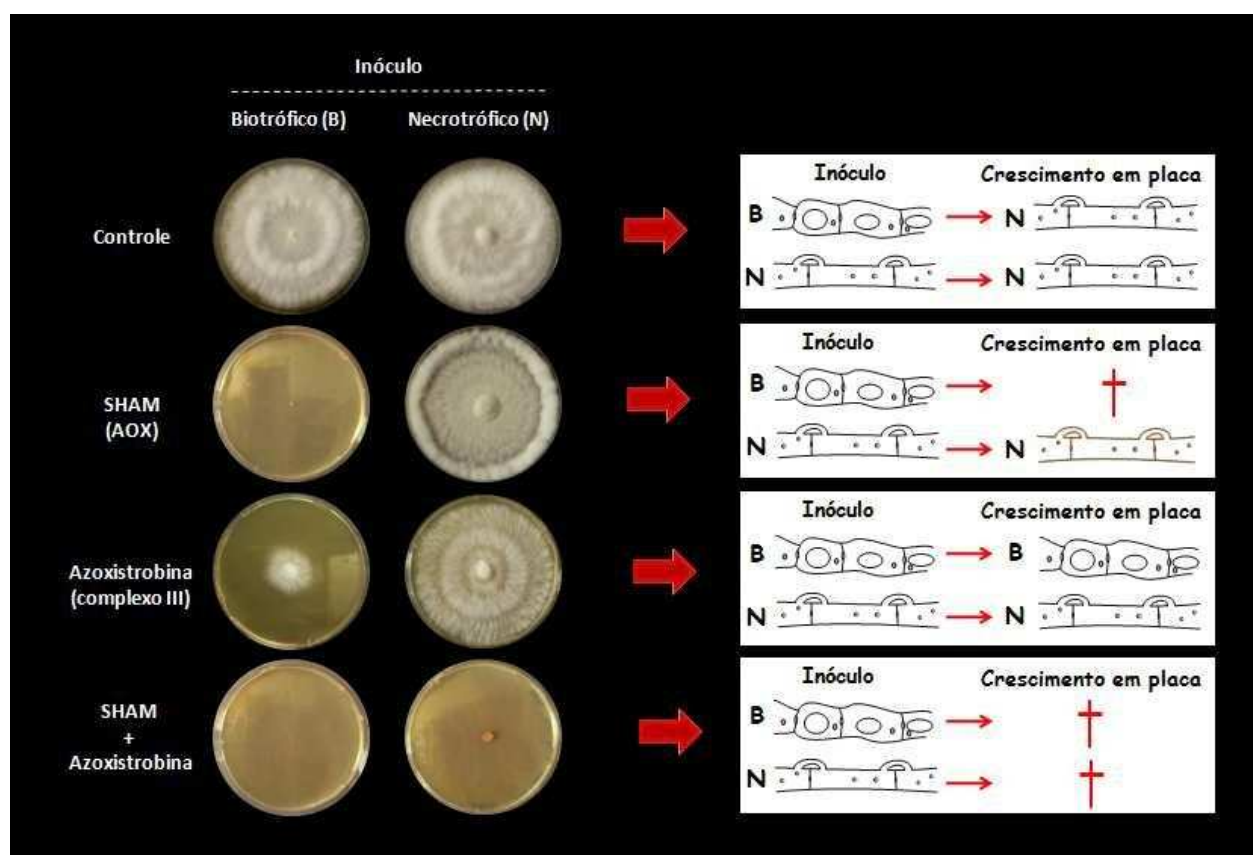


Figura 10. Crescimento *in vitro* dos micélios biotrófico (B) e necrotrófico (N) de *M. perniciosa* em meio MYEA contendo os inibidores da via principal (azoxistrobina), da AOX (SHAM) ou de ambos (SHAM + azoxistrobina). O crescimento do micélio biotrófico foi completamente inibido pelo SHAM, enquanto que apenas a aplicação combinada da azoxistrobina com o SHAM foi efetiva na inibição completa do crescimento do micélio necrotrófico. Controle – micélio crescido sem inibidores. + – morte do micélio

A inibição da cadeia respiratória principal retardou a transição da fase biotrófica para a fase necrotrófica de *M. pernicioso*.

O micélio biotrófico quando inoculado em meio MYEA (controle) rapidamente mudou para a fase necrotrófica, adquirindo um padrão de crescimento vigoroso, característico desta fase do fungo. Contudo, a inibição da cadeia respiratória principal pelo inibidor azoxistrobina retardou o processo de transição da fase biotrófica para a necrotrófica. Após aproximadamente quatro semanas, o fungo ainda permaneceu com as características do micélio biotrófico apresentando um padrão de crescimento consideravelmente lento e hifas intumecidas sem grampos de conexão (Figura 11).

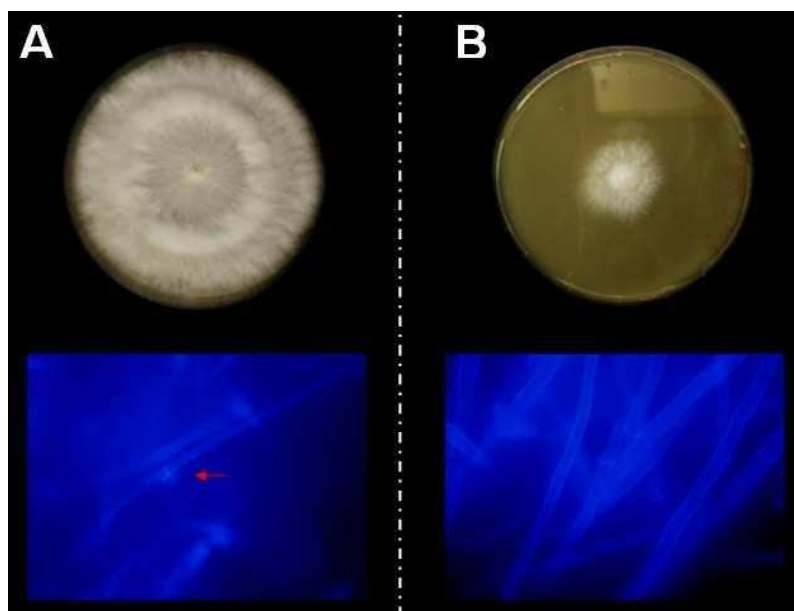


Figura 11. Manutenção da fase biotrófica de *M. pernicioso* na presença do inibidor da via principal azoxistrobina. (A) Crescimento do micélio biotrófico em meio padrão de crescimento MYEA. Em algumas horas após a inoculação, este micélio adquire seu estágio necrotrófico (seta vermelha destacando a presença de grampos de conexão). (B) Crescimento do micélio biotrófico em meio MYEA contendo o inibidor azoxistrobina. Na presença desta droga, a transição de fase foi prevenida e o micélio foi mantido em estágio biotrófico durante aproximadamente 30 dias.

A inibição conjunta da via principal e da AOX é efetiva no controle da doença

Vassoura de bruxa em plântulas de cacau

Uma vez que a combinação da azoxistrobina com o inibidor da AOX SHAM se mostrou capaz de inibir o crescimento *in vitro* de *M. perniciososa*, procurou-se verificar se estes inibidores seriam capazes de impedir a infecção de plântulas de cacauzeiro pelo patógeno. Observou-se que as plantas tratadas, tanto antes como depois, com os inibidores das vias respiratórias tiveram uma drástica redução da taxa de infecção. Nas plantas que receberam o tratamento após a infecção (ID), a taxa de infecção foi de 27%, enquanto que no controle (IC) esta taxa foi de 73%, uma diferença estatisticamente significativa (Fisher's Exact Probability Test $p=0.027$). Já nas plantas cujo tratamento foi realizado previamente à infecção (IA), a taxa de infecção caiu para 0 e nenhuma planta desenvolveu a doença (Fisher's Exact Probability Test $p=0.00005$) (Figura 12).

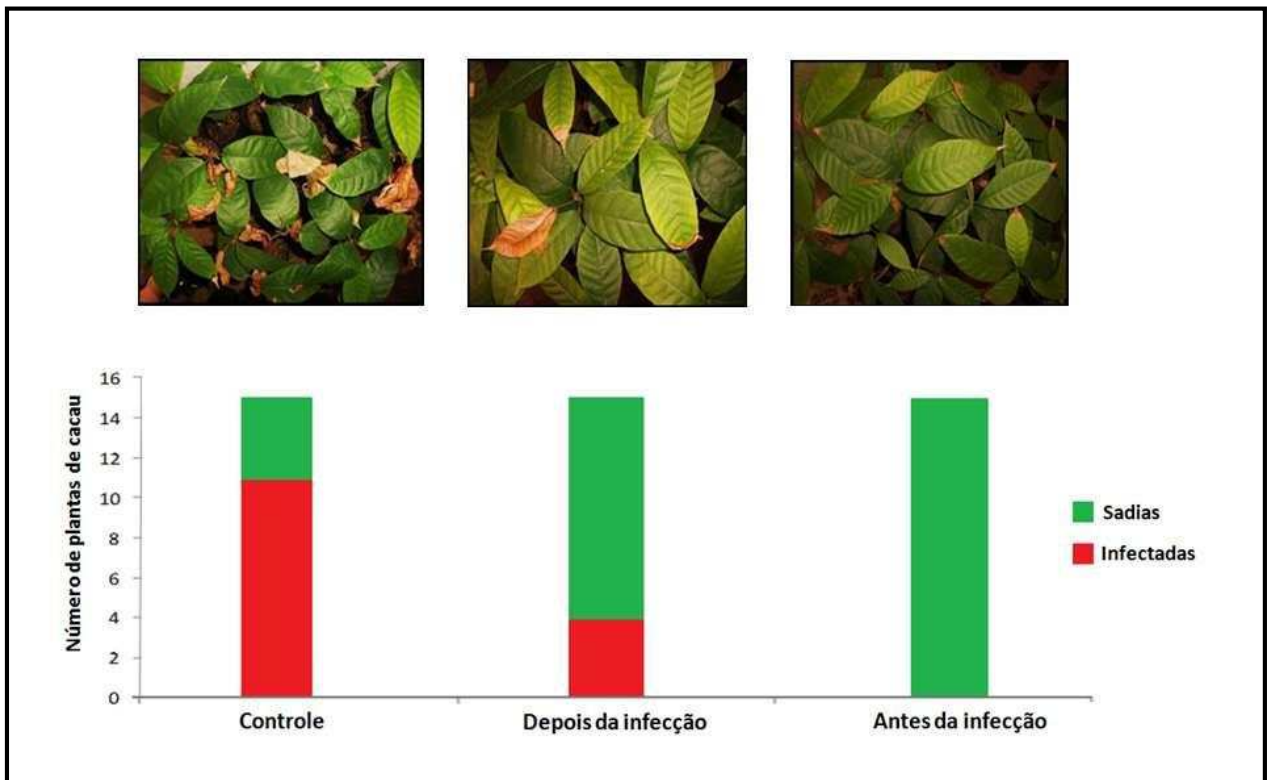


Figura 12. Efeito dos inibidores azoxistrobina (100 mg/L) e SHAM (1 g/L) sobre o estabelecimento e progressão da doença Vassoura de bruxa. Enquanto que uma grande quantidade de vassouras foi verificada nas plantas controle, as plantas tratadas com os inibidores apresentaram uma redução considerável da taxa de infecção. IC – controle; ID – plantas tratadas depois da infecção; IA – plantas tratadas antes da infecção.

DISCUSSÃO

A AOX de *M. perniciosa* possui as características tipicamente encontradas na enzima de outros fungos

Neste trabalho, o gene codificante para a enzima oxidase alternativa do fungo *M. perniciosa* (*Mp-aox*) foi identificado e caracterizado. O gene *Mp-aox* é constituído por dez exons e nove introns (Figura 1), sendo estes números bastante variáveis nos diferentes organismos já estudados. Além disso, uma única cópia deste gene foi identificada no genoma de *M. perniciosa*, assim como verificado na maioria dos outros fungos (Figura 2). De modo geral, a AOX de microorganismos é codificada por um ou poucos genes nucleares, enquanto que plantas superiores possuem uma família multi-gênica, tradicionalmente dividida em duas subfamílias, *aox1* e *aox2*.

Os 40 primeiros aminoácidos da sequência da AOX de *M. perniciosa* correspondem ao peptídeo de sinalização para a mitocôndria, o que está de acordo com o direcionamento da enzima, codificada por um gene nuclear, para a organela. A AOX é uma proteína ligadora de ferro, sendo este elemento essencial para sua atividade, pois permite à enzima realizar o transporte de elétrons utilizando a capacidade de óxido-redução deste metal (Andersson & Nordlund 1999). Andersson e Nordlund (1999) sugeriram um modelo em que as regiões mais conservadas da AOX, que compreendem o sítio ativo da enzima, estariam inseridas em um conjunto de quatro segmentos (Andersson et al. 1999) (Figura 3). Estes segmentos foram identificados em *M. perniciosa*, estando principalmente localizados na região central e C-terminal da proteína. Justamente nesses segmentos conservados estão localizados os motivos EXXH contendo os aminoácidos ácido glutâmico (E) e histidina (H), os quais são considerados os

principais aminoácidos ligantes aos átomos de ferro no centro di-férrico da enzima (Berthold, Andersson, & Nordlund 2000; Vanlerberghe et al. 1997).

Em geral, a filogenia da AOX de fungos (incluindo-se a AOX de *M. perniciosa*) concorda com a evolução das espécies, sendo as divisões entre os grupos de basidiomicetos e ascomicetos suportadas, na sua maioria, por altos valores de *bootstrap*, sugerindo um elevado grau de conservação da proteína neste grupo (Figura 4). No entanto, diferenças marcantes são encontradas entre as AOXs de fungos e plantas, as quais, na filogenia, puderam ser destacadas pela taxa de substituição relativamente alta da AOX de plantas.

A AOX é uma proteína homodimérica em plantas, sendo os monômeros covalentemente ligados por pontes dissulfeto (Umbach & Siedow 1993). A formação dessas ligações dissulfeto está relacionada à presença de um resíduo de cisteína altamente conservado localizado próximo à região N-terminal da proteína (C128 em *Arabidopsis thaliana*) (Figura 3). Este resíduo é responsável pela regulação do processo de dimerização da AOX em plantas (Vanlerberghe, McIntosh, & Yip 1998). Diferentemente, a AOX de fungos não apresenta esta cisteína regulatória, nem o domínio conservado que circunda este aminoácido na enzima de plantas, de modo que a AOX de fungos é tipicamente monomérica. Adicionalmente, outras inserções/deleções são observadas na sequência da AOX de fungos em relação à de plantas (dados não mostrados). Todas essas diferenças estruturais provavelmente respondem por diferenças de atividade e/ou regulação da enzima, podendo estar relacionadas a processos metabólicos específicos de cada grupo de organismos.

Finalmente, verificou-se que o gene *Mp-aox* codifica para uma enzima AOX funcional, cuja atividade foi confirmada através de ensaios de consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas do micélio necrotrófico de *M. pernicioso* (Figura 5).

Papel central do gene *Mp-aox* no desenvolvimento da fase biotrófica de *M. pernicioso*

O basidiomiceto *M. pernicioso* é um patógeno hemibiotrófico, cujo ciclo de vida é marcado por alterações morfológicas e metabólicas, as quais se relacionam ao desenvolvimento da doença no cacaueiro. Em seu primeiro estágio, a fase biotrófica, Rincones e colaboradores (2008) sugeriram que o patógeno sofre repressão catabólica por carbono e nitrogênio e genes ligados à fitopatogenicidade estão induzidos. Além disso, Rincones e colaboradores (2008) verificaram que genes relacionados ao processo de fosforilação oxidativa encontram-se inibidos neste estágio de desenvolvimento do fungo. Diferentemente, no micélio necrotrófico, verifica-se a expressão de genes relacionados ao metabolismo de hexoses, amônia como também ao processo de fosforilação oxidativa (Rincones et al. 2008).

No entanto, o gene codificante para a enzima oxidase alternativa não foi analisado no trabalho de Rincones e colaboradores (2008). Este gene é bastante interessante, uma vez que tem participação no metabolismo de carbono e nitrogênio e sua regulação está diretamente relacionada ao processo de fosforilação oxidativa mitocondrial. Adicionalmente, em situações de inibição da enzima citocromo c oxidase (complexo IV), a AOX constitui a única oxidase final da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Joseph-Horne et al. 2001). Deste modo, visando entender as circunstâncias nas quais a AOX pode ser importante, analisou-se o perfil de expressão do gene *Mp-aox* durante o desenvolvimento *in vitro* de *M. pernicioso*. Dentre todos os estágios de desenvolvimento do fungo, a expressão relativa do gene *Mp-aox* foi

aproximadamente seis vezes maior no micélio biotrófico, sugerindo uma importante participação da AOX neste estágio de desenvolvimento do fungo (Figura 6).

Rincones e colaboradores (2008) sugeriram que o lento crescimento micelial observado durante a fase biotrófica poderia estar associado à reduzida fosforilação oxidativa desta fase do fungo (Meinhardt et al. 2006; Rincones et al. 2008). Considerando que a AOX pode afetar consideravelmente a produção de energia da célula, o aumento da participação da enzima na fase biotrófica deve contribuir para este cenário de baixa geração de energia e lento crescimento da fase biotrófica. De acordo, um estudo prévio de Affourtit e colaboradores (1999) demonstraram que a transfecção do gene *aox* da planta *Sauromatum guttatum* na levedura *Schizosaccharomyces pombe*, que naturalmente não possui a rota alternativa, resultou em significativa redução da biomassa total e taxa de crescimento da levedura, um fenótipo bastante semelhante ao observado no estágio biotrófico de *M. perniciosus* (Affourtit et al. 1999; Meinhardt et al. 2006).

Esta elevada expressão do gene *Mp-aox* no micélio biotrófico (fase infectiva) sugere que a AOX possa ter uma função significativa durante o estágio inicial da doença Vassoura de bruxa (estágio de vassoura verde). Uma resposta de defesa à patógenos bastante conhecida tanto em animais como em plantas consiste na produção de compostos altamente tóxicos, com atividade microbicida, como o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico (NO) (Delledonne et al. 1998). O peróxido de hidrogênio é capaz de causar importantes danos nas proteínas e DNA da célula e o NO, dentre outros efeitos, é capaz de inibir de forma reversível a citocromo c oxidase da cadeia respiratória principal (complexo IV) (Millar & Day 1996). Em conjunto, estas moléculas são responsáveis pela geração de um ambiente extremamente oxidativo, capaz de matar o patógeno, prevenindo assim sua disseminação para os tecidos saudáveis da planta (Delledonne et al. 2001;

Romero-Puertas et al. 2004). No entanto, a AOX é tolerante ao NO, de modo que, na presença deste radical, a atividade desta enzima pode garantir a sobrevivência do organismo.

A comparação da produção de NO entre plantas de cacau infectadas e plantas saudáveis da mesma idade mostrou que um *burst* de NO ocorre nos estágios iniciais da doença Vassoura de bruxa (estágio de vassoura verde) (Figuras 8 e 9). Assim, a habilidade do micélio biotrófico sobreviver nos tecidos de cacau deve depender dos mecanismos que o patógeno desenvolveu para se defender das moléculas de defesa do hospedeiro. Neste sentido, a AOX pode estar atuando como um importante mecanismo de proteção de *M. perniciosa* contra os efeitos tóxicos do radical NO sobre a cadeia de transporte de elétrons principal. Dando suporte para esta idéia, verificou-se que o gene *Mp-aox* é induzido em resposta ao tratamento *in vitro* de *M. perniciosa* com o doador de NO NOC-5 (Figura 7A). Deste modo, acredita-se que, mesmo com o custo de uma reduzida produção de energia, a AOX deva permitir a sobrevivência de *M. perniciosa* na presença deste radical extremamente danoso à célula assim como o sucesso da infecção e desenvolvimento da doença. Estes resultados mostram assim um conjunto de fortes evidências que sugerem uma importante participação da AOX na ecologia do fitopatógeno *M. perniciosa*.

Esta é a primeira vez que se reporta uma possível função biológica da AOX no desenvolvimento *in planta* e ciclo de vida de um fungo fitopatogênico. A primeira tentativa de se verificar uma função da enzima em fitopatógenos foi realizada com mutantes *aox* do ascomiceto *Magnaporthe grisea* (Vila-Adame & Koller 2002). Apesar de este estudo apresentar uma participação chave da AOX na proteção de *M. grisea* contra o estresse oxidativo gerado após aplicação do fungicida azoxistrobina *in planta*, a natureza deste estresse na ecologia do fungo não foi verificada. Assim como *M. perniciosa*, *M. grisea* também possui um ciclo de vida hemibiotrófico, no entanto, sua fase biotrófica compreende apenas alguns poucos dias (3-5 dias)

(Ribot et al. 2008). Já o estágio biotrófico de *M. pernicioso* é consideravelmente longo, variando de 30 a 60 dias. Durante este período, o fungo ocupa os espaços entre as células do cacaueteiro, permanecendo, portanto em contínuo contato com os tecidos vivos do hospedeiro (Evans 1980; Meinhardt et al. 2008; Mondego et al. 2008). Deste modo, é possível que, em *M. pernicioso*, a funcionalidade da via alternativa tenha um papel crítico na sobrevivência deste fungo, de modo que a enzima pode estar atuando como um mecanismo de proteção contra o ambiente extremamente hostil estabelecido durante a infecção.

Estudos com modelos de patógenos de animais já apontaram para uma função semelhante para a AOX. Em *Histoplasma capsulatum* e *Trypanosoma brucei* propôs-se que AOX atua como uma enzima antioxidante, capaz de mitigar o estresse oxidativo e nitrosativo produzido pelos macrófagos no processo de infecção (Chaudhuri et al. 2006; Nittler et al. 2005). Um teste crítico para provar esta idéia foi realizado com a caracterização de um mutante do tipo *knockout* para o gene *aox1* do basidiomiceto patogênico *Cryptococcus neoformans* (Akhter et al. 2003). Após a disrupção deste gene, *C. neoformans* apresentou grande sensibilidade ao estresse oxidativo gerado no hospedeiro como também reduzida patogenicidade em camundongos, corroborando assim o papel central da via alternativa como um fator de patogenicidade deste fungo.

Impacto da inibição das vias de transporte de elétrons principal e alternativa no desenvolvimento de *M. pernicioso*

Para se analisar os efeitos da inibição das vias respiratórias principal e alternativa no desenvolvimento *in vitro* dos micélios biotrófico e necrotrófico de *M. pernicioso* foram utilizados inibidores de componentes específicos das vias respiratórias mitocondriais: azoxistrobina, como inibidor da via principal e o SHAM, como inibidor da AOX.

A inibição da via principal pelo fungicida azoxistrobina não foi capaz de inibir completamente o desenvolvimento de ambas as fases miceliais de *M. pernicioso* (biotrófica e necrotrófica) (Figura 10). Uma explicação plausível para a resistência verificada é dada pela atividade da enzima oxidase alternativa, capaz de realizar o transporte de elétrons, mesmo na presença desse inibidor. Dando suporte para esta hipótese, verificou-se que o gene *Mp-aox* é induzido após tratamento do micélio com o fungicida azoxistrobina (Figura 7B). Além disso, uma completa inibição do crescimento micelial foi observada quando a azoxistrobina e o inibidor da AOX SHAM foram utilizados em conjunto, confirmando assim a atuação da via alternativa como mecanismo de resistência à inibição da cadeia respiratória principal e, portanto, à toxicidade desta classe de fungicidas (Figura 10).

Além disso, enquanto o micélio necrotrófico foi capaz de crescer na presença do SHAM, o desenvolvimento do micélio biotrófico foi completamente inibido por esta droga (Figura 10). Estes resultados confirmam a hipótese de que a AOX tem uma importante função no desenvolvimento da fase biotrófica. De modo similar ao micélio biotrófico, o protozoário *T. brucei*, em seu estágio infectivo, realiza predominantemente a respiração pela via alternativa e a exposição deste patógeno a inibidores da AOX (SHAM ou ascofuranona) tem efeito tripanocida sobre o protozoário (Chaudhuri et al. 2006).

O procedimento chave para a manutenção de *M. pernicioso* na fase biotrófica consiste na germinação dos esporos seguida de cultivo do fungo em um meio com baixo conteúdo de nutrientes e contendo como única fonte de carbono o glicerol (Meinhardt et al. 2006). À diferença do micélio necrotrófico, o qual pode ser facilmente mantido em meio nutritivo, o micélio biotrófico só se prolifera no tecido vivo do hospedeiro ou em condições de cultivo bastante específicas que simulam o crescimento no hospedeiro. Surpreendentemente, a inibição da cadeia

respiratória principal pela azoxistrobina retardou consideravelmente a transição da fase biotrófica para a fase necrotrófica, de modo que o micélio biotrófico foi capaz de se desenvolver por um longo período em meio rico em nutrientes MYEA (Figura 11). Deste modo, especulou-se que a inibição da via principal e o subsequente aumento da respiração pela rota alternativa devem ser importantes fatores para a manutenção da fase biotrófica do patógeno. Um estudo prévio de Evans (Evans 1980) sugeriu a existência de uma molécula instável produzida pela planta que seria responsável pela manutenção da fase biotrófica e, na ausência desta molécula, o fungo mudaria para a fase necrotrófica. Considerando que a inibição da via principal é uma condição importante para a manutenção da fase biotrófica *in vitro*, pode-se especular que o radical NO produzido no estágio de vassoura verde poderia ser um sinal para o desenvolvimento e manutenção do micélio biotrófico *in planta*. Além disso, a inibição da via principal por este radical deve contribuir para o fenótipo de crescimento lento observado na fase biotrófica do patógeno. Seguindo esta lógica, com a morte dos tecidos infectados do hospedeiro, os efeitos inibitórios do NO na cadeia de transporte de elétrons do fungo cessariam e o aumento da razão das atividades da via principal em relação à via alternativa forneceria a energia necessária (ATP) para o crescimento intenso da fase necrotrófica do patógeno.

Para a maioria dos fitopatógenos (*Mycosphaerella graminicola*, *Botrytis cinerea* e *M. grisea*), a AOX vem sendo principalmente apontada como um mecanismo de resistência ao estresse oxidativo gerado pela exposição aos fungicidas a base de estrobilurinas (Gong et al. 2009; Ishii et al. 2009; Míguez et al. 2004; Yukioka et al. 1998). No entanto, as condições ambientais durante o desenvolvimento destes fitopatógenos, nas quais a AOX tem uma participação importante, são ainda desconhecidas. Deste modo, este trabalho apresenta, pela primeira vez, fortes evidências que apontam para esta enzima como uma proteína chave no ciclo

de vida hemibiotrófico de um fungo fitopatogênico. Se esta enzima também tem uma participação chave no desenvolvimento de outros fitopatógenos, particularmente fungos hemibiotróficos, ainda será assunto para estudos futuros. Além disso, os resultados promissores dos testes de inibição *in vitro* complementados pelos experimentos realizados em plântulas de cacau (Figura 12) como também pelas diferenças existentes entre as AOXs de fungos e plantas mostram claramente que esta enzima é um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fungicidas capazes de inibir seletivamente o desenvolvimento de *M. perniciosa* e, conseqüentemente, de controlar eficientemente a Vassoura de bruxa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Affourtit C. et al. (1999) Functional expression of the plant alternative oxidase affects growth of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol.Chem.* **274**, 6212-6218.
2. Affourtit C., Heaney S.P., & Moore A.L. (2000) Mitochondrial electron transfer in the wheat pathogenic fungus *Septoria tritici*: on the role of alternative respiratory enzymes in fungicide resistance. *Biochim.Biophys.Acta* **1459**, 291-298.
3. Akhter S. et al. (2003) Role of alternative oxidase gene in pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect.Immun.* **71**, 5794-5802.
4. Andersson M.E. & Nordlund P. (1999) A revised model of the active site of alternative oxidase. *FEBS Lett.* **449**, 17-22.
5. Bartlett D.W. et al. (2002) The strobilurin fungicides. *Pest.Manag.Sci.* **58**, 649-662.
6. Berthold D.A., Andersson M.E., & Nordlund P. (2000) New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim.Biophys.Acta* **1460**, 241-254.
7. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
8. Caribe dos Santos A.C. et al. (2009) dsRNA-induced gene silencing in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. *Fungal.Genet.Biol.* **46**, 825-836.
9. Chaudhuri M., Ott R.D., & Hill G.C. (2006) Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol.* **22**, 484-491.
10. Delledonne M. et al. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
11. Delledonne M. et al. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 13454-13459.
12. Elthon T.E. & McIntosh L. (1987) Identification of the alternative terminal oxidase of higher plant mitochondria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 8399-8403.
13. Evans H.C. (1980) Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' broom disease of cocoa. *Trans.Br.Mycol.Soc.* **74**, 515-526.
14. Feinberg A.P. & Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* **132**, 6-13.
15. Fisher,R.A.S. (1958) Statistical methods for research workers / by Sir Ronald A. Fisher Hafner ; Edinburgh : Oliver and Boyd - 356 p., New York.
16. Frias G., Purdy L.H., & R.A.Schmidt (1995) An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *Crinipellis perniciosa*. *Plant Disease* **79**, 787-791.
17. Gong S. et al. (2009) Inhibitory effect of bionic fungicide 2-allylphenol on *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr.) *in vitro*. *Pest.Manag.Sci.* **65**, 1337-1343.

18. Gredilla R., Grief J., & Osiewacz H.D. (2006) Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Exp.Gerontol.* **41**, 439-447.
19. Griffith G.W. & Hedger J.N. (1993) A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis pernicioso* using a bran-vermiculite medium. *Europ J Plant Pathol* **99**, 227-230.
20. Griffith G.W. et al. (2003) Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zealand Journal of Botany* **41**, 423-435.
21. Henrik Nielsen et al. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**, 1-6.
22. Ishii H. et al. (2009) Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. *Pest.Manag.Sci.* **65**, 916-922.
23. Joseph-Horne T., Hollomon D.W., & Wood P.M. (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim.Biophys.Acta* **1504**, 179-195.
24. Kojima H. et al. (1998) Development of a fluorescent indicator for nitric oxide based on the fluorescein chromophore. *Chem.Pharm.Bull.(Tokyo)* **46**, 373-375.
25. Lima J.O. et al. (2003) Development of a transformation system for *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants. *Curr.Genet.* **42**, 236-240.
26. Lorin S., Dufour E., & Sainsard-Chanet A. (2006) Mitochondrial metabolism and aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Biochim.Biophys.Acta* **1757**, 604-610.
27. Maxwell D.P., Wang Y., & McIntosh L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 8271-8276.
28. McDonald A.E., Vanlerberghe G.C., & Staples J.F. (2009) Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. *J.Exp.Biol.* **212**, 2627-2634.
29. Meinhardt L.W. et al. (2006) In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Curr.Microbiol.* **52**, 191-196.
30. Meinhardt L.W. et al. (2008) *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Mol.Plant Pathol.* **9**, 577-588.
31. Miguez M. et al. (2004) Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QOI fungicides. *Pest.Manag.Sci.* **60**, 3-7.
32. Millar A.H. & Day D.A. (1996) Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* **398**, 155-158.
33. Mondego J.M. et al. (2008) A genome survey of *Moniliophthora pernicioso* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC.Genomics* **9**, 548.
34. Moore A.L., Umbach A.L., & Siedow J.N. (1995) Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: a model of the active site. *J Bioenerg.Biomembr.* **27**, 367-377.

35. Nagata N., Momose K., & Ishida Y. (1999) Inhibitory effects of catecholamines and anti-oxidants on the fluorescence reaction of 4,5-diaminofluorescein, DAF-2, a novel indicator of nitric oxide. *J Biochem.* **125**, 658-661.
36. Nakamura K. et al. (2010) Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among *Trypanosoma brucei* subspecies. *Parasitol.Int.*
37. Nittler M.P. et al. (2005) Identification of *Histoplasma capsulatum* transcripts induced in response to reactive nitrogen species. *Mol.Biol.Cell* **16**, 4792-4813.
38. Olof Emanuelsson et al. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J.Mol.Biol.* **300**, 1005-1016.
39. Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
40. Purdy L.H. & Schmidt R.A. (1996) STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: biology, epidemiology, and management. *Annu.Rev.Phytopathol.* **34**, 573-594.
41. Ribot C. et al. (2008) Susceptibility of rice to the blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *J Plant Physiol* **165**, 114-124.
42. Rincones J. et al. (2008) Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Mol.Plant Microbe Interact.* **21**, 891-908.
43. Romero-Puertas M.C. et al. (2004) Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* **6**, 795-803.
44. Sambrook, J. & Russell, D. (2001) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
45. Siedow J.N. & Umbach A.L. (2000) The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim.Biophys.Acta* **1459**, 432-439.
46. Siedow J.N., Umbach A.L., & Moore A.L. (1995) The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a binuclear iron center. *FEBS Lett.* **362**, 10-14.
47. Stenmark P. & Nordlund P. (2003) A prokaryotic alternative oxidase present in the bacterium *Novosphingobium aromaticivorans*. *FEBS Lett.* **552**, 189-192.
48. Umbach A.L. & Siedow J.N. (1993) Covalent and Noncovalent Dimers of the Cyanide-Resistant Alternative Oxidase Protein in Higher Plant Mitochondria and Their Relationship to Enzyme Activity. *Plant Physiol* **103**, 845-854.
49. Umbach A.L. & Siedow J.N. (2000) The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. *Arch.Biochem.Biophys.* **378**, 234-245.
50. Vandesompele J. et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034.
51. Vanlerberghe G.C. & McIntosh L. (1997) ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annu.Rev.Plant Physiol Plant Mol.Biol.* **48**, 703-734.

52. Vanlerberghe G.C., McIntosh L., & Yip J.Y. (1998) Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport. *Plant Cell* **10**, 1551-1560.
53. vila-Adame C. & Koller W. (2002) Disruption of the alternative oxidase gene in *Magnaporthe grisea* and its impact on host infection. *Mol.Plant Microbe Interact.* **15**, 493-500.
54. Wagner A.M. et al. (2008) Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: the role of the alternative oxidase. *Biochim.Biophys.Acta* **1777**, 993-1000.
55. Wood P.M. & Hollomon D.W. (2003) A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest.Manag.Sci.* **59**, 499-511.
56. Yukioka H. et al. (1998) Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim.Biophys.Acta* **1442**, 161-169.

CAPÍTULO II

Estudos bioquímicos e moleculares da enzima mitocondrial oxidase alternativa de *Moniliophthora roreri*, um importante patógeno do cacauero

Daniela P. T. Thomazella, Paulo José Teixeira, Bruno Vaz, Bryan Bailey, Lyndel W. Meinhardt, Gonçalo A.G. Pereira

Trabalho desenvolvido no Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) durante estágio sanduíche de seis meses

(Manuscrito em preparação)

RESUMO

Moniliophthora roreri é um fungo basidiomiceto, causador da doença *Frosty Pod Rot* (Monilíase) do cacauzeiro. Apesar da grande relevância desta doença para a cacauicultura, pouco se sabe acerca do metabolismo deste patógeno. A mitocôndria tem participação chave no suprimento de energia celular e é o alvo principal de uma importante classe de fungicidas (estrobilurinas) amplamente utilizados na agricultura. Estes compostos inibem seletivamente componentes específicos do sistema de fosforilação oxidativa de fitopatógenos. A enzima oxidase alternativa (AOX) é uma forma de resistência a essa classe de drogas, sendo capaz de realizar o transporte de elétrons mitocondrial mesmo na presença desses inibidores. Este trabalho teve como objetivo entender a possível função da AOX no metabolismo e desenvolvimento do fungo *M. roreri*. Verificou-se que o gene *aox* de *M. roreri* (*Mr-aox*) apresenta uma regulação relacionada à progressão da doença *Frosty Pod Rot*, sugerindo que a enzima tem relevância durante o desenvolvimento *in planta* do patógeno. Adicionalmente, *Mr-aox* foi induzido em resposta ao fungicida azoxistrobina (estrobilurina sintética). No entanto, apesar disso, *M. roreri* mostrou-se consideravelmente sensível ao fungicida. Uma possível explicação é que o fungo apresenta considerável susceptibilidade ao estresse oxidativo gerado pela droga. A adição conjunta da azoxistrobina com um inibidor da AOX (SHAM) foi eficiente na inibição do crescimento micelial de *M. roreri in vitro*, comprovando a participação da AOX como mecanismo de proteção do patógeno contra a toxicidade do fungicida. Por fim, acredita-se que esta enzima tenha participação no desenvolvimento de *M. roreri* e que a inibição das vias de transporte de elétrons principal e alternativa seja uma estratégia interessante para o controle da doença *Frosty Pod Rot* do cacauzeiro.

INTRODUÇÃO

Moniliophthora roreri é um patógeno hemibiotrófico, agente etiológico da doença *Frosty Pod Rot* (FPR, Monilíase) em *Theobroma cacao* (cacaueiro). Esta doença tem afetado drasticamente a produção de cacau em muitos países da América Latina e, devido à sua fácil disseminação e agressividade, constitui uma importante ameaça para a cacauicultura mundial (Evans 2007).

Projetos envolvendo o sequenciamento do genoma e transcriptoma deste fungo estão em andamento e tem permitido uma melhor compreensão da biologia do patógeno e de sua interação com o hospedeiro. Uma primeira análise comparativa do genoma mitocondrial de *M. roreri* com sua espécie irmã *Moniliophthora perniciosa* permitiu a identificação de diferenças marcantes entre estes genomas, envolvendo principalmente a presença de regiões repetitivas e plasmídeos mitocondriais (Lacerda et al. 2010).

As mitocôndrias são organelas essenciais para a célula que participam de diversos processos metabólicos, sendo sua principal função a regulação do *status* energético celular através da realização da fosforilação oxidativa (Lehninger, Nelson, & Cox 2008). Em *M. perniciosa*, a mitocôndria parece participar de importantes etapas do metabolismo e desenvolvimento deste fungo, tendo relação com o processo de senescência (Formighieri et al. 2008), resistência a fungicidas e o desenvolvimento da fase biotrófica deste patógeno (Thomazella et al. 2010).

A inspeção do banco genômico de *M. roreri* levou à identificação de um gene homólogo à enzima mitocondrial oxidase alternativa (AOX). A AOX é uma ubiquinol oxidase capaz de realizar o transporte de elétrons da ubiquinona reduzida para o oxigênio (Joseph-Horne, Hollomon, & Wood 2001). A atividade da AOX não contribui para a síntese de ATP celular, uma

vez que a enzima não bombeia prótons para o espaço intermembranas mitocondrial (Vanlerberghe, Cvetkovska, & Wang 2009). A regulação da enzima é, portanto, uma etapa importante na coordenação da produção de energia celular para atender às necessidades metabólicas do organismo. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo verificar a regulação da expressão do gene *aox* de *M. roreri* (*Mr-aox*) em resposta ao tratamento com o fungicida azoxistrobina, um potente inibidor da cadeia respiratória principal, como também ao longo do desenvolvimento da doença FPR. Além disso, a importância das vias de transporte de elétrons deste fungo foi avaliada, analisando-se os efeitos de inibidores das vias principal e alternativa sobre o desenvolvimento deste fungo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico e condições de crescimento de *M. roreri*

Utilizou-se o isolado MAC2977 de *M. roreri* coletado no estado de Los Rios no Equador que apresenta patogenicidade ao cacau. Este isolado é mantido em meio PDA contendo 39g/L de *Potato Dextrose Agar* (Difco).

Para a realização dos experimentos de expressão gênica, o micélio foi inoculado em 50 ml de meio com baixo conteúdo de carboidratos (1,7 g/L de *malt extract broth* (Difco), 5 g/L de extrato de levedura, 50 ml/L de glicerol) e as culturas foram mantidas sob agitação constante de 120 rpm durante 10 dias e a temperatura de 25°C. O tratamento com azoxistrobina (30 mg/L) foi realizado após crescimento do micélio durante 10 dias e o tempo de indução com a droga foi de 4 horas.

Os frutos em diferentes estágios de desenvolvimento da doença foram fornecidos pelo CATIE (Centro Agronômico Tropical de Investigação e Educação) na Costa Rica, que tem uma importante colaboração com o USDA (*United States Department of Agriculture*).

Caracterização básica do gene *Mr-aox*

O gene *aox* de *M. perniciosa* foi usado como referência para buscar, através de tblastx, o contig genômico correspondente ao gene *aox* de *M. roreri* (*Mr-aox*). A sequência correspondente à região codante de *Mr-aox* foi obtida através de blastn do contig genômico contra o banco de ESTs de *M. roreri*. O software *ClustalW* foi utilizado para alinhar a sequência genômica com a região codante do gene *Mr-aox* para identificação dos exons e introns. A similaridade entre as sequências de *M. perniciosa* e *M. roreri* foi acessada utilizando-se a ferramenta *blast2sequences* do NCBI.

A tradução da sequência de nucleotídeo foi realizada com o software *Translate tool* (*Expasy Proteomics Server*) e a presença do peptídeo de direcionamento para a mitocôndria na região N-terminal da sequência da AOX foi avaliada com o software *Target P* (Henrik Nielsen et al. 1997; Olof Emanuelsson et al. 2000). O alinhamento da AOX de *A. thaliana* e de um conjunto de fungos, incluindo-se *M. royeri*, também foi realizado com o software *ClustalW*.

Análise da expressão gênica por *Real time RT-PCR*

A expressão do gene *Mr-aox* foi avaliada em resposta ao tratamento do micélio do fungo com o fungicida azoxistrobina e em diferentes estágios da doença FPR (frutos em estágio inicial da doença, frutos necrosando e frutos cobertos por esporos). Os RNAs foram extraídos com o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) e tratados com DNase I (Invitrogen) de acordo com as recomendações dos respectivos fabricantes. Após a quantificação das amostras, aproximadamente 1 µg de RNA de cada condição foi utilizado para a síntese de cDNA com o kit *SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis*, conforme as instruções fornecidas pela Invitrogen.

Para a análise de cada gene por *Real time RT-PCR*, os *primers* específicos utilizados foram: A) para amplificação do gene *aox* de *M. royeri*, AOXRTF 5'-GAT CTC TCC GCG AAT CTG TC-3' e AOXRTR 5'-GCA GGA AGT CGC CAG TAG TC-3' e B) para amplificação do gene β -actina de *M. royeri*, ACTRTF 5'-AGT CAG TTT CTG TTA TTC TGG CAC T-3' e ACTRTR 5'-ATA GGG TAC TTG AGG GTG AGG ATA C-3'. A temperatura de anelamento de todos os pares utilizada nas reações de *Real time RT-PCR* foi de 50°C.

O *Real time* foi realizado com o kit *Brilliant II SYBR® Green qPCR Master Mix* (Stratagene) no aparelho *Mx3005P™ Real-Time PCR System* da Stratagene acoplado ao software

Mx3005P analysis software, em reação contendo: 12,5µl de 2x *Brilliant II SYBR Green qPCR master mix*, 2,5µl de *primer forward* a 5 µM, 2,5µl de *primer* reverso a 5µM e aproximadamente 25 ng de cDNA num volume final de 25µl. Os ciclos utilizados na reação de *Real time RT-PCR* foram: um ciclo de 95°C por 10min e 40 ciclos de [95°C por 30seg; 55°C por 60seg e 72°C por 30seg], seguidos da realização da curva de dissociação para monitorar a especificidade dos *primers* utilizados. O tratamento dos dados foi realizado de acordo com o método de Pfaffl (2001) (Pfaffl 2001).

Isolamento de mitocôndrias e ensaios de consumo de oxigênio

O protocolo utilizado foi baseado na metodologia desenvolvida por Gredilla e colaboradores (Gredilla, Grief, & Osiewacz 2006). Inicialmente, o micélio de *M. roreri* foi crescido durante sete dias em meio com baixo teor de carboidratos. Macerou-se aproximadamente 40 g de micélio (peso úmido) em 200 ml de tampão de extração contendo Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, BSA 0,1 %, DTT 2mM, PMSF 0,3 mM e Sacarose 400 mM, pH 7,5. A maceração foi realizada com um liquidificador de laboratório (Waring®), utilizando-se dois pulsos de 15 segundos com intervalos de 1 minuto entre eles. O homogenato obtido foi então filtrado e o pH ajustado para 7,1. Duas centrifugações sequenciais foram realizadas a 1000xg por 10 minutos e posteriormente a 19000xg por 20 minutos. O pellet obtido contendo as mitocôndrias foi lavado duas vezes em tampão de lavagem (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM e Sacarose 400 mM, pH 7,2) e ressuspendido em 250 µl do mesmo tampão. A concentração de proteínas foi avaliada pelo método de Bradford, utilizando-se BSA como padrão (1976).

O consumo de oxigênio mitocondrial foi avaliado a 27°C utilizando-se um eletrodo de oxigênio do tipo Clark conectado a um oxígrafo (Hansatech). Aliquotas da suspensão mitocondrial (0,8 mg de proteína/mL) foram adicionadas a câmara de reação contendo 1 ml do tampão de respiração (Sacarose 330 mM; KH_2PO_4 10 mM; MgCl_2 5 mM; EGTA 1 mM; KCl 10 mM e BSA 0,1 %; pH 7,2). A presença de atividade da AOX foi avaliada utilizando-se um coquetel respiratório contendo NADH 1 mM, GMP 1 mM e ADP 300 mM. A antimicina-A 5 μM foi utilizada como inibidor do complexo III e o *n*-propil galato 100 μM como inibidor da AOX.

Testes de crescimento com inibidores das vias de transporte de elétrons (principal e alternativa)

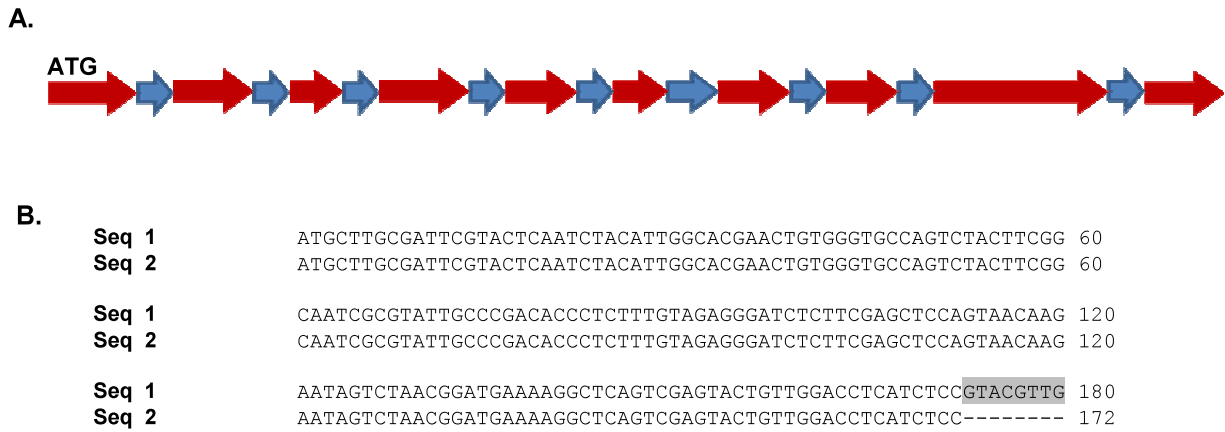
Os efeitos dos inibidores das vias principal (azoxistrobina) e alternativa (SHAM) foram avaliados sobre o crescimento de *M. roreri* e comparados aos efeitos destas drogas sobre o padrão de crescimento do micélio necrotrófico de *M. perniciososa*. O meio de crescimento utilizado continha 1,7 g/L de *malt extract broth* (Difco), 5 g/L de extrato de levedura, 50 ml/L de glicerol e 20 g/L de ágar. Os inibidores SHAM (0,75 g/L) e/ou azoxistrobina (1 mg/L) foram adicionados ao meio e, posteriormente, os fungos foram inoculados. Os efeitos dos inibidores sobre o desenvolvimento dos fungos foi observado semanalmente e registrado por fotografias, utilizando-se a câmera digital Cybershot W290 (Sony).

RESULTADOS

O gene *aox* de *M. roreri* (*Mr-aox*) possui alta similaridade com seu homólogo em *M. perniciosa*

A sequência do gene *Mr-aox* foi obtida através da análise do banco genômico de *M. roreri*, utilizando-se o gene *aox* de *M. perniciosa* (*Mp-aox*) como referência. O *contig* correspondente ao gene *Mr-aox* foi identificado com *e-value* 0.0 e identidade de 90% com *Mp-aox*. O tamanho do gene *Mr-aox* foi determinado como sendo de 1613 nucleotídeos, o que corresponde a um tamanho três bases menor que o gene de *M. perniciosa* (Thomazella et al., manuscrito em preparação). Além disso, a análise do genoma de *M. roreri* mostrou que o gene *Mr-aox* está presente em cópia única no genoma do patógeno.

A sequência de 1137 pb correspondente à região codante deste gene foi identificada através da comparação da sequência genômica de *Mr-aox* com o banco de ESTs de *M. roreri*. O alinhamento entre as sequências genômica e codante mostrou que este gene, assim como em *M. perniciosa*, é constituído por dez exons e nove introns, apresentando estes últimos um tamanho médio de 50 nucleotídeos (Figura 1).



Seq 1 GTTTCCTCTTGTTCCAATGATTTCTGGATGTTAATCTTCAAACCTCAATAGAGCAACGAC 240
Seq 2 -----AGCAACGAC 181

Seq 1 CTACAACATTGACAAGCGCCGAGACCCGCCACCAACATGGAGATGCCGTGGTTACCGGAG 300
Seq 2 CTACAACATTGACAAGCGCCGAGACCCGCCACCAACATGGAGATGCCGTGGTTACCGGAG 241

Seq 1 ACTGGGTATTATTTACCCCTGTTTACTCTCCAGGGGAATTGAAGGCCGTAGAAGTGAGAG 360
Seq 2 ACTGGGTATTATTTACCCCTGTTTACTCTCCAGGGGAATTGAAGGCCGTAGAA----- 296

Seq 1 TGACATAGTACACCTTCCGTCATCGTACTAATGGCTTCATCATAGGTTCTACATCGTGAA 420
Seq 2 -----GTTCTACATCGTGAA 309

Seq 1 GCGACCTGCTTTTCAGATAGATTTGCGGCTGGGCTCGTAAAGCTCTGCAGGTTTCGTTCTT 480
Seq 2 GCGACCTGCTTTTCAGATAGATTTGCGGCTGGGCTCGTAAAGCTCTGCAG----- 361

Seq 1 CCTTGCTATGCGGCATGGAAATATAACATCTCGAATTTAGGTGGGGTTATGACTTTGTAA 540
Seq 2 -----GTGGGGTTATGACTTTGTAA 379

Seq 1 CAGGCTACAAGCACAAAACCATTCCTCCTGGAAAGAACATGACCCTCGCCGAACCTTCGTA 600
Seq 2 CAGGCTACAAGCACAAAACCATTCCTCCTGGAAAGAACATGACCCTCGCCGAACCTTCGTA 439

Seq 1 AAGAGGGTTACCTTCTGGACGATAAGGCTTGGCTTAGCGTCAGTCATGTAGCGTTCTATC 660
Seq 2 AAGAGGGTTACCTTCTGGACGATAAGGCTTGGCTTAGC----- 477

Seq 1 TTTGTTCCAACCTCTCACGCATATACAGCGGATCCTGTTCTCCTCGAGTCCATAGCGGGTGTT 720
Seq 2 -----CGGATCCTGTTCTCCTCGAGTCCATAGCGGGTGTT 510

Seq 1 CCGGGAATGGTGGCGGCGACAATGCGGCACCTGACAAGTTTAAGGCTGATGSTATGCCAT 780
Seq 2 CCGGGAATGGTGGCGGCGACAATGCGGCACCTGACAAGTTTAAGGCTGATG----- 561

Seq 1 TGTCAACCGGTAATACTTGCATTTTAACTTGTTTCCTTAGCGCCGTGATAACGGATGGATT 840
Seq 2 -----CGCCGTGATAACGGATGGATT 582

Seq 1 CACACCTGCCTAGAAGAAGCAGAAAACGAGAGGATGCATCTCATGTGAGTGATAATATAG 900
Seq 2 CACACCTGCCTAGAAGAAGCAGAAAACGAGAGGATGCATCTCATG----- 627

Seq 1 TCCTTCGGATGTCAAAGTCAGGTGCGTAAGGCCATGGTGCAATAGGACCTTCATGACGCT 960
Seq 2 -----GACCTTCATGACGCT 641

Seq 1 TCGAAAACCATCTATATTCTTCCGTGCTATGATATTAGGCGCACAGGGTGCTTTTACAA 1020
Seq 2 TCGAAAACCATCTATATTCTTCCGTGCTATGATATTAGGCGCACAGGGTGCTTTTACAA 701

Seq 1 CCTGTTCTGTGAGTCCTTTATAGCATTGCGGGTGGCTGATGCTGACTTGTTTACTTAGT 1080
Seq 2 CCTGTTCT-----T 710

Seq 1 CCTATCGTACATGATCTCTCCGGAATCTGTCATCGCTTCGTGCGGCATCTCGAGGAAGA 1140
Seq 2 CCTATCGTACATGATCTCTCCGGAATCTGTCATCGCTTCGTGCGGCATCTCGAGGAAGA 770

Seq 1 GGCCGTAGTAACCTAGTAAGGACTCTTATTCTTAAAGTCGATGACAACCACTAATCTTCT 1200
Seq 2 GGCCGTAGTAACCTA----- 785

Seq 1 GTCTCCAGTACGAGATGTATCAAAGACATCGAAGCTGGATATGTGCCTGAATGGTCCGAC 1260
Seq 2 -----TACGAGATGTATCAAAGACATCGAAGCTGGATATGTGCCTGAATGGTCCGAC 837

Seq 1 ATGCCAGCACCAAGATCGCCATAGACTACTGGCGACTTCCTGCGGACGCTAAGCTGCTG 1320
Seq 2 ATGCCAGCACCAAGATCGCCATAGACTACTGGCGACTTCCTGCGGACGCTAAGCTGCTG 897

Seq 1 GACGTCATCTATGCGGTGCGGTCCGATGAGACGACACATCGATTTGTCAACCATAGTCTA 1380
Seq 2 GACGTCATCTATGCGGTGCGGTCCGATGAGACGACACATCGATTTGTCAACCATAGTCTA 957

Seq 1 GCGAACTTGAATGGCGATGCGGACGTGAACCCGTTTGCTTTAATGGAACCCGACATGCAC 1440
Seq 2 GCGAACTTGAATGGCGATGCGGACGTGAACCCGTTTGCTTTAATGGAACCCGACATGCAC 1017

Seq 1 ACGAAAGGGAAGAAGATTGCGTAGGTCCTTTTGTGCTTTAGGAGGTAACGAGTTGCTGA 1500

```

Seq 2      ACGAAAGGGAAGAAGATTGC----- 1039
Seq 1      CATGCATGCCTAGGTTTCGAACGCTCAGAAGCAGAGCAGTACCTCAAGGAGACTCACAAGG 1560
Seq 2      -----GTTTCGAACGCTCAGAAGCAGAGCAGTACCTCAAGGAGACTCACAAGG 1084

Seq 1      TTCTTCGAGAACAACACGAGGGCGCATGCAGGTCCGAATGCAGGACGCTCATGA 1613
Seq 2      TTCTTCGAGAACAACACGAGGGCGCATGCAGGTCCGAATGCAGGACGCTCATGA 1137

```

Figura 1. Esquema representativo do gene *aox* de *M. roreri*. (A) Ilustração mostrando a organização da sequência genômica de *Mr-aox*, destacando-se em vermelho os exons e em azul os introns. (B) Alinhamento entre a sequência genômica (Seq 1) e região codante (Seq 2) do gene *Mr-aox*. Assim como em *M. pernicioso*, os exons são separados por introns (em destaque) de aproximadamente 50 pb.

Além da grande similaridade em sequência de nucleotídeos, a sequência de aminoácidos da AOX de *M. roreri* também mostrou-se bastante conservada entre os dois fungos. Assim como a proteína de *M. pernicioso*, a AOX de *M. roreri* é constituída por um total de 378 aminoácidos, sendo os primeiros 40 resíduos responsáveis pelo direcionamento da enzima para a mitocôndria. Além disso, os quatro segmentos conservados relacionados ao sítio ativo da enzima, já identificados em outros organismos, foram também identificados em *M. roreri* (Figura 2).

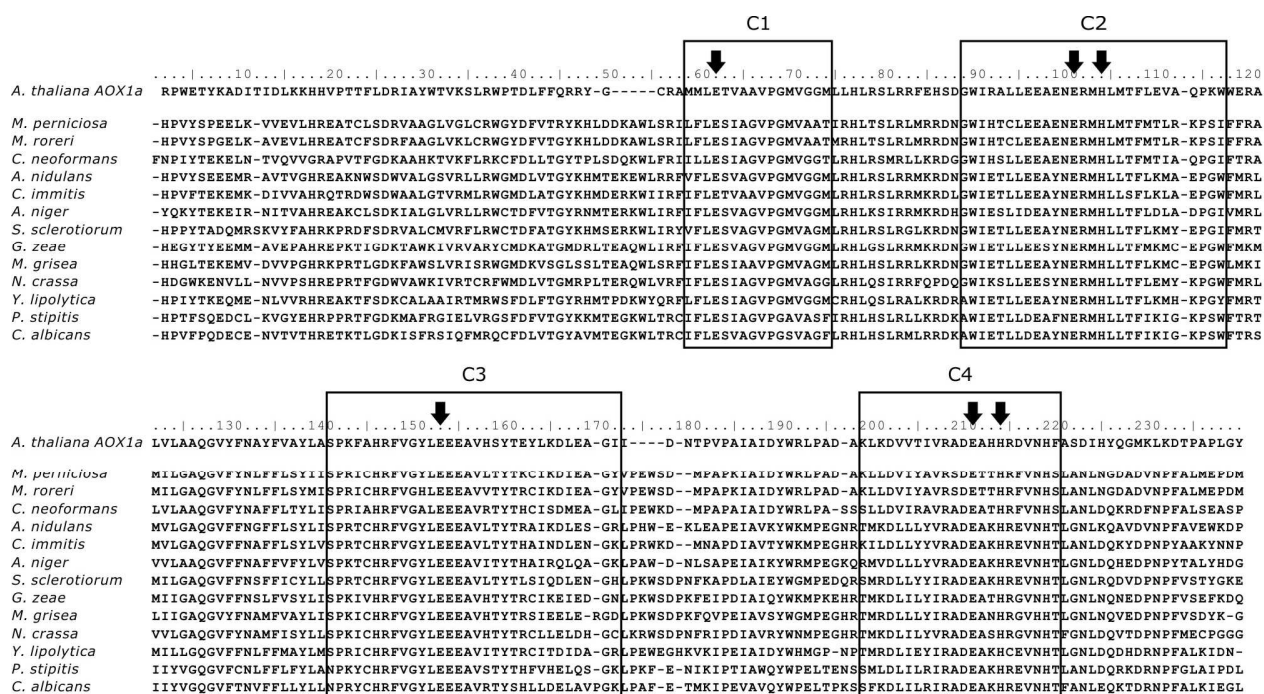


Figura 2. Alinhamento de aproximadamente 240 resíduos de aminoácidos da AOX de *Arabidopsis thaliana* e fungos (basidiomicetos e ascomicetos). C1, C2, C3 e C4 correspondem aos domínios conservados da proteína, onde são encontrados os aminoácidos histidina (H) e ácido glutâmico (E), relacionados à ligação ao átomo de ferro do sítio ativo.

Detecção de atividade da AOX em mitocôndrias isoladas de *M. roreri*

O padrão de consumo de oxigênio de mitocôndrias purificadas de *M. roreri* foi analisado.

Para estimular o consumo de oxigênio mitocondrial, utilizou-se um coquetel contendo NADH, ADP e GMP. A presença de atividade da AOX foi verificada na presença do inibidor da cadeia respiratória principal antimicina-A, após inibição do consumo residual pelo inibidor específico da AOX *n*-propil galato (Figura 3).

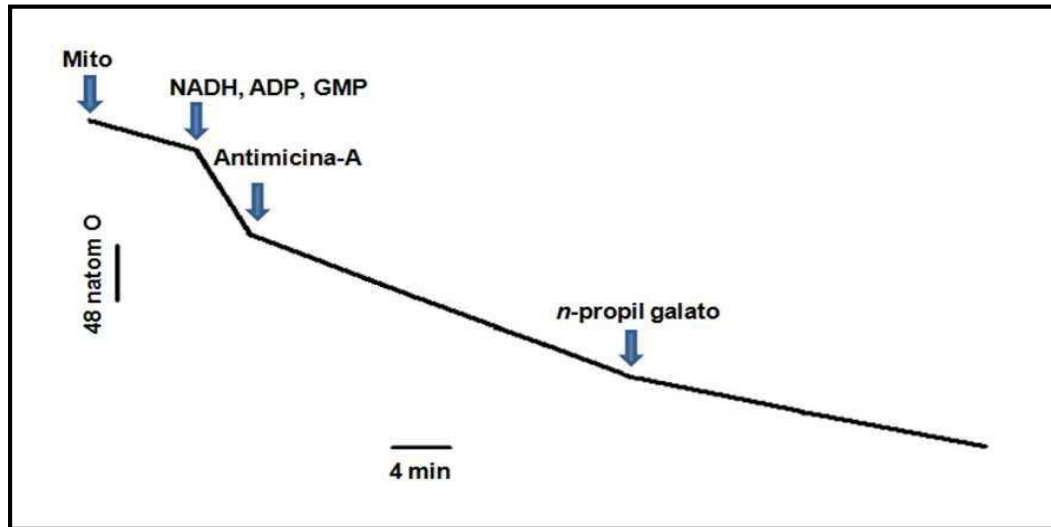


Figura 3. Detecção da atividade da enzima oxidase alternativa em mitocôndrias isoladas de *M. royeri*. A atividade da AOX foi verificada na presença de antimicina-A, inibindo-se o consumo residual de oxigênio com o composto *n*-propil galato.

A expressão do gene *Mr-aox* é regulada de acordo com os estágios de desenvolvimento da doença FPR e pelo fungicida azoxistrobina

A regulação transcricional do gene *Mr-aox* foi verificada em três pontos distintos da doença *Frosty Pod Rot*: frutos infectados sem sintomas (estágio inicial da infecção), frutos em processo de necrose (com grandes manchas necróticas nas cascas) e frutos parcialmente cobertos por esporos de *M. royeri*. Dentre as três condições analisadas, o maior valor de expressão de *Mr-aox* foi verificado nos frutos necrosando e o menor valor nos frutos em que o fungo estava em processo de esporulação (Figura 4).

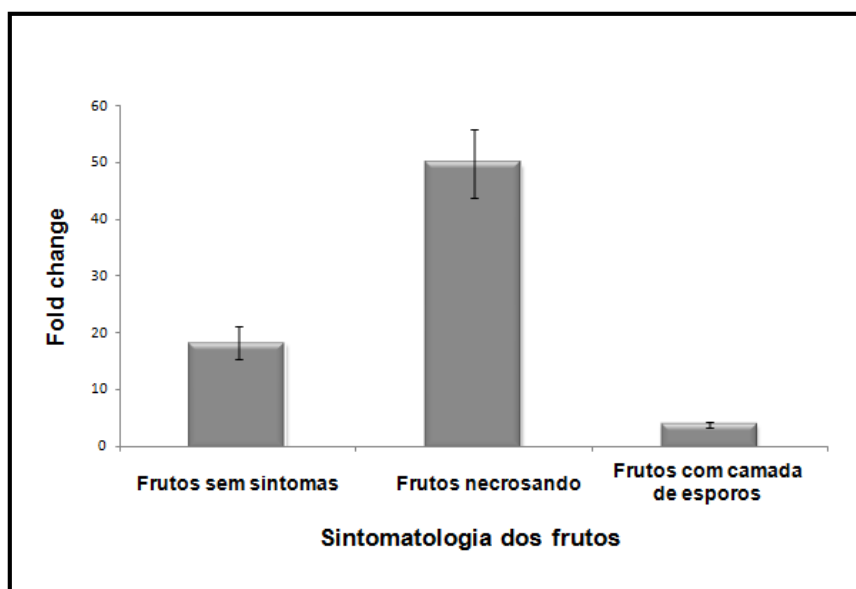


Figura 4. Expressão relativa do gene *Mr-aox* *in planta* em três pontos distintos de desenvolvimento da doença FPR. Uma evidente indução deste gene (aproximadamente 50 vezes) é observada em frutos necrosando.

Assim como em *M. perniciosa*, a inibição da cadeia respiratória principal pelo fungicida azoxistrobina induziu aproximadamente cinco vezes a expressão do gene *Mr-aox* (Figura 5).

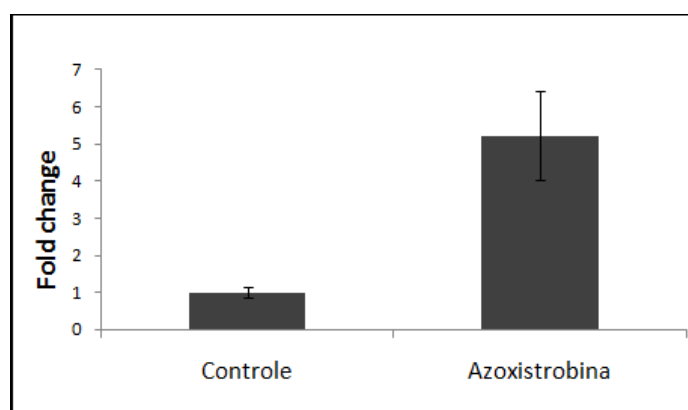


Figura 5. Expressão relativa do gene *aox* de *M. royeri* após tratamento com 30 mg/L de azoxistrobina durante 4 horas. Assim como em *M. perniciosa*, a inibição da via principal levou à indução do gene *Mr-aox*.

Azoxistrobina inibe consideravelmente o crescimento de *M. royeri* *in vitro* e é potencializada pelo inibidor da AOX SHAM

Os efeitos *in vitro* da azoxistrobina e do SHAM sobre o crescimento de *M. royeri* foram verificados e comparados com os efeitos destas drogas sobre o micélio necrotrófico de *M. perniciosus*. A figura 6 mostra o padrão de crescimento dos micélios em resposta aos inibidores. Curiosamente, em *M. royeri*, uma considerável inibição do crescimento deste fungo foi verificada na presença do inibidor azoxistrobina. Como já observado em *M. perniciosus*, a combinação da azoxistrobina e do SHAM inibiu completamente o crescimento de ambos os patógenos.



Figura 6. Padrão de crescimento do micélio necrotrófico de *M. perniciosus* e do micélio de *M. royeri* em resposta aos inibidores azoxistrobina (1 mg/L) e SHAM (0,75 g/L). *M. royeri* mostrou-se bastante sensível à azoxistrobina. A adição conjunta do inibidor da AOX SHAM, assim como em *M. perniciosus*, inibiu completamente o crescimento deste fungo.

DISCUSSÃO

Com este trabalho, o gene codificante para a enzima oxidase alternativa do fungo *M. roreri* (*Mr-aox*) foi caracterizado. Este gene é constituído por dez exons e nove introns e está presente em uma única cópia no genoma de *M. roreri* (Figura 1). Uma alta similaridade da sequência de nucleotídeos deste gene com o gene *aox* de *M. perniciososa* foi verificada, basicamente como consequência da proximidade filogenética destes fungos.

Os segmentos conservados relacionados ao sítio ativo da AOX também foram identificados na sequência da enzima de *M. roreri*, a qual é bastante similar à sequência da AOX de fungos em geral (Figura 2). Assim como em *M. perniciososa*, os 40 primeiros aminoácidos da proteína correspondem ao peptídeo de sinalização para a mitocôndria. Ensaio de consumo de oxigênio mostraram que o gene *Mr-aox* codifica para uma enzima AOX funcional, cuja atividade foi confirmada utilizando-se mitocôndrias isoladas do micélio de *M. roreri* (Figura 3).

Apesar de estar amplamente distribuída em fungos, ainda não se sabe a função precisa da AOX neste grupo de organismos (Osiewacz 2002; Popov V.N. et al. 1997; Sieger et al. 2005; Vanlerberghe & McIntosh 1997). A função mais aceita para a enzima é sua proteção perante condições de estresse oxidativo, gerado principalmente pela inibição da cadeia respiratória principal e associado ao consequente aumento da produção de EROs na mitocôndria (Rasmusson, Fernie, & van Dongen 2009; Vanlerberghe et al. 2009). Além disso, a AOX também permite que a produção de energia não seja totalmente bloqueada perante a inibição da via principal, uma vez que o complexo I pode permanecer ativo e contribuir para a síntese de ATP (Berthold, Andersson, & Nordlund 2000; Maxwell, Wang, & McIntosh 1999; Vanlerberghe et al. 2009).

Deste modo, nestas condições, a AOX atua como um mecanismo chave de proteção dos organismos (Popov V.N. et al. 1997).

Assim como verificado em *M. perniciosa*, o gene *aox* de *M. roreri* é regulado de acordo com os estágios de desenvolvimento da doença no cacaueiro. Portanto, a AOX pode ser importante na adaptação deste fungo às condições ambientais adversas que provavelmente estão presentes durante a infecção. A expressão de *Mr-aox* foi consideravelmente elevada (aproximadamente 50 vezes) nos frutos em processo de necrose, sugerindo a existência de um ambiente extremamente oxidativo nesta fase da doença. Além disso, durante o processo de esporulação do fungo, *Mr-aox* apresentou um valor de expressão consideravelmente baixo em relação às demais condições, possivelmente como consequência da alta demanda energética deste processo e ausência de estresse oxidativo nesta etapa da doença (Figura 4).

Nos últimos anos, a importância da AOX na resistência aos fungicidas a base de inibidores da cadeia respiratória principal (estrobilurinas) levantou grande interesse da comunidade científica e sua caracterização em fungos fitopatogênicos começou a ser amplamente realizada (Joseph-Horne et al. 2001). A análise de expressão gênica mostrou que o gene *aox* de *M. roreri* responde à inibição do complexo III pelo fungicida azoxistrobina, confirmando sua regulação em resposta à inibição da cadeia respiratória principal e sugerindo uma participação da enzima como mecanismo de resistência a esta classe de drogas em *M. roreri* (Figura 5). De maneira similar, Yukioka e colaboradores (1998) verificaram uma indução acentuada do gene *aox* de *Manaporthe grisea* após tratamento com o fungicida SSF-126, o qual também age inibindo o complexo III da via principal (Yukioka et al. 1998). Nestas situações, a AOX atua minimizando a toxicidade dessas drogas através da redução dos níveis de ubiquinona reduzida

gerados como consequência da inibição da via principal, permitindo assim a manutenção da integridade celular (Rasmusson et al. 2009).

Apesar da indução de *Mr-aox* no micélio tratado com o fungicida, observou-se que *M. roreri* apresentou grande sensibilidade à azoxistrobina (Figura 6). Deste modo, é possível que a ativação da AOX em *M. roreri* não seja suficiente para contornar os efeitos tóxicos da inibição da cadeia respiratória principal pela azoxistrobina. Estes resultados também sugeririam uma menor capacidade de *M. roreri* lidar com situações de estresse oxidativo, considerando-se mecanismos além da AOX. Finalmente, como já verificado para *M. perniciososa*, a adição conjunta do fungicida com o inibidor da AOX SHAM inibiu completamente o desenvolvimento de *M. roreri* (Figura 6). Acredita-se assim que o desenvolvimento de uma composição fungicida que combine os efeitos de um inibidor da via principal com um inibidor da via alternativa seja uma solução para controlar este importante patógeno que afeta o cacaueiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berthold D.A., Andersson M.E., & Nordlund P. (2000) New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim.Biophys.Acta* **1460**, 241-254.
2. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
3. Evans H.C. (2007) Cacao diseases-the trilogy revisited. *Phytopathology* **97**, 1640-1643.
4. Formighieri E.F. et al. (2008) The mitochondrial genome of the phytopathogenic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* is 109 kb in size and contains a stable integrated plasmid. *Mycol.Res.* **112**, 1136-1152.
5. Gredilla R., Grief J., & Osiewacz H.D. (2006) Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Exp.Gerontol.* **41**, 439-447.
6. Henrik Nielsen et al. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**, 1-6.
7. Joseph-Horne T., Hollomon D.W., & Wood P.M. (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim.Biophys.Acta* **1504**, 179-195.
8. Lacerda G.C. et al. (2010) The mitochondrial genome of the frosty pod rot pathogen of cacao *Moniliophthora roreri* harbors three linear invertron-like plasmids. *manuscrito em preparação*.
9. Lehninger,A., Nelson,D.L., & Cox,M.M. (2008) Lehninger Principles of Biochemistry. Fifth edition - Ed. W.H.Freeman 1119p.
10. Maxwell D.P., Wang Y., & McIntosh L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 8271-8276.
11. Olof Emanuelsson et al. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J.Mol.Biol.* **300**, 1005-1016.
12. Osiewacz H.D. (2002) Mitochondrial functions and aging. *Gene* **286**, 65-71.
13. Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
14. Popov V.N. et al. (1997) Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS Letter* **415**, 87-90.
15. Rasmusson A.G., Fernie A.R., & van Dongen J.T. (2009) Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiol Plant* **137**, 371-382.
16. Sieger S.M. et al. (2005) The role of alternative oxidase in modulating carbon use efficiency and growth during macronutrient stress in tobacco cells. *J Exp.Bot.* **56**, 1499-1515.
17. Thomazella D.P.T. et al. (2010) The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* greatly depends on the mitochondrial alternative respiration for the biotrophic phase development. *manuscrito em preparação*.

18. Vanlerberghe G.C., Cvetkovska M., & Wang J. (2009) Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase? *Physiol Plant* **137**, 392-406.
19. Vanlerberghe G.C. & McIntosh L. (1997) ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annu.Rev.Plant Physiol Plant Mol.Biol.* **48**, 703-734.
20. Yukioka H. et al. (1998) Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim.Biophys.Acta* **1442**, 161-169.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Fortes evidências foram identificadas apontando para uma participação central da AOX no desenvolvimento da fase biotrófica como também no processo de transição de fase do fitopatógeno *M. pernicioso*.
2. A AOX provavelmente tem participação no desenvolvimento do fungo *M. roreri*, particularmente no estágio em que o patógeno coloniza o fruto em processo de necrose e supostamente sob intenso estresse oxidativo.
3. Uma importante participação da AOX como mecanismo de resistência aos fungicidas a base de estrobilurinas foi verificada, tanto em *M. pernicioso* como em *M. roreri*.
4. Os resultados apontam para a AOX como um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos fungicidas capazes de inibir seletivamente o desenvolvimento dos fungos *M. pernicioso* e *M. roreri* e, conseqüentemente, controlar eficientemente as importantes doenças fúngicas do cacaueiro: Vassoura de bruxa e *Frosty Pod Rot*.

PERSPECTIVAS

Este trabalho permitiu a identificação de um alvo em potencial para controle das doenças Vassoura de bruxa e *Frosty Pod Rot* do cacaueteiro. Em parceria com o Instituto de Química Orgânica da UNICAMP e sob coordenação do Prof. Ronaldo Pilli (processo FAPESP 2010/07864-2), iniciou-se um trabalho visando o desenvolvimento de um novo composto para controle da Vassoura de bruxa e da doença *Frosty Pod Rot*. Este composto vem sendo desenvolvido com base nas propriedades fungicidas das estrobilurinas e dos inibidores da AOX SHAM e n-propil galato. Se eficaz, a nova droga será protegida através de pedido de patente.

Como suporte para este trabalho, a resolução de estrutura da AOX será resolvida, sendo de grande relevância para o planejamento das drogas que vem sendo desenvolvidas para inibição da enzima. Este trabalho será supervisionado pela Dra. Sandra Dias, do Laboratório Nacional de Biociências/Síncrotron que vem trabalhando ativamente na cristalização de outras proteínas do fungo *M. perniciosus*, de modo que quatro novas estruturas já foram resolvidas. Além de direcionar o planejamento de inibidores para controle da doença, esta será a segunda estrutura da enzima oxidase alternativa resolvida até o momento. Tal fato torna este trabalho ainda mais relevante, pois novos conhecimentos acerca do modo de ação da AOX também poderão ser obtidos.

Finalmente, a Dra. Gisele Monteiro da faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Universidade Estadual de São Paulo) realizará a expressão heteróloga da enzima AOX de *M. perniciosus* em *S. cerevisiae*, visando estudar as possíveis alterações metabólicas decorrentes da presença desta enzima na levedura, como também obter um modelo para teste de drogas.

ANEXO A: O processo de senescência em *Moniliophthora perniciosa*

INTRODUÇÃO

A mitocôndria provê grande parte da energia para a célula, no entanto é também uma importante fonte de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Devido à alta reatividade destas moléculas, a mitocôndria é também o principal alvo do estresse oxidativo gerado e, conseqüentemente, é um elemento bastante relevante na determinação do tempo de sobrevivência de alguns fungos (Gredilla, Grief, & Osiewacz 2006).

O ascomiceto *Podospora anserina* é um fungo filamentosos, que, após certo período de crescimento, apresenta mudanças importantes no seu aspecto micelial e também na taxa de crescimento das hifas, culminando com a morte do micélio (Rizet 1957). Este processo de envelhecimento, conhecido como senescência, não é comum em fungos, pois, de modo geral, eles são capazes de crescer indefinidamente.

A senescência, entre outros sintomas, é caracterizada basicamente pela diminuição progressiva da taxa de alongação das extremidades da hifa (até a sua morte), pela produção de um pigmento escuro pelo micélio e pelo aparecimento de defeitos respiratórios (Rizet 1957). Este processo foi inicialmente descrito por Rizet (1957), que observou que micélios provenientes de um único esporo sexual de *P. anserina* expandem a uma taxa constante até atingir um tempo crítico de vida. A partir daí, os micélios passam por um período de diminuição progressiva do crescimento que culmina com a morte da hifa (Rizet 1957).

A função mitocondrial parece ter um importante papel neste processo e uma forte ligação entre o “tipo de respiração” e a longevidade do organismo é observada. Os defeitos respiratórios são uma consequência do elevado acúmulo de mutações nos genes mitocondriais codificantes

para as subunidades dos complexos respiratórios da via principal durante a vida do organismo. Este elevado acúmulo de mutações se deve às características do sistema de reparo mitocondrial, que é pouco eficiente, bem como à ausência de um envoltório de proteção do DNA mitocondrial. Assim, o DNA mitocondrial se torna mais vulnerável aos danos ocasionados pelas EROs ali produzidas (Osiewacz 2002a; Osiewacz 2002c).

Em 1956, Pittenger relatou que o micélio de um mutante de *Neurospora crassa* que apresentava o fenótipo senescente era deficiente para os citocromos *a* e *b* (constituintes do complexo III da cadeia respiratória principal) e também não possuía atividade da citocromo *c* oxidase (complexo IV) (Pittenger 1956). Além do aparecimento de defeitos respiratórios durante a progressão da senescência, verifica-se uma mudança do tipo de respiração das culturas miceliais que passam de uma respiração citocromo-dependente, sensível ao cianeto, para uma respiração insensível ao cianeto, cuja principal enzima é a AOX. Em fungos, acredita-se que a indução desta enzima ocorra principalmente como uma resposta a bloqueios genéticos (mutações nos genes codificantes para as subunidades dos complexos respiratórios) ou químicos na cadeia de transporte de elétrons principal. Deste modo, o aparecimento de níveis elevados de atividade da oxidase alternativa pode ser um importante indicador de disfunção mitocondrial (Bertrand 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico e condições de crescimento

Utilizou-se o isolado FA553 de *M. pernicioso* coletado em Ilhéus, Bahia, o qual apresenta patogenicidade a plantas de cacau suscetíveis.

Em nosso laboratório, temos culturas do isolado FA553 nas fases necrotrófica em estágio inicial de crescimento (novo) e necrotrófica em processo de senescência. O micélio necrotrófico em fase inicial de crescimento foi obtido a partir da germinação de um esporo em meio rico em nutrientes (MYEA). A germinação dos esporos neste meio é acompanhada por rápida mudança do micélio para a fase necrotrófica. O crescimento deste micélio recém-germinado (em estágio inicial de crescimento) é relativamente rápido e ele é caracterizado pelo predomínio de hifas aéreas (Figura 1A). Após sucessivas repicagens, o micélio parece atingir o tempo crítico de vida (como descrito em *P. anserina*) e começa a apresentar sintomas de crescimento irregular, secreção de um pigmento escuro e redução da taxa de crescimento (Figura 1B).

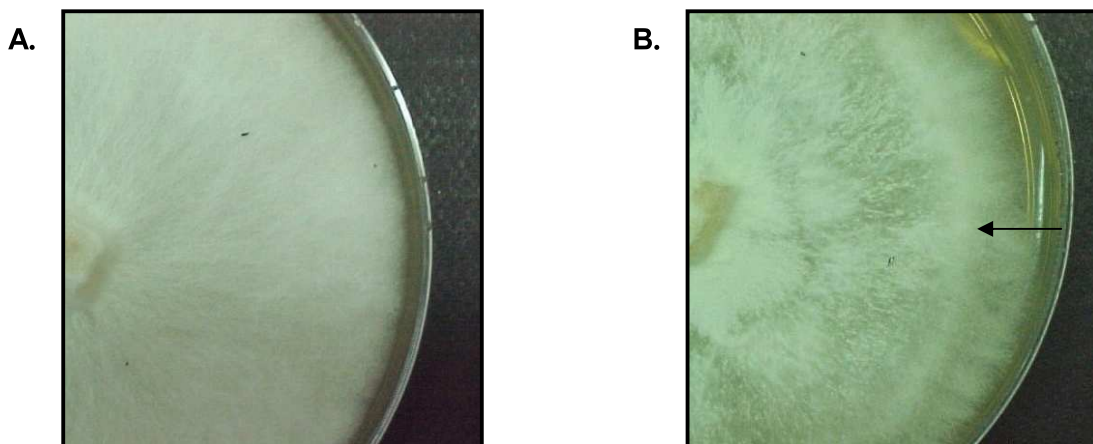


Figura 1. Aspecto morfológico do micélio necrotrófico de *M. pernicioso* (A) Micélio em estágio inicial de crescimento, apresentando predomínio de hifas aéreas e (B) micélio em processo de senescência, com poucas hifas aéreas e crescimento ondulado do micélio, característico de micélio senescente (seta).

Comparação da expressão do gene *Mp-aox* nos micélios em estágio inicial de desenvolvimento e senescente

A análise da expressão do gene *Mp-aox* nos micélio em estágio inicial de desenvolvimento e senescente foi realizada através de ensaios de *northern blot*. Para isto, o RNA total foi extraído através do método do fenol quente. Este RNA foi em seguida quantificado e as amostras desnaturadas foram fracionadas por tamanho em gel denaturante de agarose (1%) segundo protocolo padrão (Sambrook & Russell 2001). Após o fracionamento, as amostras contidas no gel foram transferidas à membrana carregada (Hybond N+, *Amersham – GE Healthcare Life Sciences*) por transferência em solução salina SSC (cloreto de sódio 3M, citrato de sódio 0,3M), segundo protocolo descrito por Sambrook (Sambrook et al. 2001). Para ligação covalente do RNA à membrana, esta foi incubada por 2 horas a 80°C.

A sonda foi preparada utilizando-se como molde um fragmento de 1000 pb correspondente ao gene *Mp-aox* marcado com ATP³² (> 3000 ci, *Amersham – GE Healthcare Life Sciences*), de acordo com a técnica de hexaoligonucleotídeo aleatório (Feinberg & Vogelstein 1983). Após purificação da sonda marcada, esta foi desnaturada e adicionada à solução de pré-hibridização. O sistema permaneceu a 43°C *overnight* sob rotação constante no forno de hibridização. Após as lavagens, a membrana foi exposta a uma auto-radiografia em filme IBF–Medix, durante dois dias a -70°C.

Comparação das taxas de crescimentos dos micélios necrotróficos em fase inicial de desenvolvimento e senescente de *M. pernicios*

O crescimento dos micélios necrotróficos de *M. pernicios* em fase inicial de desenvolvimento e senescente foi realizado em “tubos de corrida” (tubos de vidro de 60 cm de

comprimento e 16 mm de diâmetro). Para isto, foram adicionados aos tubos, em posição horizontal, 30 ml de meio MYEA para formação de uma fina camada de ágar sobre a qual o fungo se desenvolveu. Um *plug* de cada micélio (em fase inicial de crescimento e senescente) com área aproximada de 0,25 cm² foi inoculado no seu respectivo tubo. O crescimento dos fungos foi medido semanalmente, sendo acompanhado de registros fotográficos para destacar as diferenças morfológicas entre os micélios. Este tipo de experimento utilizando-se tubos de corrida é bastante utilizado para estudos dos ritmos circadianos em *Neurospora crassa* (Kramer 2007) e foi adaptado para se avaliar possíveis diferenças nos padrões de crescimento entre os diferentes estágios de crescimento de *M. perniciosa*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de senescência em *M. pernicioso*

O isolado FA553 de *M. pernicioso* apresenta mudanças nas suas características morfológicas e metabólicas ao longo de repicagens sucessivas. Estas mudanças envolvem alterações relacionadas ao perfil de expressão gênica (dados não mostrados) como também à morfologia micelial (Figura 1). Dentre as alterações genéticas do micélio senescente de *M. pernicioso* verificou-se o aumento da expressão do gene *aox* em relação ao fungo em estágio inicial de desenvolvimento. Adicionalmente, observou-se a diminuição ou mesmo estagnação do crescimento do micélio senescente como também a produção de uma pigmentação escura. Estas características evidenciam um fenômeno que vem sendo bastante discutido em fungos, o processo de senescência. Para melhor relatar esta observação, os micélios, novo e senescente, foram inoculados em tubos de corrida e o comprimento do micélio foi medido de sete em sete dias aproximadamente. As diferenças na taxa de crescimento dos micélios novo e senescente foram confirmadas, como também se observou, durante este intervalo de meses, o processo de envelhecimento do micélio inicialmente caracterizado como novo (Figuras 2 e 3).

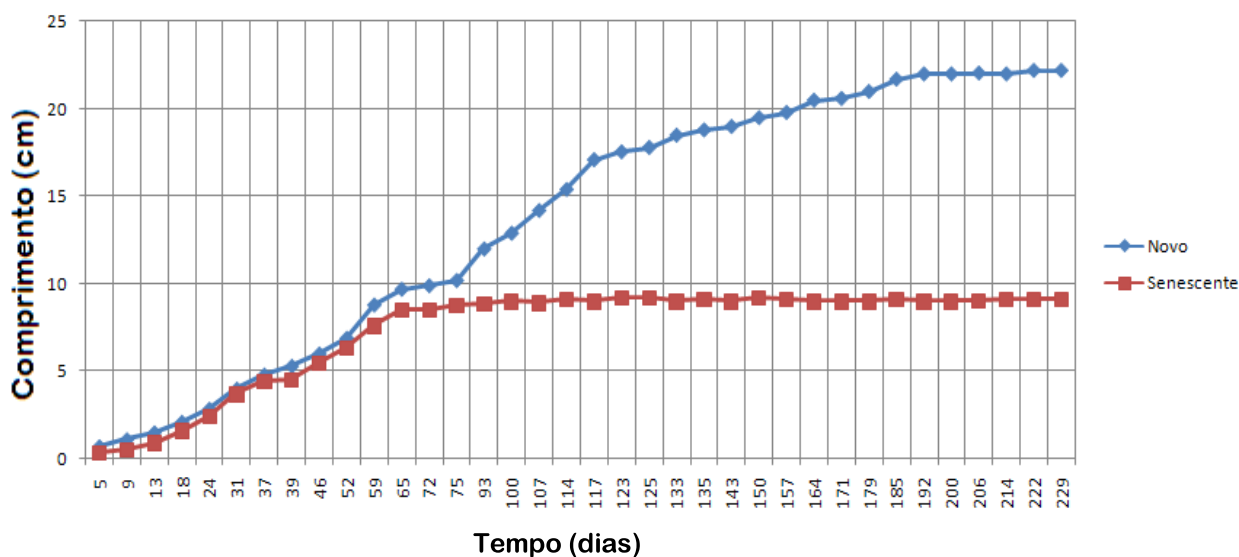


Figura 2. Comparação das diferenças de crescimento dos micélios necrotrófico em estágio inicial de crescimento (novo) e senescente. Observa-se que o fungo senescente apresenta estagnação precoce do crescimento, anterior ao fungo novo. Este por sua vez, após algum tempo, também inicia o processo de envelhecimento, apresentando diminuição da taxa de crescimento com tendência a estagnação. SD= +/-0,5mm



Figura 3. Diferenças de crescimento entre os micélios em estágio inicial de crescimento (N) e senescente (S). Vistas superior (A) e inferior do tubo (B). Adicionalmente às mudanças na taxa de crescimento, observa-se também a pigmentação do micélio senescente (B), a qual é característica do processo de senescência.

A pigmentação do micélio senescente pode estar relacionada à produção de lipofuscina pelo fungo, um pigmento associado à proteção contra estresse oxidativo (Silar, Lalucque, & Vierny 2001). Estudos mostram que o acúmulo deste pigmento está fortemente vinculado a uma maior produção de EROs no organismo, a qual também está diretamente ligada ao processo de envelhecimento. Osiewacz (2002) relatou a importante relação entre a produção mitocondrial de EROs e o processo de envelhecimento. Observou-se que em mitocôndrias de organismos jovens somente pequenas quantidades de EROs são produzidas. No entanto, com o envelhecimento, os genes que codificam para as proteínas dos complexos protéicos mitocondriais acumulam mutações progressivas e, conseqüentemente, muitas dessas proteínas por eles codificadas perdem sua funcionalidade (Osiewacz 2002b; Osiewacz 2002c). Desta forma, há um aumento da

produção de EROs, os quais podem causar muitos danos à célula. Neste contexto, a AOX seria fundamental, atuando como uma via de escape e contribuindo para o aumento da longevidade do organismo. Como observado nos ensaios de *northern blot*, a expressão do gene *aox* mostrou-se aumentada no micélio senescente de *M. perniciosus* (Figura 4). Deste modo, considerando esta maior participação da AOX neste micélio, a ocorrência de diminuição da taxa de crescimento do micélio é esperada, uma vez que a atividade da enzima não contribui para a formação do gradiente eletroquímico, reduzindo assim a síntese de ATP (Joseph-Horne, Hollomon, & Wood 2001).

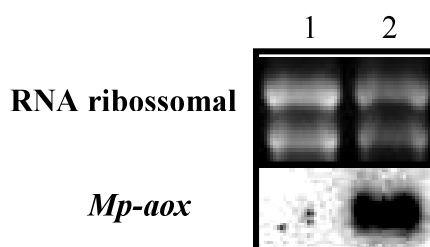


Figura 4. Expressão do gene *Mp-aox* no micélio em estágio inicial de crescimento (1) e senescente (2). O nível de expressão do gene *Mp-aox* foi normalizado pelas bandas de rRNA visualizadas pelo brometo de etídeo em gel de agarose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bertrand H. (2000) ROLE OF MITOCHONDRIAL DNA IN THE SENESCENCE AND HYPOVIRULENCE OF FUNGI AND POTENTIAL FOR PLANT DISEASE CONTROL. *Annu.Rev.Phytopathol.* **38**, 397-422.
2. Feinberg A.P. & Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* **132**, 6-13.
3. Gredilla R., Grief J., & Osiewacz H.D. (2006) Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Exp.Gerontol.* **41**, 439-447.
4. Joseph-Horne T., Hollomon D.W., & Wood P.M. (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim.Biophys.Acta* **1504**, 179-195.
5. Kramer C. (2007) Rhythmic conidiation in *Neurospora crassa*. *Methods Mol.Biol.* **362**, 49-65.
6. Osiewacz H.D. (2002a) Aging in fungi: role of mitochondria in *Podospora anserina*. *Mech.Ageing Dev.* **123**, 755-764.
7. Osiewacz H.D. (2002b) Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi. *Ageing Res.Rev.* **1**, 425-442.
8. Osiewacz H.D. (2002c) Mitochondrial functions and aging. *Gene* **286**, 65-71.
9. Pittenger T.H. (1956) SYNERGISM OF TWO CYTOPLASMICALLY INHERITED MUTANTS IN *Neurospora crassa*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **42**, 747-752.
10. Rizet G. (1957) [Are modifications leading to senescence in *Podospora* of cytoplasmic nature?]. *C.R.Hebd.Seances Acad.Sci.* **244**, 663-665.
11. Sambrook,J. & Russell,D. (2001) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
12. Silar P., Lalucque H., & Vierny C. (2001) Cell degeneration in the model system *Podospora anserina*. *Biogerontology.* **2**, 1-17.

ANEXO B: Comparação do genoma mitocondrial dos patógenos do cacauero

Moniliophthora perniciosa* e *Moniliophthora roreri

Gustavo Lacerda[#]; Odalys Garcia[#]; Ricardo A. Tiburcio; Francisco J. Medrano; Marcelo F. Carazzolle; Daniela P. T. Thomazella; Stephen C. Schuster; John E. Carlson; Mark J. Guiltinan; Bryan A. Bailey; Piotr Mieczkowski; Gonçalo A. G. Pereira and Lyndel W. Meinhardt

[#]Authors with equal contribution

*** Manuscrito em preparação**

INTRODUÇÃO

Moniliophthora roreri e *Moniliophthora perniciosa* são basidiomicetos hemibiotróficos, agentes etiológicos de duas das mais importantes doenças fúngicas do cacauero: a doença *Frosty Pod Rot* e a Vassoura de bruxa, respectivamente (Aime & Phillips-Mora 2005). Ambas as doenças representam uma ameaça para a produção de cacau mundial e a sua disseminação contínua tem preocupado a indústria chocolateira de todo o mundo (Evans 2007).

O genoma mitocondrial, o qual é um vestígio de um ancestral de proteobactéria endossimbionte (Gray, Burger, & Lang 1999), pode evoluir mais rapidamente e de forma independente do genoma nuclear (Burger, Gray, & Lang 2003). Em vista desta independência evolutiva, o número de genes pode flutuar bastante entre espécies, com uma variação de 3 a 67 para genes codificantes de proteínas e de 0 a 27 para tRNAs (Adams & Palmer 2003). Genes que codificam proteínas relacionadas a processos celulares vitais foram conservados ao longo da evolução e são amplamente empregados em estudos filogenéticos entre espécies. Por outro lado, há uma diversidade impressionante na organização e expressão dos demais genes e regiões intergênicas, que pode revelar detalhes de eventos recentes de especiação. (Bullerwell, Forget, &

Lang 2003; Bullerwell & Lang 2005; Burger et al. 2003). Diferenças de tamanho encontradas entre muitos genomas mitocondriais são comumente detectadas e, em geral, não estão relacionadas ao conteúdo gênico, de modo que os genes relacionados aos processos de fosforilação oxidativa são extremamente conservados. Tem se observado que esta variação de tamanho é atribuída a variações no tamanho de introns e regiões intergênicas ou à presença de plasmídeos integrados (Formighieri et al. 2008; Lang, Laforest, & Burger 2007). Deste modo, a caracterização e comparação da estrutura de genomas mitocondriais é central para entender a evolução deste genoma e sua possível participação em processos de especiação. Considerando esta importância, o número de genomas de mtDNA analisados e sequenciados tem aumentado consideravelmente (Formighieri et al. 2008).

Em fungos, o genoma mitocondrial é bastante diversificado, variando em tamanho e topologia (linear ou circular) (Clark-Walker 1992; Gray et al. 1999). Até o momento, o maior genoma mitocondrial de basidiomicetos sequenciado pertence à *M. pernicioso*, com um total de 109,103 pb. Este grande tamanho parece estar associado à presença de longas regiões intergênicas e a um plasmídeo linear integrado de forma estável no genoma do fungo (Formighieri et al. 2008).

O presente trabalho é uma análise comparativa do genoma mitocondrial de *M. roreri* em relação a *M. pernicioso*, em que serão descritos organização da sequência genômica e ordem e conteúdo gênicos. Uma comparação inicial do genoma mitocondrial destes patógenos mostrou semelhanças entre eles, como esperado pela proximidade filogenética destas espécies: ambos os genomas são altamente sintênicos, são muito similares em conteúdo GC, códon *usage* e posição dos tRNAs. No entanto, existem diferenças marcantes que envolvem principalmente a estrutura dos genomas, incluindo a existência de regiões repetitivas e um plasmídeo integrado em *M.*

perniciosa e a presença de três plasmídeos lineares extracromossomais em *M. roreri*. Este trabalho analisa e discute as diferentes funções que esses elementos mitocondriais podem ter na biologia e ao longo do processo de evolução destes patógenos.

MATERIAL E MÉTODOS

Observação: Os experimentos apresentados envolvem apenas aqueles que foram realizados pela aluna.

Isolados e condições de crescimento de *M. roreri*

Os experimentos foram realizados com o isolado de *M. roreri* MAC2977, o qual é mantido em meio PDA contendo 39g/L de *Potato Dextrose Agar* (Difco). Para a realização dos experimentos, o micélio foi crescido em meio com baixo conteúdo de carboidratos – 1,7 g/L de *malt extract broth* (Difco), 5 g/L de extrato de levedura, 50 ml/L de glicerol. As culturas permaneceram sob agitação constante de 120 rpm e a temperatura de 28°C. Após sete dias de crescimento, o micélio foi coletado para extração de RNA e DNA genômico como também para o isolamento de mitocôndrias.

Extração de DNA genômico total de *M. roreri*

A extração de DNA genômico foi realizada de acordo com o método CTAB descrito por Sambrook (Sambrook & Russell 2001) e a integridade do DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,0%.

Eletroforese em gel de campo pulsado (*CHEF-Gel Electrophoresis*)

Plugs das mitocôndrias purificadas de *M. roreri* e *M. perniciosa* foram preparados e submetidos à eletroforese em gel de campo pulsado para confirmar a presença de três plasmídeos

mitocondriais encontrados em *M. royeri* através de análises de bioinformática. O isolamento de mitocôndrias foi realizado segundo a metodologia descrita por Gredilla (Gredilla, Grief, & Osiewacz 2006). A preparação dos *plugs* foi realizada de acordo com Orbach (Orbach et al. 1988). Brevemente, a suspensão de mitocôndrias foi misturada com um volume igual de uma solução contendo sorbitol 1M, EDTA 50 mM, pH 8,0, *Low-Melting Point Agarose* – BioRAD 1,0% e esta mistura foi transferida para os moldes. Após a polimerização, os *plugs* formados foram colocados em 4 ml de tampão NDS contendo Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,5 M, N-lauroylsarcosine 1%, pH 9,5 e 2 mg/ml de proteinase K. Os *plugs* foram mantidos a 4°C durante 48 horas. A solução de NDS foi então removida e os *plugs* foram lavados três vezes com 0,5 M de EDTA, pH 8,0. Para a confecção do gel, utilizou-se 1,0% de agarose *Fast Lane* (Cambrex) em 0,5x de tampão TBE (45 mM Tris-Borato, 5mM EDTA). Os marcadores moleculares e os *plugs* contendo as mitocôndrias foram colocados nos poços do gel e selados com agarose (1.0%). Os parâmetros de corrida foram: temperatura de 11, 5°C, velocidade de 5,0 V/cm e o tempo total de corrida foi de 18 horas, com pulsos de intervalo progressivo aumentando de 1 a 70 segundos. Finalmente, o gel foi corado com o corante *SYBR Green* durante 2 horas e o resultado foi documentado com o escâner *Typhoon Laser Scanner 9410* (Amersham GE Healthcare Life Sciences).

Reverse transcription-PCR

RNA total de *M. royeri* foi extraído utilizando-se o kit *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen). O RNA foi então tratado com a enzima *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e o cDNA foi sintetizado com o kit *SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis kit* (Invitrogen). As reações de PCR foram realizadas com 100 ng de cDNA e 5 pmol de

primers em uma reação de 20 μ l. A sequência dos *primers* utilizados para amplificação das polimerases dos plasmídeos é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1: *Primers* para os ensaios de RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

Organismo	Gene	Código	5' primer	3' primer
<i>M. royeri</i>	RNA polimerase pMR1	<i>Mr1-rpo</i>	GATTGCTTCGCAGTAACTCCT	AATTTAATTCCTTTCCATCAA
<i>M. royeri</i>	RNA polimerase pMR2	<i>Mr2-rpo</i>	CCTATCTATTGAGAACTCCAAG	TGAATAAAATTAGGCATTAAACC
<i>M. royeri</i>	RNA polimerase pMR3	<i>Mr3-rpo</i>	CCAATGACATGAATAACTCC	TGAGTTGCATCTAGTGAGT
<i>M. royeri</i>	DNA polimerase pMR1	<i>Mr1-dpoB</i>	AAAAGAAATTTGCCAGGAAC	ATAAATTTTCCGCCCTTAC
<i>M. royeri</i>	DNA polimerase pMR2	<i>Mr2-dpoB</i>	GTGAAGGTATAAATATTGAAAA TG	AATCAAATCGGATTAGCTCT
<i>M. royeri</i>	DNA polimerase pMR3	<i>Mr3-dpoB</i>	GCCAACAAATTCTGATGAGG	TCACTTCCAATAAATTTGGATTC

*Todas as sequências de *primers* estão na direção 5'–3'

RESULTADOS

***M. roreri* possui três plasmídeos lineares extracromossomais**

O DNA mitocondrial de *M. roreri* foi sequenciado como parte do projeto genoma de *M. roreri* USDA-ARS (www.lge.ibi.unicamp.br/roreri). Diferentemente de *M. perniciososa* (Formighieri et al. 2008), não se verificou a presença de um plasmídeo integrado no genoma mitocondrial de *M. roreri*. No entanto, três *contigs* independentes com baixo conteúdo GC, com tamanho aproximado de 9 kb e similaridade com outros plasmídeos mitocondriais de fungos foram formados. Cada um destes *contigs* apresentou a sequência gênica de uma RNA polimerase e uma DNA polimerase do tipo B (*rpo* e *dpoB*) com orientações opostas, estrutura de organização típica em plasmídeos mitocondriais do tipo invertron. Paralelamente às análises de bioinformática, um fragmento de aproximadamente 9 kb foi visualizado quando o DNA genômico de *M. roreri* foi extraído e analisado em gel de agarose (Figura 1A). Especulou-se que a banda adicional observada poderia corresponder aos plasmídeos extra-cromossomais encontrados pelas análises de bioinformática. Para confirmar a presença desses três plasmídeos, a mitocôndria de *M. roreri* foi isolada e submetida à eletroforese em gel de campo pulsado (*CHEF gel Electrophoresis*). De fato, três fragmentos com tamanhos variando entre 9 e 11 kb foram identificados nas amostras correspondentes às mitocôndrias de *M. roreri*, mas não de *M. perniciososa* (Figura 1B). Estes fragmentos provavelmente correspondem aos três plasmídeos lineares preditos pelas análises computacionais como também à banda de 9kb presente nas amostras de DNA genômico de *M. roreri* e foram denominados pMR1, pMR2 e pMR3.

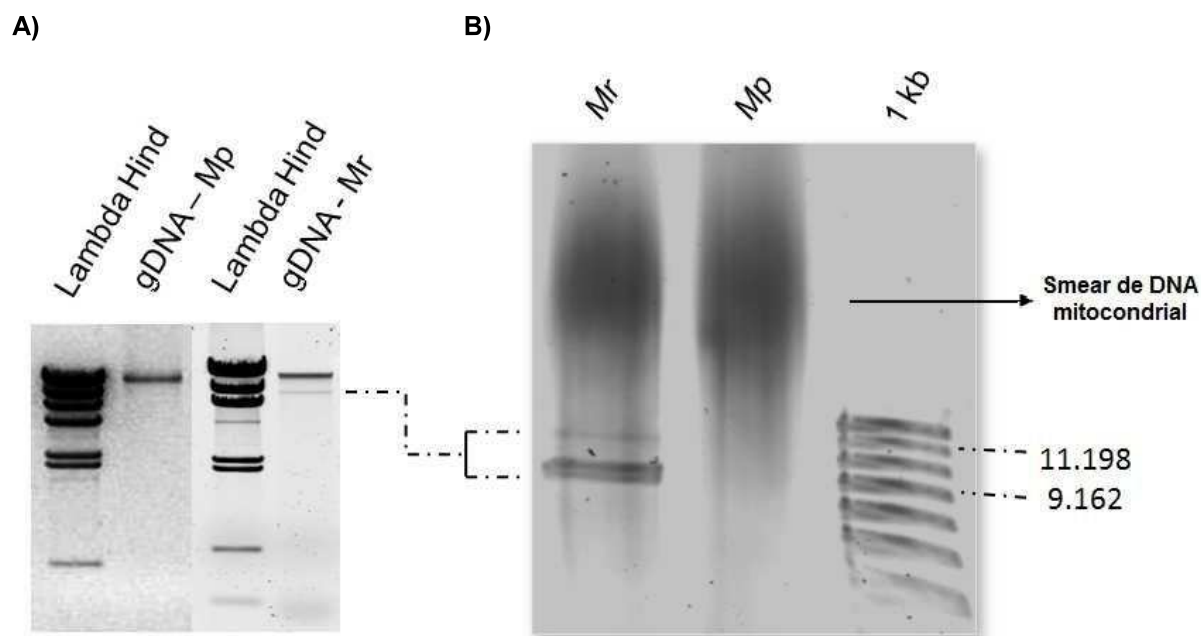


Figura 1. Confirmação experimental da presença dos plasmídeos mitocondriais de *M. roreri*. A) Gel de DNA genômico de *M. pernicioso* e *M. roreri*. Verifica-se uma banda adicional na amostra de *M. roreri* que possui aproximadamente 9 kb. B) CHEF-Gel de mitocôndrias isoladas de *M. pernicioso* e *M. roreri*. Verificou-se a presença de três bandas adicionais na amostra de *M. roreri* que provavelmente correspondem aos três plasmídeos extracromossomais preditos pelas análises de bioinformática. Mr – *M. roreri*; Mp – *M. pernicioso*; gDNA – DNA genômico

As análises de bioinformática mostraram que o plasmídeo pMR1 possui aproximadamente 9.7 kb e repetições terminais invertidas (TIR, *terminal inverted repeats*) de 208 pb. Este plasmídeo apresentou alta similaridade ($e\text{-value} < e-100$) com plasmídeos mitocondriais dos fungos *Podospora anserina* (pAL2-1), *Blumeria graminis* (pBgh), *Fusarium proliferatum* (pFP1) e *Claviceps purpurea* (pCIK1). Já o plasmídeo pMR2 tem tamanho de 11.5 kb e apresenta sequências TIR de 58 pb. Este plasmídeo possui similaridade a plasmídeos mitocondriais de *Pleurotus ostreatus* (mlp1), *Flammulina velutipes* (pFV2) e *Hebeloma circinans* (pHC2). Finalmente, o plasmídeo pMR3 tem 10.09 kb e sequências TIR de 29 pb foram identificadas. Este plasmídeo apresentou similaridade ao plasmídeo mitocondrial integrado de *M. pernicioso* e

aos plasmídeos mitocondriais de *P. ostreatus* (pMLP2), *F. velutipes* (pFV1), *Neurospora intermedia* (pKALILO) e *Gelasinospora sp.* G114 (Gel-kal).

Transcrição das polimerases plasmidiais de *M. roreri*

Com o objetivo de se verificar se as polimerases dos plasmídeos identificados são transcritas e, portanto, se esses plasmídeos são ativos e possivelmente funcionais, o RNA de *M. roreri* foi extraído e o cDNA sintetizado. Transcritos de todas as RNA e DNA polimerases foram identificados indicando que esses plasmídeos possivelmente têm participação no metabolismo deste fungo (Figura 2).

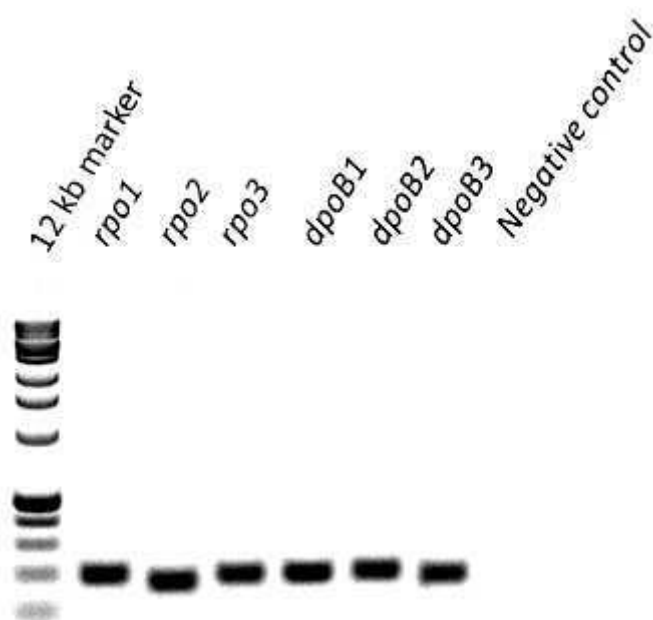


Figura 2. Ensaio semi-quantitativo (RT-PCR) mostrando a presença de transcritos de todas as polimerases plasmidiais de *M. roreri*. *rpo1*, *rpo2* e *rpo3*: RNA polimerases; *dpoB1*, *dpoB2* e *dpoB3*: DNA polimerases.

DISCUSSÃO

Duas importantes variações estruturais diferem o genoma mitocondrial de *M. roreri* e *M. pernicioso*, como: a presença de um plasmídeo integrado (Formighieri et al. 2008) e grande abundância de sequências repetitivas (dados não mostrados) em *M. pernicioso*; e a existência de três plasmídeos lineares extracromossomais em *M. roreri*. Acredita-se que estas diferenças encontradas têm relação com características exclusivas de cada fungo.

A função do plasmídeo mitocondrial de *M. pernicioso* foi previamente discutida por Formighieri (Formighieri et al. 2008) e sua presença foi relacionada ao processo de senescência sugerido para este fungo. Especula-se que as sequências repetitivas encontradas no genoma de *M. pernicioso* também possam ter relação com este processo. Isto porque, estas sequências são consideradas elementos de instabilidade em potencial do mtDNA, podendo gerar severos rearranjos e prejudicar a funcionalidade de importantes genes mitocondriais (Chomyn & Attardi 2003).

Os plasmídeos extracromossomais de *M. roreri* estão provavelmente ativos e funcionais, uma vez que transcritos das seis polimerases plasmidiais (três RNA polimerases e três DNA polimerases) foram identificados (Figura 2). Além disso, também foi encontrado um EST na biblioteca de transcriptoma da interação *M. roreri*–*T. cacao* correspondente a uma região do plasmídeo pMR1 (dado não mostrado). De modo geral, a presença de plasmídeos lineares na mitocôndria de fungos tem sido relacionada a mutações severas do genoma, uma vez que estes elementos móveis podem integrar e desintegrar do mtDNA (Griffiths 1995). Por se inserirem aleatoriamente no genoma mitocondrial, podem prejudicar a funcionalidade de genes importantes da cadeia respiratória, levando ao desenvolvimento de fenômenos específicos, como o processo de senescência. No entanto, em *M. roreri* nenhum indício de ocorrência deste processo foi

verificado e, portanto, especula-se que esses elementos tenham outras funções na biologia e desenvolvimento deste patógeno.

Uma função interessante reportada para plasmídeos mitocondriais foi descrita em *Fusarium solani*. Neste fungo, uma relação entre a presença desses plasmídeos lineares e o desenvolvimento de patogenicidade foi verificada, de modo que a remoção do plasmídeo implicou em considerável redução da virulência do organismo (Samac & Leong 1988). Também, uma relação de plasmídeos mitocondriais com a adaptabilidade do organismo a variações ambientais é sugerida. Uma vez que estes elementos são agentes mutagênicos em potencial e fornecem grande flexibilidade genômica, especula-se que eles possam estar atuando como uma fonte importante de variabilidade (Griffiths 1995), conferindo ao organismo que os possui uma maior plasticidade para sobreviver perante as adversidades ambientais.

Apesar da grande proximidade filogenética de *M. roreri* e *M. pernicioso*, estas espécies diferem em importantes aspectos ao longo do seu desenvolvimento e ciclo de vida. Deste modo, é possível que os plasmídeos mitocondriais possam estar relacionados a diferenças importantes entre estes dois fungos, conferindo adaptações específicas e evolutivamente significantes aos patógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams K.L. & Palmer J.D. (2003) Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol.Phylogenet.Evol.* **29**, 380-395.
2. Aime M.C. & Phillips-Mora W. (2005) The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*. **97**, 1012-1022.
3. Bullerwell C.E., Forget L., & Lang B.F. (2003) Evolution of monoblepharidalean fungi based on complete mitochondrial genome sequences. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1614-1623.
4. Bullerwell C.E. & Lang B.F. (2005) Fungal evolution: the case of the vanishing mitochondrion. *Curr.Opin.Microbiol.* **8**, 362-369.
5. Burger G., Gray M.W., & Lang B.F. (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet.* **19**, 709-716.
6. Chomyn A. & Attardi G. (2003) MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **304**, 519-529.
7. Clark-Walker G.D. (1992) Evolution of mitochondrial genomes in fungi. *Int.Rev.Cytol.* **141**, 89-127.
8. Evans H.C. (2007) Cacao diseases-the trilogy revisited. *Phytopathology* **97**, 1640-1643.
9. Formighieri E.F. et al. (2008) The mitochondrial genome of the phytopathogenic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* is 109 kb in size and contains a stable integrated plasmid. *Mycol.Res.* **112**, 1136-1152.
10. Gray M.W., Burger G., & Lang B.F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
11. Gredilla R., Grief J., & Osiewacz H.D. (2006) Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Exp.Gerontol.* **41**, 439-447.
12. Griffiths A.J. (1995) Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiol.Rev.* **59**, 673-685.
13. Lang B.F., Laforest M.J., & Burger G. (2007) Mitochondrial introns: a critical view. *Trends Genet.* **23**, 119-125.
14. Orbach M.J. et al. (1988) An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Mol.Cell Biol.* **8**, 1469-1473.
15. Samac D.A. & Leong S.A. (1988) Two linear plasmids in mitochondria of *Fusarium solani* f. sp. cucurbitae. *Plasmid* **19**, 57-67.
16. Sambrook,J. & Russell,D. (2001) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Production of Calcium Oxalate Crystals by the Basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the Causal Agent of Witches' Broom Disease of Cacao

Maria Carolina S. do Rio · Bruno V. de Oliveira ·
Daniela P. T. de Tomazella · José A. Fracassi da Silva ·
Gonçalo A. G. Pereira

Received: 21 August 2007 / Accepted: 26 November 2007 / Published online: 3 January 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2007

Abstract Oxalic acid has been shown as a virulence factor for some phytopathogenic fungi, removing calcium from pectin and favoring plant cell wall degradation. Recently, it was published that calcium oxalate accumulates in infected cacao tissues during the progression of Witches' Broom disease (WBD). In the present work we report that the hemibiotrophic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of WBD, produces calcium oxalate crystals. These crystals were initially observed by polarized light microscopy of hyphae growing on a glass slide, apparently being secreted from the cells. The analysis was refined by Scanning electron microscopy and the composition of the crystals was confirmed by energy-dispersive x-ray spectrometry. The production of oxalate by *M. perniciosa* was reinforced by the identification of a putative gene coding for oxaloacetate acetylhydrolase, which catalyzes the hydrolysis of oxaloacetate to oxalate and acetate. This gene was shown to be expressed in the biotrophic-like mycelia, which *in planta* occupy the intercellular middle-lamella space, a region filled with pectin. Taken together, our results suggest that oxalate production by *M. perniciosa* may play a role in the WBD pathogenesis mechanism.

Introduction

Moniliophthora perniciosa (Stahel) Aime & Phillips-Mora (Agaricales, Marasmiaceae; formerly *Crinipellis perniciosa* [Stahel] Singer) is the causal agent of witches' broom disease (WBD), one of the most important phytosanitary problems of cacao (*Theobroma cacao* L.) in the Americas [25, 29]. This fungus is believed to have originated in the Amazon basin and it is known to infect five families of dicotyledons, including Malvaceae and Solanaceae [8, 14, 25].

The biology of the *M. perniciosa*-cacao interaction is complex and has only recently been studied at the molecular level: a genome project for the fungus produced a draft sequence with twofold coverage (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>; work in progress). *M. perniciosa* exhibits a hemibiotrophic life cycle that parallels the symptoms in the plant. A monokaryotic biotrophic mycelium, without clamp connections, is formed after basidiospore germination and infects flower cushions, developing fruit, and vegetative flushes. In the latter case, the infection causes hypertrophy, hyperplasia, and loss of apical dominance, producing a characteristic green broom structure [8, 9]. Remarkably, despite these symptoms, the biotrophic hyphae are found at low density [24] and do not produce haustoria, only occupying the apoplastic space and showing slow growth [3]. We have recently demonstrated that a biotrophic-like mycelia can be kept *in vitro* by growing spores under nutrient starvation and providing glycerol as a unique carbon source [27]. Therefore, the low nutrient concentration present in apoplast may be the key for the biotrophic phase. Moreover, during this phase, the infected tissue seems to be under intense oxidative stress, which is indicated by the increase in lipid peroxidation [27]. One possible reason for the existence of this oxidative

M. C. S. do Rio · B. V. de Oliveira · D. P. T. de Tomazella ·
G. A. G. Pereira (✉)
Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de
Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade
Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas 13083-970 São
Paulo, Brazil
e-mail: goncalo@unicamp.br

J. A. F. da Silva
Departamento de Química Analítica, Instituto de Química,
Universidade Estadual de Campinas, CP 6157,
Campinas 13083-970 São Paulo, Brazil

situation is the production of hydrogen peroxide by the enzymatic degradation of calcium oxalate crystals (COCs) present in infected plants, which seems to increase during the progression of the disease [3].

During the second (saprotrophic) phase of the life cycle, infected plant tissues become necrotic, forming dry brooms, and the fungus acquires some distinctive features such as the presence of a dikaryotic saprotrophic/necrotrophic mycelium, showing clamp connections [5, 29]. In contrast to the biotrophic hyphae, the saprotrophic mycelium grows vigorously, quickly colonizing the infected plant tissue. Elucidating the mechanisms responsible for the change from the biotrophic to the saprotrophic/necrotrophic phase of the fungus and understanding whether the death of the infected cacao tissue is a consequence or precedes this change in mycelial morphology and physiology is a central question that remains to be answered.

Calcium oxalate is a common constituent of plant cells and its oxidation is involved in plant defense [10]. Interestingly, some pathogens, like *Sclerotinia sclerotiorum*, secrete oxalic acid, which seems to have a role in removing calcium ions bound to host cell wall pectins, thus exposing these structures to enzymes produced by the fungus [7]. In addition, it favors plant cell degradation by shifting the pH of infected plant tissues close to the optimum for cell wall-degrading enzymes such as polygalacturonases, as demonstrated with the basidiomycete *Athelia rolfsii* (formerly *Sclerotium rolfsii*) [2]. Finally, oxalic acid inhibits stomatal closure at night, first, by stimulating accumulation of potassium and starch hydrolysis in guard cells and, second, by disrupting the ABA-dependent process in plants infected with *Sclerotinia sclerotiorum* [4]. Since the basidiospores of *M. perniciosa* are sensitive to UV radiation and invade plants through stomata at night [25], the production of oxalic acid by their hyphae could help in the infection process.

In this work, we show that in vitro mycelia of *M. perniciosa* produces COCs, indicating that this compound may play a role in WBD.

Materials and Methods

Fungal Strain and Growth Conditions

The strain used in this work was FA553, a pure culture derived from spores of the isolate CP02 [11, 26]. Twenty samples of necrotrophic mycelium of this strain were separately inoculated in 300 µl of MYEA medium [21]. The medium was dropped onto one end of common glass slides, which were maintained under sterile conditions on a 2% agar-water layer inside a petri dish, sealed with Parafilm (Pechiney Plastic Packaging). The hyphae initially

grew on the malt medium drop and subsequently they colonized the whole glass slide (Fig. 1). The dishes were cultivated inside a BOD (Biochemical Oxygen Demand) incubator chamber at 25°C and they were observed 30 days after inoculation. Glass slides containing only the drop of MYEA medium were maintained under the same conditions as negative controls.

Light Microscopy

After the incubation period, the petri dishes were opened and the glass slides were removed and immediately observed under normal and polarized white light with an Olympus BX51 optical microscope. The relevant aspects were photographed with Kodak ProImage 100 film and the scales were obtained with the projection of a micrometric slide under the same conditions utilized in the illustrations.

Electron Microscopy and Microanalysis

Microanalyses were performed with a JEOL JSM-6360 scanning electron microscope, with energy-dispersive x-ray spectrometry (EDS), operated at an accelerated voltage of 20 kV. Pieces ($2 \times 2 \text{ cm}^2$) of the slides containing the

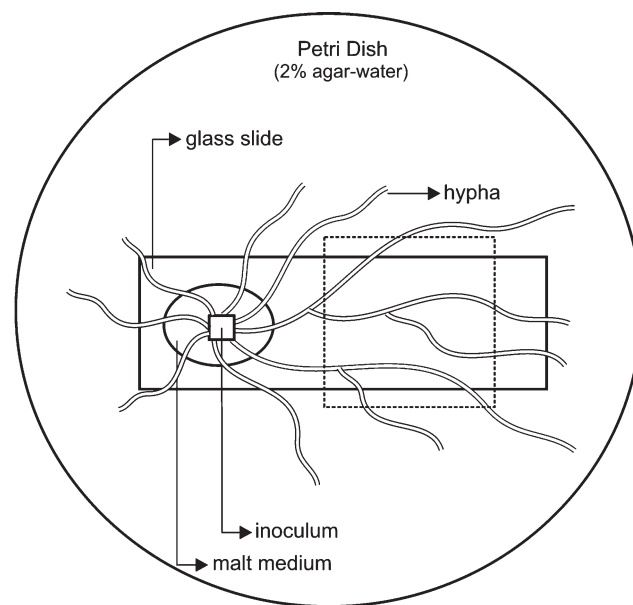


Fig. 1 Diagram showing the method used for growing necrotrophic mycelium of *M. perniciosa* on a common glass slide. The slide, with a drop of malt medium that had been inoculated with a small sample of *M. perniciosa* necrotrophic culture, was placed in a petri dish with a 2% agar-water layer, thus allowing the growth of the hyphae toward the edge of the dish [21]. After 1 month, the petri dishes were opened and the slides removed for microscopic evaluation, performed on the area indicated by the dashed square

hyphae but lacking the culture medium were cut with a diamond cutter and fixed on a carbon support with carbon tapes. In order to improve the image contrast, carbon was evaporated to form a thin (few nanometers) layer over the sample.

Results and Discussion

The hyphae growing on the glass slide, outside of the culture media, were analyzed by light microscopy. The original idea of this technique was to produce cells free of medium residues to stain nuclear DNA [21]. Remarkably, inspection of the necrotrophic mycelium led to the identification of well-defined tetragonal crystals near the hyphae (Fig. 2a), which were more evident when observed under

polarized light (Fig. 2b). Identical structures had been detected associated with biotrophic-like mycelia growing on culture plates, indicating that they are also produced by this kind of hyphae. Glass slides incubated in the same way, but without fungi inoculation, did not produce any similar structure, indicating that this depended on cell activity. Reinforcing this view, we observed bright crystalline-like structures apparently being secreted by cells (Figs. 2c and d).

This analysis was refined by scanning electron microscopy (SEM). Several calcium-rich structures can be observed associated with the mycelium (Fig. 3a) in an image obtained with backscattered electrons (BECs). With BECs, image contrast dependent on the heavier elements is obtained. On closer inspection we observed that the crystals seem to be produced inside the hyphae (Figs. 3b-d), the

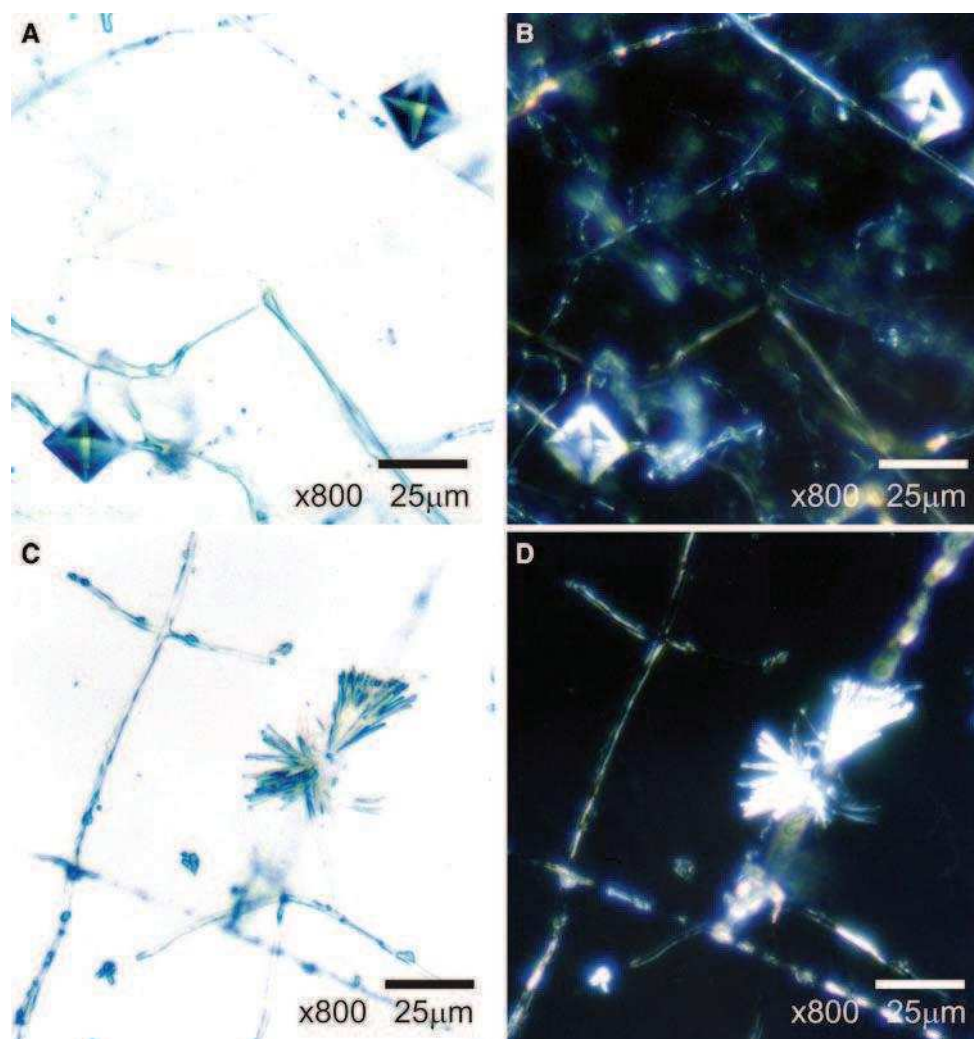


Fig. 2 Light microscopy of necrotrophic mycelium of *Moniliophthora pernicioso* without any treatment, showing crystalline structures associated with the hyphae. (A, B) Crystals of pyramidal shape of several sizes (2–20 μm) were observed. (C, D) Bright crystalline

structures were registered apparently being secreted by the cells. The crystalline structures are more evident observed under polarized light (B, D)

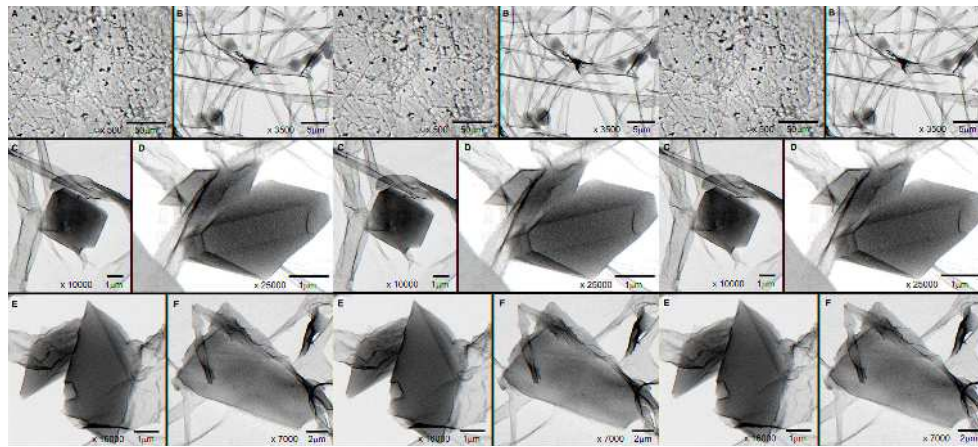


Fig. 3 SEM of *Moniliophthora perniciosa* necrotrophic mycelium. (A) Several calcium-rich structures can be observed associated with the mycelium, in an image obtained with backscattered electrons. (B) In a closer view, we observe that the crystals are produced inside the hyphae. (C) The pyramidal shape of the crystal, in a surface view. (D)

Some crystals present a bipyramidal shape, due to the tetragonal system of growth (weddelite; dihydrated $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). (E) The crystals may cause rupture of the fungus cells. (F) Calcium oxalate crystals also grow in a monocyclic system (wewellite; monohydrate $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

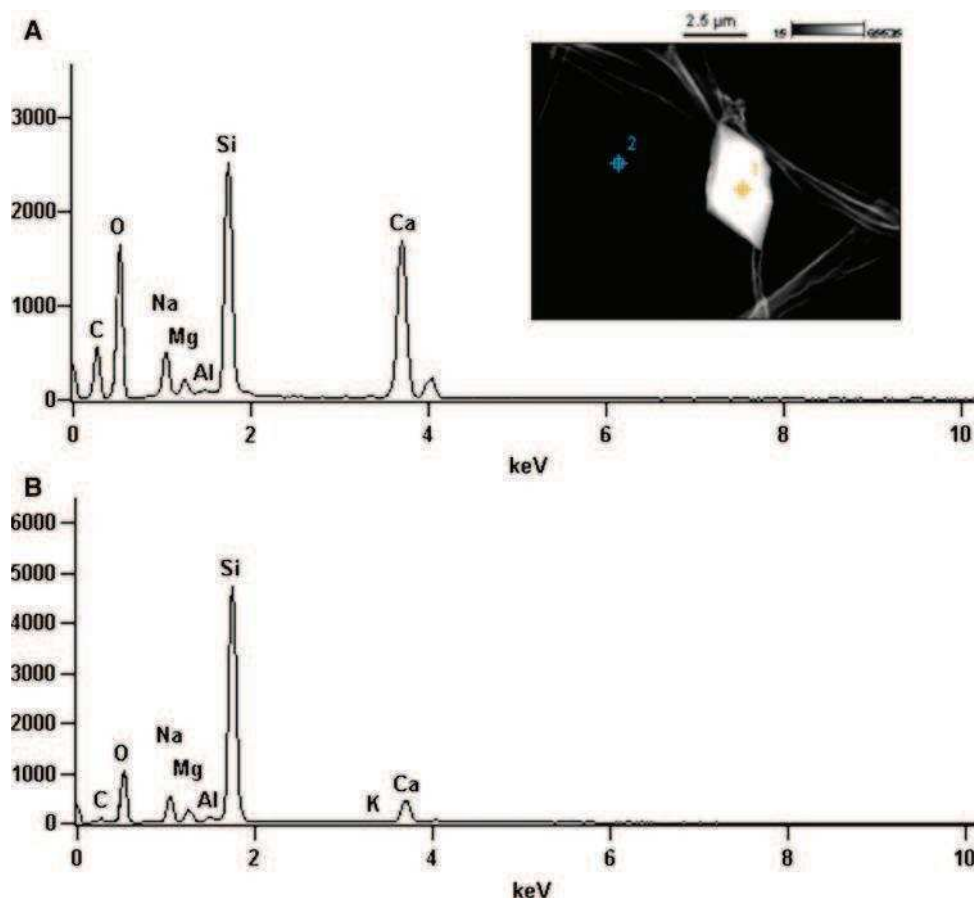
growing of which may cause the cells to rupture (Fig. 3e and f).

Qualitative analysis using EDS is a powerful tool in microanalysis. Chemical analysis in SEM is performed by measuring the energy and intensity distribution of the x-ray signal generated by a focused electron beam [13]. Ideally, quantitative microanalysis would be the best choice to

determine the crystal composition, but in this case it was not possible to perform an accurate and precise determination due to calibration difficulties. In any case, some qualitative conclusions can be obtained from the EDS data.

Qualitative analyses were performed in a comparative fashion, by positioning the electron beam over the crystal sample (signal sample; S_a) and over a region sufficiently

Fig. 4 Energy dispersive x-ray spectrometry (EDS) of the crystal sample. (A) EDS spectra obtained with the beam focused at point 1 (S_a) in the crystal sample (in detail at the top). (B) Beam focused at point 2 (S_b) for background signals. The inset shows the SEM image of the crystal sample, showing the location where the beam was focused



distant (signal blank; S_b). High-intensity peaks for oxygen, at ~ 0.5 keV, can be observed for both position S_a and position S_b (Fig. 4). The observed peak at S_b is due to the high oxygen content of the substrate. The greater intensity at S_a indicates that oxygen can be found in the crystal structure. It is worth noting the peaks for calcium (3.8 and 4.0 keV) and carbon (~ 0.2 keV). The high intensity of these peaks at S_a is strong evidence that calcium takes part in the composition of the crystal. Additionally, the presence of carbon suggests an anion containing this element: one can note the intensity of the carbon peak compared to the background. The presence of calcium in the background signal is due to the substrate composition. On the other hand, the small signal for carbon at S_b is due to the vapor deposition of this element during the sample preparation. The absence of peaks at higher energies (>5 keV) indicates that the lower-energy region, ranging up to 1 keV, does not suffer from interferences of heavier elements.

Some peaks appear with intensities closer to the operational limit of the instrument (background noise) and should not be considered for the purpose of qualitative analysis (Fig. 4). In this way, peaks attributed to Al, K, Na, and S were discarded. Again, the presence of traces of Al is probably due to the emission of X-rays from the atoms

present in the construction of the microscope chamber. Beyond this, the electron beam has penetration greater than the sample dimensions, leading to the measurement of elements present on the supporting substrate. In this work the support was made by common glass slides, which are composed of silica (SiO_2) and silicates of alkaline and alkaline earth metals (essentially Na, Mg, and Ca). For silicon, x-rays generated at both position S_a and position S_b showed intensities of 21546 and 41137, respectively, which confirms that the silicon signal is due to the glass substrate. The beam penetration into the supporting substrate is less at position S_a , because the beam must pass through the crystal, which lowers the intensity at this point.

The possibility exists that the samples were formed by calcium carbonate, which has the same composition. However, this compound crystallizes as very small spheres, which were not observed in our analysis. In contrast, COCs are known to present pyramidal shapes, as a consequence of growing in the tetragonal system (weddelite; dihydrated $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). This structure was observed in our samples (Figs. 2 and 3).

The formation of COCs by basidiomycetes is not unusual and had been registered in the nonpathogenic fungi *Agaricus bisporus* and *Gaeastrum saccatum* [31, 32]. Moreover, many phytopathogenic filamentous fungi, such

Fig. 5 Alignment of the amino acid sequence of predicted *Moniliophthora perniciosa* oxaloacetate acetylhydrolase (OAH; Gene Bank accession number EU179870) with the homologous *Coprinopsis cinerea* (Gene Bank accession number EAU91265; e-value, 0), *Botryotinia fuckeliana* (Gene Bank accession number AAS99938; e-value, $2e^{-43}$), and *Aspergillus niger* (Gene Bank accession number ABD78720; e-value, $2e^{-40}$). Activity of the enzyme was experimentally confirmed for the species *A. niger* and *B. fuckeliana*

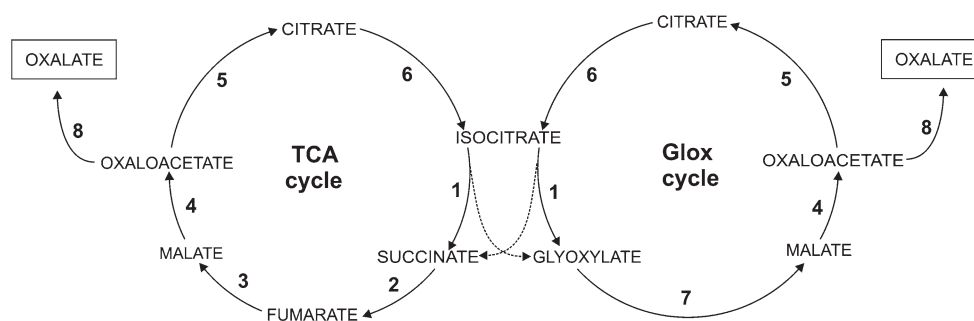
Moniliophthora	HRKGPVDLTCLRRGNFGKILSANGKFLGERPFNGTRQFFCPVKENWVFLFKKFSMAPN	60
Coprinopsis	-----MSP-	3
Botryotinia	-----	
Aspergillus	-----	
Moniliophthora	LHHKGPSSVFVLGPGMGRIRNPHLQFVKSILKAMIFIPNFRSNLSSHFTQLTFSTDLSS	120
Coprinopsis	-----SIDFFPHIEEASSSAPSFMVSIPKDD	31
Botryotinia	-----MPAYSDKVMLTFNNTVKQTGFES	24
Aspergillus	-----MSASEVPYPFQFDSLRTHEPGVGPDGTTQD	31
	*	
Moniliophthora	QPIRRHGTRTRLPLRRKRCRQRSELCDRGSSADPGSQCLLPSSGPE-ELSRGASLRPLD	179
Coprinopsis	APDAFRDTPSPSPS---PTLPTTSLDGVYNNARLDPNKFLHGPLSPN-PATR---LRQML	84
Botryotinia	GATKLN-----MLRDSNELIVCPGVYDG-----	48
Aspergillus	VTVKLPNVRGRIPI-----LQASRLRTMMLEAHGDPNKILAHACSYDG-----	74
	 : : : . :	
Moniliophthora	KTSSDACSPWYCRTNFLPFFFFFLQHLMSRLSGRSWYLYQCPMRSRSLMSLPKVKTY	239
Coprinopsis	ARPGIVVAPGICDG-----ISAR-----CAIEAG-----	108
Botryotinia	-----ISAR-----VALQVG-----	58
Aspergillus	-----LSSR-----LVEEAG-----	84
	:*.* .	
Moniliophthora	RPAFSWHTNLLNSGAATTASRLGQPDIAIATMNDFAEVRSSHGTFSLTQSFPAQVMVSS	299
Coprinopsis	-----FTCLYQSGAATTASRLGQPDIAIATLNDVFG-----AAQMVCS	146
Botryotinia	-----FPALYMTGAGTTASRLGMADLGIAQLSDMKD-----HAEMIAN	96
Aspergillus	-----FPMVFLAGYAVASS-YGLPDTGYIAMAEMCD-----KIRDA	119
	. . : :* . . : * * . * . : : : : :	
Moniliophthora	LDPS-VPVIADADTGEATLLIDINSSLMPOFTSRFGGPANVARTVKTYARAGIAGLHIED	358
Coprinopsis	LDPT-MPVIADADTG-----FGGPAMIARTVTQYARAGVAALHIED	186
Botryotinia	LDPYGPPLIADMDTG-----YGGPLIIDKAVKSYIRAGVAGFHIED	137
Aspergillus	VRQSVVPVMADGDTG-----YGSPLNVKRTVESFAAGAAGVMIED	160
	: : * : * * * : * . * : : * : * * . . * * *	
Moniliophthora	QVQTKRCGHLMGKQVVSREEFLTRIRAAVLARDSIPGGSDFVIIIGRTDSAQVLLVLLIEKS	418
Coprinopsis	QVQTKRCGHLGKQVVSREDFVTRVRAAVLARDSIPGGSDFVIIARTDSAQVL-----	239
Botryotinia	QIQNKRCGHLQGKVVPAEEYYMRIRAAKAAKEAMN--SDIVLIARTDALQQL-----	188
Aspergillus	QQWPKRCGHTKGKSVVSREEAFARIKACDAR--NQGLDIFILARTDALIHG-----	210
	* * * * * * * . . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Moniliophthora	PDIFSSLLRGMDEAITRLKLAAGADVCFIEGVRSKELLESTVQALAPTPLVNVISGG	478
Coprinopsis	-----GMEEAVYRLKLAADVADVCFIEGVKTKELLESTVAALAPKPLVNVISGG	290
Botryotinia	-----GYDECIKRLKVAREMGADVGLLEGYTSKEMAAKTVEFAPWPILLNMVENG	239
Aspergillus	-----WDEAMSRAQEFRRLGVDVFEALPDREAMKRCQVEVG-IPIFANIIEGG	259
	: . : * : * . * . : : . * * . . * : * : * : *	
Moniliophthora	LTPPFYTHEAEQMGAKIIISGCSISGI-----	504
Coprinopsis	LTPSFTTLEAEQMGAKIIIFSLVSSVAMVHACRNAMQLLKKTGTFDTSAQGMDPKAFEEV	350
Botryotinia	STPIITTKEAQEMGFRIMIFSFAALAPAYLAIQETFLRLKRDGVGTGPN-LTPKALFDV	298
Aspergillus	KTENLSAKDLAQLGFCAYVPWTLVAAHLRLREALDGLKRSMTVGAPPMLITYDQVCEG	319
	* : : : * :	
Moniliophthora	-----	
Coprinopsis	MGLNEVVEFDAKAGGNAFATI-	371
Botryotinia	CGLKDSIVVDTTAGGAFADGV	320
Aspergillus	VGFNEYDWLEERYKYE-----	335

as *Athelia rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Botrytis cinerea*, produce oxalate during interactions with their hosts [2, 4, 15, 16]. In fungi, oxalate can be synthesized from two possible substrates: oxaloacetate and glyoxylate. Oxaloacetate generated in the tricarboxylic acid cycle and in the glyoxylate cycle is hydrolyzed to oxalate and acetate in a reaction catalyzed by the enzyme oxaloacetate acetylhydrolase (OAH) [19]. Glyoxylate can be oxidized by the enzyme glyoxylate oxidase (GLOX) or dehydrogenized by the enzyme glyoxylate dehydrogenase (GLDH), generating oxalate in both cases [1, 30]. However, it has been reported that the oxaloacetate route is the main one for oxalate synthesis in most fungi [16, 18]. The wood-rotting

basidiomycete *Fomitopsis palustris* shows both GLDH and OAH activities; however, OAH activity is five times higher than GLDH activity, demonstrating that oxalate is mainly produced from oxaloacetate [22].

Most oxalate-producing fungi exhibit only the OAH pathway. *S. sclerotiorum* expressed sequence tag (EST) libraries showed the presence of *oxaloacetate acetylhydrolase (oah)* expressed sequences during their interaction with *Brassica napus* (canola); in contrast, *gldh* and *glox* sequences were not detected [28]. Moreover, deletion of the *oah*-encoding gene in *Aspergillus nidulans* and *Botrytis cinerea* resulted in total loss of oxalate production in both cases [16, 23].

Fig. 6 Possible pathways for oxalate production in *Moniliophthora pernicioso*: (1) Isocitrate lyase; (2) succinate dehydrogenase; (3) fumarase; (4) malate dehydrogenase; (5) citrate sintase; (6) aconitate hydratase; (7) malate synthase; (8) oxaloacetate acetylhydrolase (OAH). TCA, tricarboxylic acid cycle; Glox, glyoxylate cycle



Therefore, since we have found that *M. pernicioso* produces calcium oxalate crystals, we should be able to find genes of this route in its genome. Indeed, we have found a sequence with high similarity to the *Coprinopsis cinerea*, *Botryotinia fuckeliana*, and *Aspergillus niger oah* genes (E-values: $0, 2e^{-43}$, and $2e^{-40}$, respectively) (Fig. 5). Most important, the EST corresponding to this gene was found in a library produced with RNA from in vitro biotrophic-like mycelia; therefore we conclude that *M. pernicioso* presents the gene responsible for the conversion of oxaloacetate to oxalate, and that, probably, this gene is also expressed in the biotrophic phase of the fungus *in planta*. Moreover, inspection of the genome led to the identification of all the enzymes necessary to produce oxaloacetate (Fig. 6). In summary, our data suggest that production of oxalate is a strategy employed in the establishment of WBD.

In fact, the presence of COCs in cacao tissues is observed during the development of WBD. There is an increase in the number of these crystals in infected seedlings, followed by a rapid decrease in the final stages of the disease [3]. High oxalate concentrations are toxic to cells because COC degradation by oxalate oxidase leads to H_2O_2 production. This compound has been found in infected tissues [3] and the germin oxalate oxidase gene has been proved to be expressed under these conditions [12].

Thus, the production of oxalate by *M. pernicioso* leading to the formation of calcium oxalate crystals could contribute to the increase in calcium oxalate contents in cacao tissues, as previously described. In addition, it may play an important role in all fungal stages, from the initial establishment of the fungus in the apoplast (biotrophic phase) to the final stages of WBD, characterized by the necrosis of the broom tissues (saprotrophic phase).

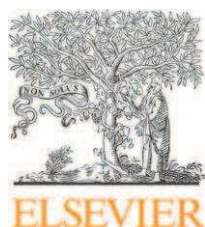
Diseases caused by fungi that produce oxalate have been successfully prevented with the use of transgenic plants expressing oxalate decarboxylase [6, 17]. For cacao, transgenic plants expressing chitinase have recently been obtained [20]. We believe that genes expressing enzymes that degrade oxalate should be tested in order to verify the effect of oxalate production in the progression of WBD.

Acknowledgments This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; No. 472279/2006-8) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; Nos. 06/50794-0, 06/59843-3, and 07/51030-6). The authors would like to thank Daniel Bratfisch Razzo for operation of the scanning electron microscope (JSM 6360 LV), Rafaela F. Camargo for help in preparing fungal samples, Dr. Francisco Javier Medrano for critical suggestions, and Dr. Johana Rincones and Dr. Carol H. Collins for manuscript revision.

References

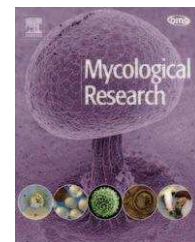
1. Akamatsu Y, Ohta A, Takahashi M, et al. (1991) Enzymatic formation of oxalate from oxaloacetate with cell-free-extracts of the brown-rot fungus *Tyromyces palustris* in relation to the biodegradation of cellulose. *Mokuzai Gakkaishi* 37:575–577
2. Bateman DF, Beer SV (1965) Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 55:204
3. Ceita GO, Macêdo JNA, Santos TB, et al. (2007) Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora pernicioso*. *Plant Sci* 173:106–117
4. Cessna SG, Sears VE, Dickman MB, et al. (2000) Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell* 12:2191–2199
5. Delgado JC, Cook AA (1976) Nuclear condition of basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius perniciosus*. *Can J Bot* 54:66–72
6. Dias BBA, Cunha WG, Morais LS, et al. (2006) Expression of an oxalate decarboxylase gene from *Flammulina* sp. in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) plants and resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathol* 55:187–193
7. Dutton MV, Evans CS (1996) Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can J Microbiol* 42:881–895
8. Evans HC (1980) Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches broom disease of cocoa. *Trans Br Mycol Soc* 74:515–523
9. Evans HC, Bastos CN (1980) Basidiospore germination as a means of assessing resistance to *Crinipellis pernicioso* (Witches Broom Disease) in cocoa cultivars. *Trans Bri Mycol Soc* 74:525–536
10. Franceschi V (2001) Calcium oxalate in plants. *Trends Plant Sci* 6:331–331
11. Garcia O, Macedo JA, Tiburcio R, et al. (2007) Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycol Res* 111:443–455
12. Gesteira A, Micheli F, Carels N, et al. (2007) Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora pernicioso*. *Ann Bot* 100:129–140

13. Goldstein J, Newbury D, Joy D, et al. (2003) Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. Vol 3. Springer Science+Business Media, New York
14. Griffith GW, Nicholson J, Nenninger A, et al. (2003) Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *New Zeal J Bot* 41:423–435
15. Guimaraes RL, Stotz HU (2004) Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiol* 136:3703–3711
16. Han Y, Joosten HJ, Niu WL, et al. (2007) Oxaloacetate hydrolase, the C-C bond lyase of oxalate secreting fungi. *J Biol Chem* 282:9581–9590
17. Kesarwani M, Azam M, Natarajan K, et al. (2000) Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*—molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. *J Biol Chem* 275:7230–7238
18. Kubicek CP, Schreierlunke G, Wohrer W, et al. (1988) Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* 54:633–637
19. Lenz H, Wunderwald P, Eggerer H (1976) Partial purification and some properties of oxalacetase from *Aspergillus niger*. *Eur J Biochem* 65:225–236
20. Maximova SN, Marelli JP, Young A, et al. (2006) Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Planta* 224:740–749
21. Meinhardt LW, Bellato CD, Tsai SM (2001) SYBR (R) Green I used to evaluate the nuclei number of fungal mycelia. *Biotechniques* 31:42–46
22. Munir E, Yoon JJ, Tokimatsu T, et al. (2001) A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11126–11130
23. Pedersen H, Christensen B, Hjort C, et al. (2000) Construction and characterization of an oxalic acid nonproducing strain of *Aspergillus niger*. *Metab Eng* 2:34–41
24. Pennman D, Britton G, Hardwick K, et al. (2000) Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches broom disease of cocoa. *Mycol Res* 104:671–675
25. Purdy LH, Schmidt RA (1996) Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annu Rev Phytopathol* 34:573–594
26. Rincones J, Meinhardt LW, Vidal BC, et al. (2003) Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycol Res* 107:452–458
27. Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, et al. (2005) Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *J Exp Bot* 56:865–877
28. Sexton AC, Cozijnsen AJ, Keniry A, et al. (2006) Comparison of transcription of multiple genes at three developmental stages of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiol Lett* 258:150–160
29. Silva SDVM, Matsuoka K (1999) Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacaueiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. *Fitopat Bras* 24:54–59
30. Tokimatsu T, Nagai Y, Hattori T, et al. (1998) Purification and characteristics of a novel cytochrome c dependent glyoxylate dehydrogenase from a wood-destroying fungus *Tyromyces palustris*. *FEBS Lett* 437:117–121
31. Whitney KD, Arnott HJ (1986) Calcium oxalate crystals and basidiocarp dehiscence in *Gaeumannomyces saccatum* (Gasteromycetes). *Mycologia* 78:649–656
32. Whitney KD, Arnott HJ (1987) Calcium oxalate crystal morphology and development in *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 79:180–187



British Mycological
Society promoting fungal science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mycres



The mitochondrial genome of the phytopathogenic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* is 109 kb in size and contains a stable integrated plasmid

Eduardo F. FORMIGHIERI^a, Ricardo A. TIBURCIO^a, Eduardo D. ARMAS^b, Francisco J. MEDRANO^a, Hugo SHIMO^a, Nicolas CARELS^c, Aristóteles GÓES-NETO^d, Carolina COTOMACCI^a, Marcelo F. CARAZZOLLE^a, Naiara SARDINHA-PINTO^a, Daniela P. T. THOMAZELLA^a, Johana RINCONES^a, Luciano DIGIAMPIETRI^e, Dirce M. CARRARO^f, Ana M. AZEREDO-ESPIN^g, Sérgio F. REIS^h, Ana C. DECKMANN^a, Karina GRAMACHOⁱ, Marilda S. GONÇALVES^j, José P. MOURA NETO^j, Luciana V. BARBOSA^k, Lyndel W. MEINHARDT^l, Júlio C. M. CASCARDO^m, Gonçalo A. G. PEREIRA^{a,*}

^aLaboratório de Genômica e Expressão – Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas – SP, Brazil

^bLaboratório de Ecotoxicologia, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 13400-970, Piracicaba – SP, Brazil

^cLaboratório de Bioinformática da Universidade Estadual de Santa Cruz, 45650-000, Ilhéus – BA, Brazil

^dLaboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), 44031-460, Feira de Santana – BA, Brazil

^eInstituto de Computação, Universidade Estadual de Campinas, 13084-971, Campinas – SP, Brazil

^fLudwig Institute For Cancer Research, 01509-010, São Paulo – SP, Brazil

^gDepartamento de Genética e Evolução e Laboratório de Genética Animal, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG, Universidade Estadual de Campinas, 13035-875, Campinas – SP, Brazil

^hDepartamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas – SP, Brazil

ⁱCEPLAC/CEPEC/SEFIT, 45600-970, Itabuna – BA, Brazil

^jLaboratório de Biologia Molecular – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170-290, Salvador – BA, Brazil

^kLaboratório de Biologia Molecular – Departamento de Biologia Geral, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, 40170-290, Salvador – BA, Brazil

^lSustainable Perennial Crops Laboratory, USDA-ARS, 10300 Baltimore, Av., BARC-W, Beltsville, MD 20740, USA

^mDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, 45650-000, Ilhéus – BA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 October 2007

Received in revised form

19 March 2008

Accepted 24 April 2008

Corresponding Editor:

Gareth W. Griffith

ABSTRACT

We present here the sequence of the mitochondrial genome of the basidiomycete phytopathogenic hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*, causal agent of the Witches' Broom Disease in *Theobroma cacao*. The DNA is a circular molecule of 109 103 base pairs, with 31.9 % GC, and is the largest sequenced so far. This size is due essentially to the presence of numerous non-conserved hypothetical ORFs. It contains the 14 genes coding for proteins involved in the oxidative phosphorylation, the two rRNA genes, one ORF coding for a ribosomal protein (*rps3*), and a set of 26 tRNA genes that recognize codons for all

* Corresponding author. Tel.: +55 19 35216650.

E-mail address: goncalo@unicamp.br

0953-7562/\$ – see front matter © 2008 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.mycres.2008.04.014

Keywords:

Basidiomycota

Codon usage

Crinipellis perniciosa

Genomics

Marasmiaceae

Witches' broom disease

amino acids. Seven homing endonucleases are located inside introns. Except *atp8*, all conserved known genes are in the same orientation. Phylogenetic analysis based on the *cox* genes agrees with the commonly accepted fungal taxonomy. An uncommon feature of this mitochondrial genome is the presence of a region that contains a set of four, relatively small, nested, inverted repeats enclosing two genes coding for polymerases with an inverted-type structure and three conserved hypothetical genes interpreted as the stable integration of a mitochondrial linear plasmid. The integration of this plasmid seems to be a recent evolutionary event that could have implications in fungal biology. This sequence is available under GenBank accession number AY376688.

© 2008 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Moniliophthora perniciosa is the causal agent of witches' broom disease (WBD) in cacao (*Theobroma cacao*). This fungus is a basidiomycete previously classified as *Crinipellis perniciosa*, and recently, it was reclassified due to its close relation to *Moniliophthora roreri* (Aime & Phillips-Mora 2005; Evans *et al.* 2002), the causal agent of frosty pod rot (FPR) in cacao. These two represent the two most devastating cacao diseases in the Americas. *M. perniciosa* presents a hemibiotrophic life style, with differentiated mycelia in each phase. The biotrophic mycelia are mononucleated, grow very slowly and colonize the intercellular spaces (apoplast) of the infected plant tissue. This phase is difficult to obtain in the laboratory, but recently we have characterized the conditions for its *ex planta* growth (Meinhardt *et al.* 2006). The saprophytic mycelia are dikaryotic with clamp connections and grow vigorously in axenic cultures.

Due to the economical importance, our group is involved in the study of the complex biology of the hemibiotrophic fungus *M. perniciosa* (Garcia *et al.* 2007; Meinhardt *et al.* 2006; Rincones *et al.* 2003; Rincones *et al.* 2006; Rincones *et al.* in press; Rio *et al.* 2008; Scarpari *et al.* 2005). Included in this investigation is a genome project (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>), and during the course of the sequencing we obtained the complete mitochondrial genome.

Besides *M. perniciosa*, 49 fungal mitochondrial genomes have been completely sequenced and annotated to date (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/futashort.html>). These genomes encompass species from all phyla. Despite the importance of the Basidiomycota, only five mitochondrial genomes from this group have been studied.

Mitochondria are generally accepted as vestigial endosymbiotic proteobacterial ancestors (Gray *et al.* 1999; Lang *et al.* 1999), and they can evolve faster than nuclear DNA (Burger *et al.* 2003; Burger & Lang 2003; Nosek & Tomaska 2003). The relationship between mitochondria and the nucleus has evolved over time and several mitochondrial genes encoding proteins for mitochondrial metabolism have been transferred to the nuclear genome (Adams & Palmer 2003; Burger *et al.* 2003; Dimmer & Rapaport 2008). Fungal mitochondrial genomes are smaller than those of plants, but larger than animal mitochondrial genomes (Burger *et al.* 2003). The gene content of the typical fungal mitochondrial genome is greatly reduced (ca 30–40 genes) in comparison to the genomes of bacteria and the mitochondrial genomes of other eukaryotes. Some conserved characteristics of mitochondrial genomes

are the high A + T content, lack of methylation, conservation of the gene function, and high copy number (Campbell *et al.* 1999).

Fungal mitochondrial genomes vary greatly in size, show different topology, and even in the use of the genetic code among species (Gray *et al.* 1999). The number of genes can fluctuate enormously from three to 67 for protein encoding genes and from seven to 27 for tRNAs (Adams & Palmer 2003). They usually contain 14 genes encoding hydrophobic subunits of respiratory chain complexes, two genes for the large and small ribosomal subunits and a set of tRNAs (Gray *et al.* 1999). Differences in length and organization of the intergenic regions, differences in intron content (from 0 to 30) and size (ranging from 0.15 to 4 kb), unidentified ORFs, and the presence of plasmids contribute significantly to the size variability of the genomes among species (Bertrand 2000; Burger *et al.* 2003; Clark-Walker 1992; Hur *et al.* 1997). Also, there is no apparent correlation between size and gene content in the mitochondrial genomes (Burger *et al.* 2003).

The shortage of reliable morphological and ultrastructural characters is a challenge in the taxonomic classification of fungi. However, in recent years the use of mitochondrial sequence data of proteins involved in essential processes conserved throughout evolution have been used routinely to build phylogenetic trees for the characterization of the origin and evolution of fungal organisms (Bullerwell *et al.* 2003; Bullerwell & Lang 2005; Seif *et al.* 2005). Therefore, more complete mtDNA sequences from Basidiomycota may provide insights to the origin and evolution of fungal mitochondria.

Plasmids have been found in many different fungi (Griffiths 1995; Kempken 1995a; Meinhardt *et al.* 1990, 1997). All of the plasmids found in these fungi are mitochondrial with the possible exception of the *Alternaria* plasmids (Shepherd 1992). Plasmids are of two types, circular and linear. In *Neurospora* spp., both circular and linear types are found. The plasmids of *Absidia glauca* are circular (Haenfler *et al.* 1992) and all the remaining examples are linear. Some features are common to almost all of the mitochondrial linear plasmids, namely: (1) terminal inverted repeats; (2) proteins covalently attached to the 5' termini; and (3) open reading frames (ORFs) for viral-like RNA and DNA polymerases (Meinhardt *et al.* 1990, 1997). Thus, these linear plasmids in filamentous fungi are thought to be descended from a common ancestor. However, horizontal transfer of a linear plasmid in Ascomycota is also shown (Kempken 1995b).

Although in most cases no function has been assigned for these elements, in some species of filamentous fungi their

presence and activity interferes with the growth of mycelia (Bertrand et al. 1985, 1986). In *Neurospora* spp. insertion of the plasmid DNA into the mitochondrial genome results to the disruption of several genes leading to senescence and death due to defective respiration (Bertrand 2000; Griffiths 1992, 1998; Rieck et al. 1982). Conversely, in *Podospora anserina* strain AL2 and in the slime mould *Physarum polycephalum*, which are species that normally senesce, insertion of the plasmids into the mtDNA has been correlated with an increased life-span (Hermanns et al. 1994; Maas et al. 2007; Nakagawa et al. 1998). Among *Basidiomycota*, invertron-like DNA plasmids have been completely sequenced in *Agaricus bitorquis* (Robison & Horgen 1999), *Flammulina velutipes* (Nakai et al. 2000), and *Pleurotus ostreatus* (Kim et al. 2000), but no specific function has been associated with their presence in these hosts.

The present work is a comprehensive study of the *M. pernicioso* mitochondrial genome. We describe its organization, gene content, and order, together with a comparative and phylogenetic analysis with other sequenced mitochondrial genomes. We provide evidence for the presence of potentially new mitochondrial genes and for the evolution of the mitochondrial genome by the stable integration of a linear mitochondrial plasmid.

Material and methods

Fungal isolate, library construction and sequence assembly

Total DNA was extracted from strain CP02 of *Moniliophthora pernicioso*, as described previously (Rincones et al. 2003). We observed a relation between the integrity of the isolated DNA and the age of the culture used for the extraction (the older the plate, the worst the quality of the DNA). For that reason, a total of 50 genomic libraries were constructed using DNA isolated from young and old mycelia. Fragments ranging in size from 1–2 and 2–4 kbp were obtained from total DNA by sonication or nebulization (Surzcki 2000), and then cloned into the *Sma*I site of pUC18 or pCR4Blunt (TOPO Shotgun Subcloning kit, Invitrogen - Life Technologies, São Paulo, Brasil). Each library corresponded to independent cloning events using DNA obtained from individually growing cultures of CP02. The inserts were sequenced and analysed following the whole genome shotgun (WGS) approach (Venter et al. 1998).

Reads were assembled using the software package Phred/Phrap/Consed (Ewing & Green 1998; Ewing et al. 1998; Gordon et al. 1998) and the accuracy of the assembly was confirmed with the program CAP3 (Huang & Madan 1999).

All isolates used in this study can be obtained from the Laboratório de Genômica e Expressão at UNICAMP, as well as further information concerning the collection data.

Gene annotation

For the sake of clarity, we have defined the ORFs found in the mitochondrial genome as follows: (1) conserved known genes, as those normally present in mitochondrial genomes with known function; (2) conserved hypothetical ORFs, as those ORFs present also in other mitochondrial genomes, but without a defined function; and (3) non-conserved hypothetical

ORFs, as those ORFs that do not overlap with conserved known genes or conserved hypothetical ORFs, and coding for products with minimum size compatible with the smallest conserved known genes (*atp8* has 52 aa, *atp9* has 73 aa and *nad4L* has 87 aa).

Conserved known genes have been named as their counterparts in other genomes. Intronic conserved hypothetical ORFs have been named as *oi#gene*. Intronic non-conserved hypothetical ORFs have been named as *oBi#gene*. Conserved hypothetical ORFs located in the plasmid region have been named *hypP#*. Non-conserved hypothetical ORFs have been named as *hyp#*. Here # represents a number and gene is the name of the gene where it is located.

Conserved known genes and conserved hypothetical ORFs were detected by similarity searches for known genes and ORFs present in other fungal mitochondrial genomes using BLAST (Altschul et al. 1990). Non-conserved hypothetical ORFs were detected using ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/>).

Regions coding for tRNAs were identified with the program tRNAscan-SE (Lowe & Eddy 1997). The rRNAs sequences were identified by comparison with homologous *Basidiomycota* counterparts. Repeats were analysed using Reputer (Kurtz et al. 2001) and Tandem Repeats Finder (Benson 1999).

Exon/intron boundaries of conserved known genes were identified by comparison and alignment, using BLAST and CLUSTAL (Higgins 1994), with the genes from other fungal mitochondrial genomes.

PCR amplification

Amplification of selected regions of the mitochondrial genome was carried out by PCR. Primers P1 (5'-GCA GGAAGGGATATATAGG-3'), P2 (5'-TTTGAGAGAGCATCAAATCC-3'), P3 (5'-TTTTGAGAG AGCATCAAATCC-3'), and P4 (5'-AA AGAACTGAAATCCGAGG-3') were designed to match regions outside (P1 and P4) and inside (P2 and P3) of the inverted repeats that we did use to define the boundaries of the inserted plasmid (see Results). Total DNA from isolates in Table 2 purified as described above was used for the PCR experiments.

GC content, GC skew, and codon usage

GC content and GC skew (Grigoriev 1998) were calculated using the program Analyse seq (http://ludwig-sun2.unil.ch/~vioannid/TP_module5/18-03/freak2.html). Local GC content was calculated with sliding windows over 5000 bp and 500 bp with a pace of 500 and 50 bp, respectively. Codon usage was analysed using the program CODONW (Peden 1999).

Principal component analysis (PCA)

A matrix presenting the relative use of each codon for each ORF was evaluated by PCA in order to search for patterns of codon usage (Joliffe 1986). These data were submitted to analysis by the method of singular value decomposition of non-centred and non-scaled data matrix by means of the R software (R Development Core Team 2007). The number of principal components to be retained was determined by

scree-plot and the percentage of accumulated variation explained by the components.

Phylogenetic analysis

Protein sequences were aligned using ClustalW (Thompson *et al.* 1994) with default options, except for the use of the JTT substitution matrix (Jones *et al.* 1992). Terminal and internal poorly aligned regions were removed from the alignment before the phylogenetic analysis. Phylogenetic trees were constructed with the program PhyML (Guindon & Gascuel 2003) using the ML method, with JTT substitution matrix and gamma distribution. The value of the shape parameter α used was optimized by the program PhyML. Branch support was tested by BS analysis with 100 resamplings (Felsenstein 1985).

Genes that code for the mitochondrial cytochrome c oxidase (*cox1*, *cox2* and *cox3*), properly annotated, from 50 fungi with complete sequence for the mitochondrial genome were used to build the phylogenetic tree. The optimized value of the shape parameter α was 1.444 for this set of sequences.

Also, the genes *dpoB* and *rpo* from the mitochondrial plasmid from ten species that present a complete invertion structure (both genes in the opposite orientation flanked by inverted repeats) (Griffiths 1995) were used to build a phylogenetic tree. A total of 13 complete plasmids were used in this analysis. Three of the species used present more than one copy of the plasmid (*Neurospora crassa*, *Pleurotus ostreatus*, and *Flammulina velutipes*). Sequences with similarity to *dpoB* or *rpo* not organized with an invertion structure were not included in this analysis. The optimized value of the shape parameter α was 1.549 for this set of sequences.

Comparative genomics

The comparison of the gene content and order of all known mitochondrial genomes of *Basidiomycota* was carried out by visual inspection due to the small number of genomes used, six. All conserved known genes coding for proteins and the rRNAs were designed as boxes linearly as they appear in the genome beginning with the large rRNA (*ml*) in a clockwise direction.

Results

Assembly of the mitochondrial genome

After the initial assembly of 124 565 reads produced in the sequencing of all the libraries a large contig enclosing 5448 reads was generated. This contig was identified as the mitochondrial genome of the fungus by comparison to other fungal mitochondrial genomes. Inclusion of additional reads from new sequencing rounds and a careful assembly resulted in a final contig containing 6920 reads. The consensus sequence corresponded to a circular DNA of 109 103 bp without gaps, regions of low consensus quality, or regions of high-quality discrepancy (Phrap assembly). This corresponded to an approximate coverage of 31 times. The complete mtDNA sequence is available at GenBank (accession number AY376688).

Although most fungal mitochondrial genomes are circular (Torriani *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008; Zivanovic *et al.* 2005), some linear genomes have been reported (Forget *et al.* 2002; Rycovska *et al.* 2004). Due to the programs we use not being able to assemble circular DNAs we have used a different strategy in order to check whether the mitochondrial genome of *M. perniciosa* is linear or circular. The strategy consisted in the masking of unique regions (minimum length of 750 bp) of the genome and new assemblies of all the reads were performed with the exception of the masked region. This was repeated masking different regions independently. If the mitochondrial genome is linear this strategy should render at least two different contigs representing the regions on both sides of the masked region. The result was always one contig comprising all the genome except the masked region; thus indicating that the mitochondrial genome is circular.

Conserved known genes

Fig 1 shows the map of the 119 possible coding regions present in the mitochondrial genome. Seventeen genes were classified as conserved known genes, coding for proteins were identified by comparison with other fungal mitochondrial genomes where the function of those have been described. Fourteen of those are involved in the oxidative and energy metabolism; seven subunits of the NADH dependent dehydrogenases, three cytochrome c oxidases, three F₀ subunits of the ATP synthases and one cytochrome b. One gene, *rps3*, is involved in ribosome assembly (Bullerwell *et al.* 2000). The last two code for polymerases, a DNA-dependent RNA polymerase (*rpo*) and a DNA-directed DNA polymerase (*dpoB*).

Two rRNAs and 26 tRNAs were identified in the mitochondrial genome. These tRNAs are grouped into regions of the genome presenting a relatively high GC content (Fig 3). The location of the tRNAs is shown at the most inner circle in Fig 1, and Table 1 list all the tRNAs anti-codons with its corresponding amino acid.

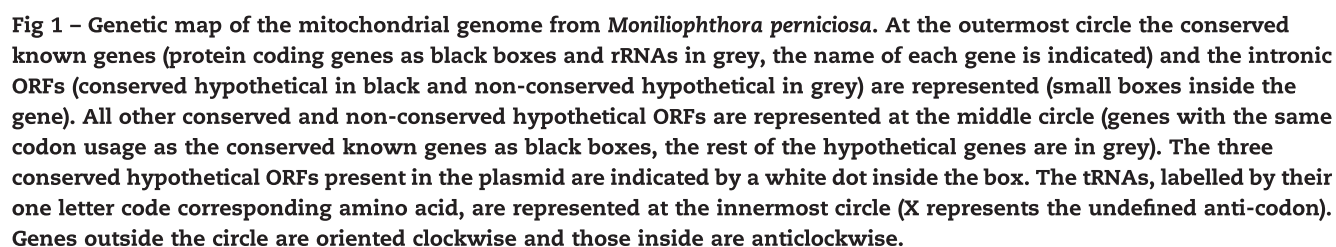
Conserved and non-conserved hypothetical ORFs

Twelve additional putative ORFs have been defined as conserved hypothetical ORFs based on the fact of the existence of similar sequences in other fungal mitochondrial genomes. Three of them are present between a set of inverted repeats together with the genes *dpoB* and *rpo*, and the other nine are intronic ORFs located inside the genes that code for *cox1*, *cob*, *nad4* and *nad5* (Fig 1).

The analysis of the remainder of the sequence with the program ORF Finder located 59 possible non-conserved hypothetical ORFs and three non-conserved intronic ORFs located inside the genes *nad5*, *cob* and *cox2* (Fig 1). One copy of the LAGLIDADG motif was found in one hypothetical ORF, hyp15.

Introns

Twelve introns have been identified: *cox1* has six introns, *cox2* and *cob* have two introns each, and both *nad4* and *nad5* have one intron each (Fig 1). All the six introns in *cox1*, one of the introns in *cob*, and the intron in *nad4* and *nad5* contain one conserved hypothetical ORF each. Besides these conserved



Two different motifs belonging to two types of homing endonucleases have been found in eight of the intronic conserved hypothetical ORFs. Two copies of the LAGLIDADG motif were found in six of them (oi1cox1, oi2cox1, oi4cox1, oi5cox1, oi1nad5, and oi1nad4), and oi1cob presented only one of such motifs (Heath *et al.* 1997). Inside the intronic ORF oi6cox1 one GIY-YIG motif was found (van Roey *et al.* 2001).

The preferential codon usage was calculated from the exon sequences of the conserved known genes (Table 1). At least one tRNA for every amino acid has been identified, and for one of them it was not possible to determine the anti-codon. Most of the codons can be translated with tRNAs present in the mitochondrial genome by the wobble rule (Jukes 1984). There are two codons, AUA and UGA, without the corresponding tRNA.

A significant number of ORFs belonging to group A are oriented in the anticlockwise direction (18 out of 48). The remaining 30 ORFs show a clockwise orientation. Most of the ORFs (38 out of 43) in group B are oriented in the clockwise direction; these include most the known conserved genes (15 out of 17), all of the intronic conserved ORFs (9), two conserved hypothetical ORFs and 12 non-conserved hypothetical ORFs. It is likely that these non-conserved, hypothetical ORFs represent true genes due to the fact that they have the same preferential codon usage and the same clockwise orientation as the conserved known genes. Only five ORFs are found in the

Table 1 – Codon usage in the conserved known genes from the mitochondrial genome

Amino acid	Codon	E	Anti-codon	Amino acid	Codon	E	Anti-codon	Amino acid	Codon	E	Anti-codon	Amino acid	Codon	E	Anti-codon
Phe	UUU	334	(g)aa	Ser	UCU	167	(u)ga	Tyr	UAU	217	(g)ua	Cys	UGU	32	(g)ca
	UUC	96	GAA		UCC	16	(u)ga		UAC	39	GUA		UGC	4	GCA
Leu	UUA	545	UAA		UCA	140	UGA	Ter	UAA	25	*	Trp	UGA	41	-
	UUG	52	(u)aa		UCG	9	(u)ga		UAG	14	*		UGG	21	CCA
	CUU	79	(u)ag	Pro	CCU	109	(u)gg	His	CAU	64	(g)ug	Arg	CGU	1	(u)cg
	CUC	5	(u)ag		CCC	3	(u)gg		CAC	36	GUG		CGC	1	(u)cg
	CUA	72	UAG		CCA	47	UGG	Gln	CAA	111	UUG		CGA	10	UCG
	CUG	21	(u)ag		CCG	3	(u)gg		CAG	14	(u)ug		CGG	1	(u)cg
Ile	AUU	270	(g)au	Thr	ACU	135	(u)gu	Asn	AAU	235	(g)uu	Ser	AGU	114	(g)cg
	AUC	44	GAU		ACC	5	(u)gu		AAC	34	GUU		AGC	19	GCU
	AUA	286	-		ACA	118	UGU	Lys	AAA	184	UUU	Arg	AGA	78	UCU
Met	AUG	102	CAU		ACG	4	(u)gu		AAG	18	(u)uu		AGG	1	(u)cu
Val	GUU	135	(u)ac	Ala	GCU	164	(u)gc	Asp	GAU	119	(g)uc	Gly	GGU	136	(u)cc
	GUC	5	(u)ac		GCC	13	(u)gc		GAC	20	GUC		GGC	9	(u)cc
	GUA	160	UAC		GCA	91	UGC	Glu	GAA	111	UUC		GGA	138	UCC
	GUG	20	(u)ac		GCG	13	(u)gc		GAG	16	(u)uc		GGG	12	(u)cc

The tRNAs that can potentially match codons by the wobble rule are indicated by small caps in parentheses. Missing tRNAs are indicated by a dash, and the stop codons are indicated by asterisks.

anticlockwise direction; two conserved known genes (*atp8* and *dpoB*), one conserved hypothetical ORF (*hypP3*), and two non-conserved hypothetical ORFs. These three hypothetical ORFs are located immediately upstream of the gene *dpoB*. Also, all the tRNAs and the two rRNAs are in the clockwise orientation.

GC content

The mitochondrial genome presents a relatively low GC content (31.9%) in comparison to that of the genomic DNA (47.7%), calculated using all the non-mitochondrial contigs.

Comparing the GC average for positions one (GC1), two (GC2), and three (GC3) of conserved protein coding genes and for all mtDNA (GCm), we found that GC3 was significantly biased towards lower values (supplementary data), which has been observed in protein coding genes in some mitochondrial genomes (Stewart & Beckenbach 2006).

The GC content and the cumulative GC skew of the mitochondrial genome are shown in Fig 3. The GC content (Fig 3, blue and black lines) presents some variation along the mitochondrial genome with three well-defined significant regions. It begins with a content between 35 and 40 %, maintaining this

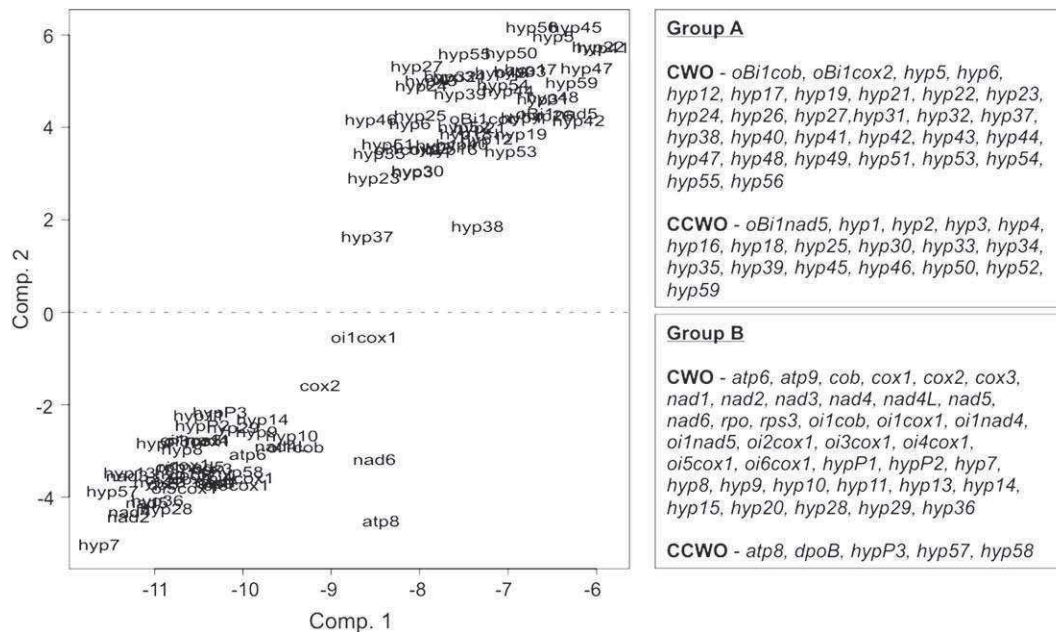


Fig 2 – PCA of codon usage. Left panel shows a plot of the sequence distribution according to codon usage (two-component solution accounting for 78.1 % of the total variance; 65.4 and 12.7 % from components one and two, respectively). Right panel shows the relations of ORFs classified by group and orientation.

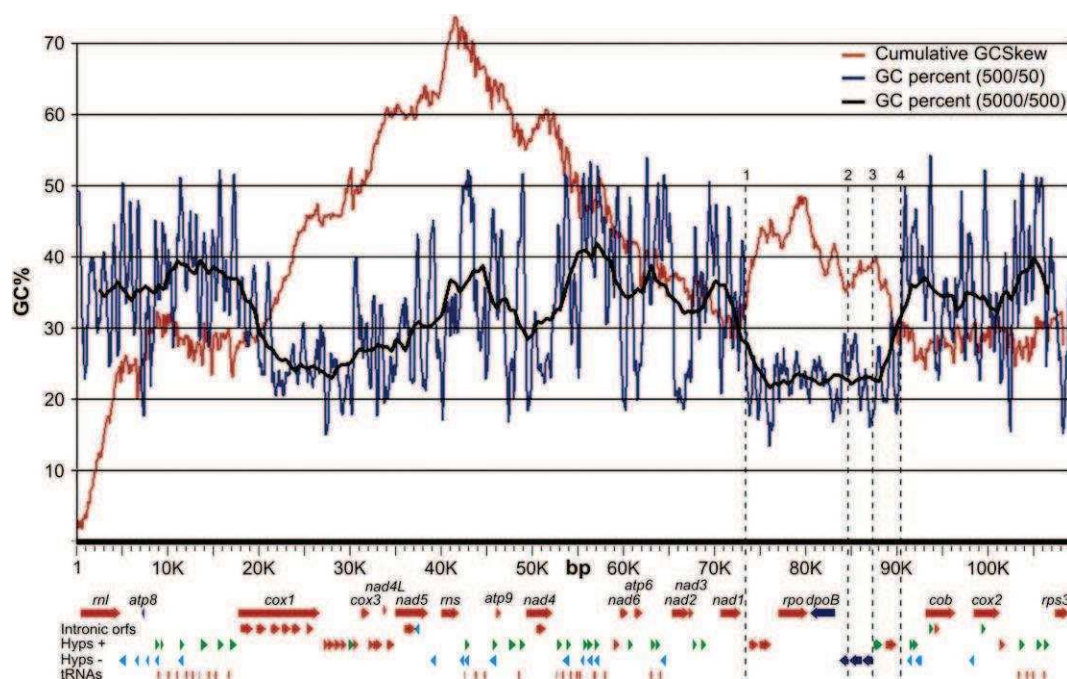


Fig 3 – GC content and GC skew along the mitochondrial genome. Blue and black lines represent the local GC content calculated with windows of 500 and 5000 bp, respectively. Red line represents the cumulative GC skew. The position and orientation of the ORFs is indicated at the bottom of the figure. Dashed lines 1 and 2 represent the position of the large internal repeats, and lines 3 and 4 represent the two groups of non-conserved hypothetical ORFs (*hyp58–hyp57* and *hyp28–hyp29*) with opposite orientation and inside the region of low GC content. The position of the ORFs is represented at the bottom of the figure.

average up till the 19 kbp position where it begins to drop down to around 24 % at the 28 kbp position; then it begins to raise up to around the previous level at the 45 kbp position where it drops again to a minimum at the 50 kbp position just under the 30 % content; then it goes up to its maximum local content just over 40 % between the 55 to the 59 kbp position; then the content goes back to the 35 % average content up to the 71 kbp position where it drops down, for the last time, to its lower value (around 23 %) at the 76 kbp position; it remains at this low value up till the 88 kbp position where it raises again up to an average content of 35 % at the 92 kbp position, and remains around this value till the end.

The cumulative GC skew (Fig 3, red line) raises up to a maximum at the 42 kbp position and then drops down up to the 72 kbp position where it goes up again until generating a new local maximum between the previous position and the 90 kbp position; after this position levels up and its relatively constant up till the end of the sequence.

The most significant feature of this analysis comes from the combined observation of the GC content and the GC skew. The region located between the 73 kbp and the 90 kbp positions (Fig 3, between dotted lines 1 and 4) is characterized by the lowest GC content and a change in the direction of the cumulative GC skew (red line). Also conspicuous is the significant reduction in the noise of the profile of the GC content calculated with the smaller window (500 bp) of this region with respect to the rest of the genome (blue line). This kind of pattern has been interpreted as regions of genome rearrangement (Grigoriev 1998). This region contains nine ORFs and four sets of

inverted repeats. It begins with one set of inverted repeats 347 bp long (Fig 3, dotted line 1), continues with two conserved hypothetical ORFs (*hypP1* and *hypP2*), then a set of inverted repeats 130 bp long followed by *rpo* and *dpoB*, then another set of inverted repeats 130 bp long followed by one conserved hypothetical ORF (*hypP3*), then the last set of inverted repeats (Fig 3, dotted line 2) appears followed by two non-conserved hypothetical ORFs (*hyp58* and *hyp57*) with an anticlockwise orientation (Fig 3, dotted line 3), and then the region ends with two more non-conserved, hypothetical ORFs (*hyp28* and *hyp29*) with a clockwise orientation (Fig 3, dotted line 4). The region delimited by the two bigger sets of inverted repeats that contains the genes *rpo* and *dpoB*, together with three conserved hypothetical ORFs (Fig 3, dotted lines 1 and 2), resembles the structure of a linear plasmid (Griffiths 1995).

The analysis of the GC skew in mammals (Touchon et al. 2005) and bacteria (Arakawa et al. 2007) has proved useful in the determination of putative origin and termini of replication, indicated by a change in the polarity of this index. Despite not having any experimental data about the location of the origin of replication, we are proposing that the putative origin of replication of the mitochondrial genome of *Moniliophthora perniciosa* might be located around position 1 where we have a minimum for the GC skew index (Fig 3).

Integrated plasmid

The analysis of the sequence showed the presence of two genes, *rpo* and *dpoB*, that code for a DNA-dependent RNA

polymerase and a DNA-directed DNA polymerase, respectively. These two genes are not typical mitochondrial genes. They are found in plasmids, and these plasmids can be free in the linear form or integrated into the mitochondrial genome (Griffiths 1995, 1998).

Four sets of inverted repeats were found in the region surrounding these two genes, two small, 130 bp long, and two large, 347 bp long. The organization of this region is described above and shown in Fig 4. Invertron-type plasmids are characterized by large terminal inverted repeats of around 1000 bp (Griffiths 1998), as also found in transposable elements, bacteriophages, and adenoviruses (Sakaguchi 1990). We are proposing the existence of an invertron-type plasmid integrated in the *Moniliophthora perniciosa* mitochondrial genome in the region delimited by the large inverted repeats (347 bp).

The plasmid region presents three conserved, hypothetical ORFs; two of them (*hypP1* and *hypP2*) are located before *rpo* and have the same orientation as this polymerase. The other ORF, *hypP3*, is located after *dpoB* and it has the same orientation as this gene, but opposite to the first three genes (Fig 4A). These two sets of conserved, hypothetical ORFs are located between the large and the small inverted repeats. Four additional, non-conserved, hypothetical ORFs (*hyp58*, *hyp57*, *hyp28*, and *hyp29*) are located after the last large inverted repeat. These ORFs are inside the region of low GC content and with a significant deviation of the GC skew (Fig 3, between dotted lines 2 and 4). The first two (*hyp58* and *hyp57*) have the same orientation as *dpoB*, and the last two (*hyp28* and *hyp29*) have the opposite orientation. A comparison of the protein sequence of these hypothetical ORFs showed that *hypP1*, *hypP3*, and *hyp58* are significantly similar (BlastX e-values: *hypP1* and *hyp58* – $1e-19$ and *hypP1* and *hypP3* – $2e-8$); as it

happens with *hyp57* and *hyp28* (BlastX e-values: *hyp57* and *hyp28* – $7e-15$). The orientation and similarity among these sequences seems to indicate the integration and duplication of the genes present at this location.

In order to check the relationship between the plasmid and the mitochondrial genome, we followed two different strategies. The first one consisted in a careful analysis of the assembly of the sequencing data, and the second one involved an analysis of the sequence by PCR. The analysis of the assembly of the sequencing data did not show any overrepresentation of reads along the whole mtDNA assembly, and more specifically at the plasmid region. In the shotgun strategy used here an overrepresentation of reads is an indication of the presence of a different number of copies of some part of the DNA. This should indicate the presence of independent entities, like plasmids. This is the case of the mitochondrial genome that is overrepresented with respect to the genomic DNA, 31 versus 2.5 times, respectively. Another indication of the existence of a separate plasmid would be the abrupt interruption of the reads at the ends of free plasmids, but this situation was not detected. This *in silico* analysis is a strong indication that the plasmid did not exist in an independent form. Therefore, it may be stably integrated in the genome.

It is important to note that genomic libraries were constructed from mycelia at different ages, with young and old mycelia. It has been reported that some linear plasmids play a role in fungal aging, normally called senescence, by jumping over the mtDNA presenting different insertion points in the sequence, disrupting this way essential genes (D'Souza *et al.* 2005; Fox & Kennell 2001). If the aging of *M. perniciosa* mycelia is caused by a similar process, we should be able to detect different combinations of mitochondrial and plasmid DNAs

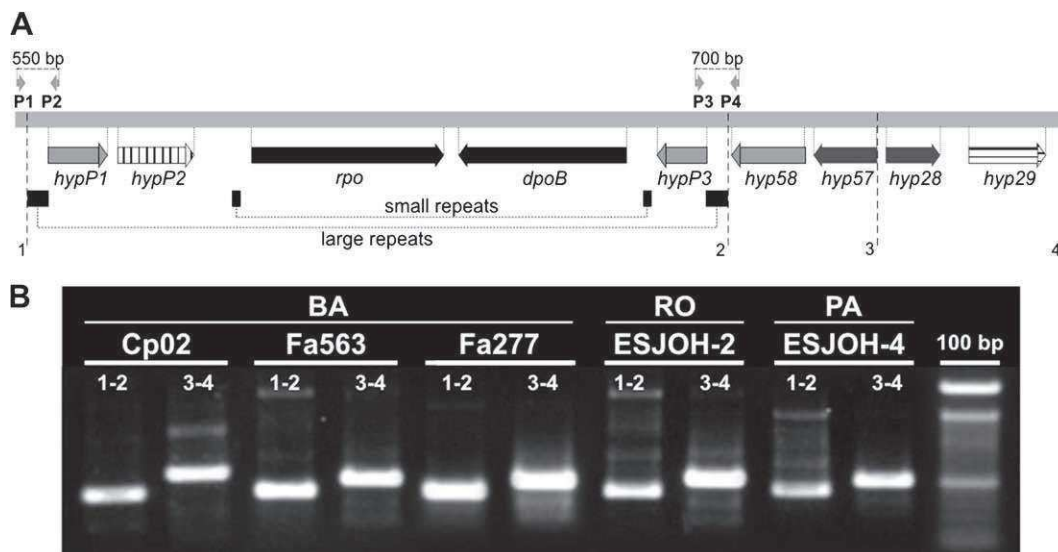


Fig 4 – (A) Genetic map of the plasmid and adjacent regions. Black boxes represent the two polymerases. Conserved hypothetical ORFs, *hypP1* and *hypP3*, together with non-conserved hypothetical ORFs *hyp58* that show significant similarity (BlastX e-values: *hypP1* and *hyp58* – $1e-19$ and *hypP1* and *hypP3* – $2e-8$) are represented by light grey boxes. Non-conserved hypothetical ORFs, *hyp57* and *hyp28*, also show significant similarity (BlastX e-values: *hyp57* and *hyp28* – $7e-15$) are represented by dark grey boxes. Inverted repeats are represented by the small black boxes connected by a line according to its size. The position of the primers P1, P2, P3, and P4 are indicated by the boxes on top, as well as the expected size of the amplification product. **(B)** Analysis of the boundaries of the plasmid region by PCR using primers P1–P2 (1–2) and P3–P4 (3–4). Origin of the samples: BA, Bahia; RO, Roraima; PA, Para. Dashed lines indicate the same regions as in Fig 3.

by misalignments in the assembly. However, such inconsistencies, which would be detected by 'high-quality discrepancies' (Ewing & Green 1998; Ewing et al. 1998), have not been detected and the assembly consistently produced the same consensus sequence. Therefore, we concluded that the plasmid was stably integrated in a defined position in the mtDNA of this isolate.

An experimental approach was also devised in order to further check the integration of the plasmid DNA in other isolates. Four different primers were designed, two of them just outside the plasmid sequence representing sequences belonging to the mtDNA, and the other two inside the boundaries of the region considered as being the plasmid representing sequences at regions outside the larger external inverted repeats. The region to be amplified by these primers encompasses the external repeats that define the boundaries of the plasmid. A representation of the position of the primers and the expected size of the amplified fragment is shown in Fig 4A. In the case of the plasmid being integrated, fragments corresponding to the integration boundaries will be amplified. The results of the PCR analysis performed with five isolates from different regions of Brazil are shown in Fig 4B. The PCR analysis was repeated with further 23 isolates of *M. pernicioso*. The nomination and origin of all isolates used in this study are summarized in Table 2. In all isolates we detected the amplification of the specific region for the combination of primers P1–P2 and P3–P4 indicating the integration of the plasmid into the mitochondrial genome. No positive result with any of the isolates was obtained with the combination of primers P1–P4, which should produce a 1002 bp fragment if the region between the external inverted repeats were not present. Thus, only in the absence of the integrated plasmid will the last combination of primers (P1–P4) render a positive result. The distance between the locations of these primers with the plasmid integrated (11 972 bp) makes it technically impossible to obtain an amplification product in the conditions used here.

Comparative genomics

The inspection of the mitochondrial genomes of *Moniliophthora pernicioso* together with those from other *Basidiomycota* species did not show significant overall synteny of the protein coding genes (Fig 5). However, a more detailed inspection showed that *nad* genes are present as groups (*nad2*–*nad3*, *nad4L*–*nad5*, and *nad4*–*nad6*); there is a tendency to stay together on the genome in the three members of the class *Agaricomycetes* (*Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus*, and *M. pernicioso*).

We compared the mitochondrial genomes of *M. pernicioso* with that of *Podospora anserina* because they are two of the biggest, over 100 kb, described so far (Fig 5). Interestingly, the main reason for the large size of the *P. anserina* mitochondrial genome is the presence of numerous introns (Cumplings et al. 1990), whereas the mitochondrial genome from *M. pernicioso* possesses many non-conserved hypothetical ORFs.

Phylogeny

Phylogenetic trees were built using the three cytochrome oxidase genes (*cox1*, *cox2*, and *cox3*) from 50 fungal species

Table 2 – Isolates of *Moniliophthora pernicioso* with indication of the municipality of collection and institution responsible for this collection (repository) used in the PCR experiments

Isolate	Local of collection	Repository
CP02	Itabuna, BA, Brazil	UESC ^a
CP09	Ilhéus, BA, Brazil	CEPLAC ^b
Belmonte	Belmonte, BA, Brazil	UFB ^c
Ilhéus	Ilhéus, BA, Brazil	UFB ^c
Santo Amaro	Santo Amaro, BA, Brazil	UFB
FA42, FA276, FA277, FA278, FA562, FA563	Itabuna BA, Brazil	FAC ^d
FA281	Aiquara, BA, Brazil	FAC
FA287	Inema, BA, Brazil	FAC ^d
FA293	Gandu, BA, Brazil	FAC
FA300	Ibirataia, BA, Brazil	FAC
FA311	Itagiba, BA, Brazil	FAC
FA317	Ilhéus, BA, Brazil	FAC
BP10	Itapebi, BA, Brazil	FAC
FA551	Tabatinga, AM, Brazil	FAC
ESJOH-1	Marituba, PA, Brazil	ESALQ ^e
ESJOH-2	Ouro Preto, RO, Brazil	ESALQ
ESJOH-3	Belém, PA, Brazil	ESALQ
ESJOH-4	Altamira, PA, Brazil	ESALQ
ESJOH-5	Medicilandia, PA, Brazil	ESALQ
ESJOH-6	Ariquemes, RO, Brazil	ESALQ
ESJOH-7	Manaus, AM, Brazil	ESALQ
ESJOH-8	Ji-Paraná, RO, Brazil	ESALQ
ESJOH-9	Alta Floresta, MT, Brazil	ESALQ

a UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz) Ilhéus, Bahia, collected by Júlio Cascardo.
b CEPLAC (Comissão Executiva do Plano de Lavoura do Cacau) Ilhéus, Bahia, collected by Karina Gramacho.
c UFB (Universidade Federal de Brasília) Brasília, collected by Maricília Arruda.
d FAC (Fazenda Almirante Cacau) Ilhéus, Bahia, collected by Alan Pomella.
e ESALQ - CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura, in Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz") Piracicaba, São Paulo, collected by Paulo Albuquerque (ERJOH – CEPLAC).

independently. The trees obtained for the individual genes were essentially the same, without significant differences. Due to this a new phylogenetic tree was built using the three *cox* genes concatenated. This tree showed the same topology as those built with independent genes, but presented higher BS support for most of the branches, with the exception of some basal branches. Fig 6 shows the rooted phylogenetic tree for this analysis of the three *cox* genes concatenated. The results largely agree with fungal taxonomy and with recent fungal phylogenies (James et al. 2006; Kouvelis et al. 2004).

The unrooted phylogenetic tree built with the polymerase genes from the plasmid using all complete fungal invertron-like plasmids, including kalilo-like plasmids, is shown in Fig 7. There is a clear separation of the plasmid sequences into two major groups. One of them was made up by the kalilo-like plasmids (Fig 7, right), as described by Sakaguchi (1990) and the other by the non-kalilo-like linear plasmids (Fig 7, left). This separation has no correlation with the phylogenetic separation between *Basidiomycota* and *Ascomycota* obtained with the genes encoding proteins of the respiratory

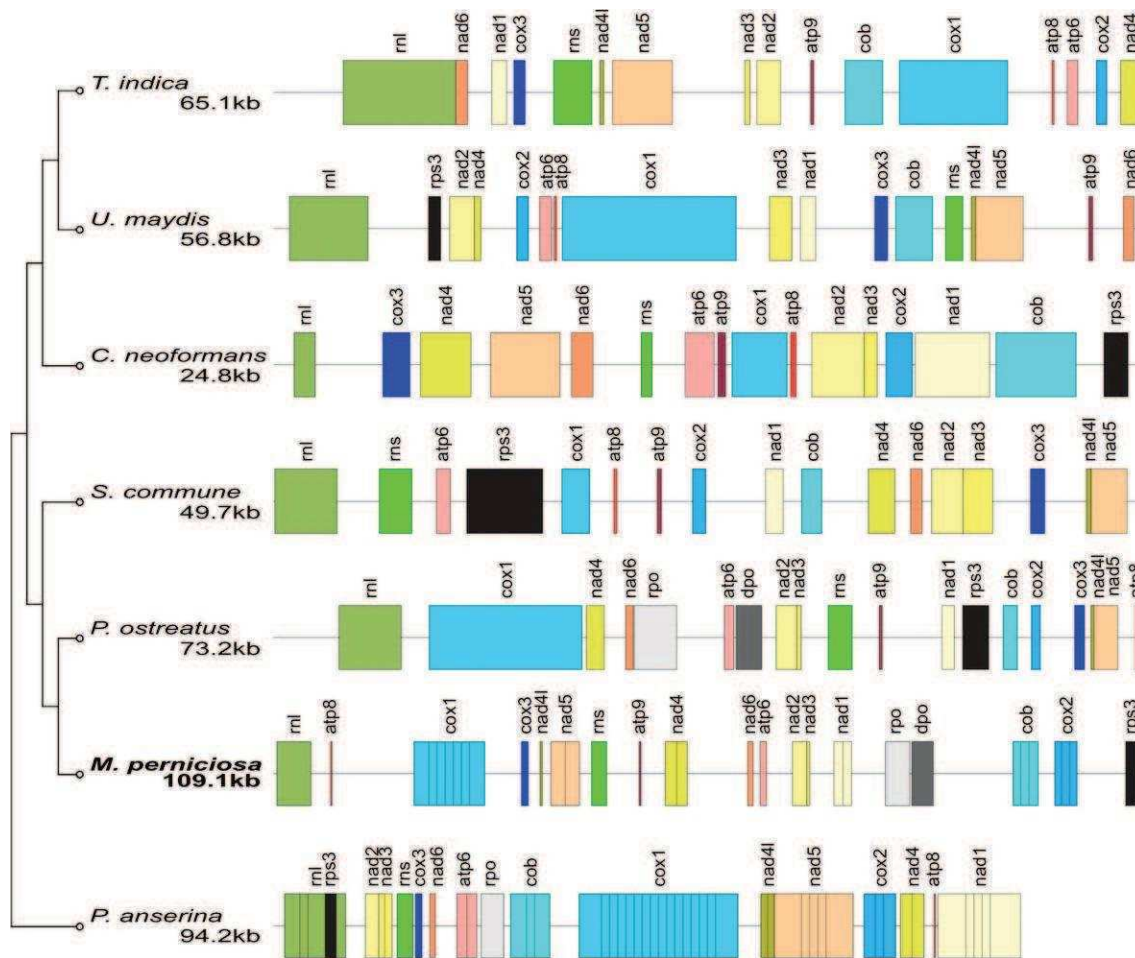


Fig 5 – Comparison of the gene content and order of the known mitochondrial genomes from Basidiomycota and *Podospora anserina*. Genetic maps of the mitochondrial genomes from *Tilletia indica* (NC 009880), *Ustilago maydis* (NC 008368), *Cryptococcus neoformans* (NC 004336), *Schizophyllum commune* (NC 003049), *Pleurotus ostreatus* (NC 009905) and *Moniliophthora perniciosa* (NC 005927). Gene sizes and total mitochondrial genome length are drawn to match the genome of *M. perniciosa*. The mitochondrial genome of *Podospora anserina* (NC 001329) is represented at the bottom drawn proportionally to the genome of *M. perniciosa*, for size comparison.

chain (Fig 6). In this analysis, *M. perniciosa* genes grouped together with the kalilo-like plasmids from other fungi. There are other types of plasmids with a circular topology that preset only one of the polymerases (Griffiths 1995). These plasmids were not used in the phylogenetic analysis. Although they present sequence similarity, they represent non-homologous genes from different types of plasmids with different evolutionary origin (Griffiths 1995).

Morphology of *Moniliophthora perniciosa* in vitro

The germination of *Moniliophthora perniciosa* spores in rich media plates results in the growth of mycelia that presents a smooth, white aspect (Fig 8, left) with a continuous growth rate. After several months and plate passes, around ten, the mycelia begin to change its aspect becoming more rugged with a wave-like growth appearance (Fig 8, right) and the synthesis of a brown pigmentation. We consider the mycelia presented in the left panel of Fig 8 as young, and that in the right

panel as old. This change appears to be irreversible, no regression to the young phenotype has been observed.

The yield of the DNA isolation depends greatly with the age of the mycelia used. Old mycelia render low amounts of material and present a relatively high degree of degradation. In contrast, young mycelia did not seem to show this problem. Another significant fact was that young mycelia had a higher mtDNA content with respect to genomic DNA than old mycelia, as estimated by the number of reads belonging to each class. For this reason we obtained many libraries encompassing different ages of the fungal culture. The consensus sequence obtained from the assembly of the reads belonging to young and old mycelia libraries did not show any difference.

Discussion

The mitochondrial genome of *Moniliophthora perniciosa* (109 103 bp) is the largest fungal mitochondrial genome

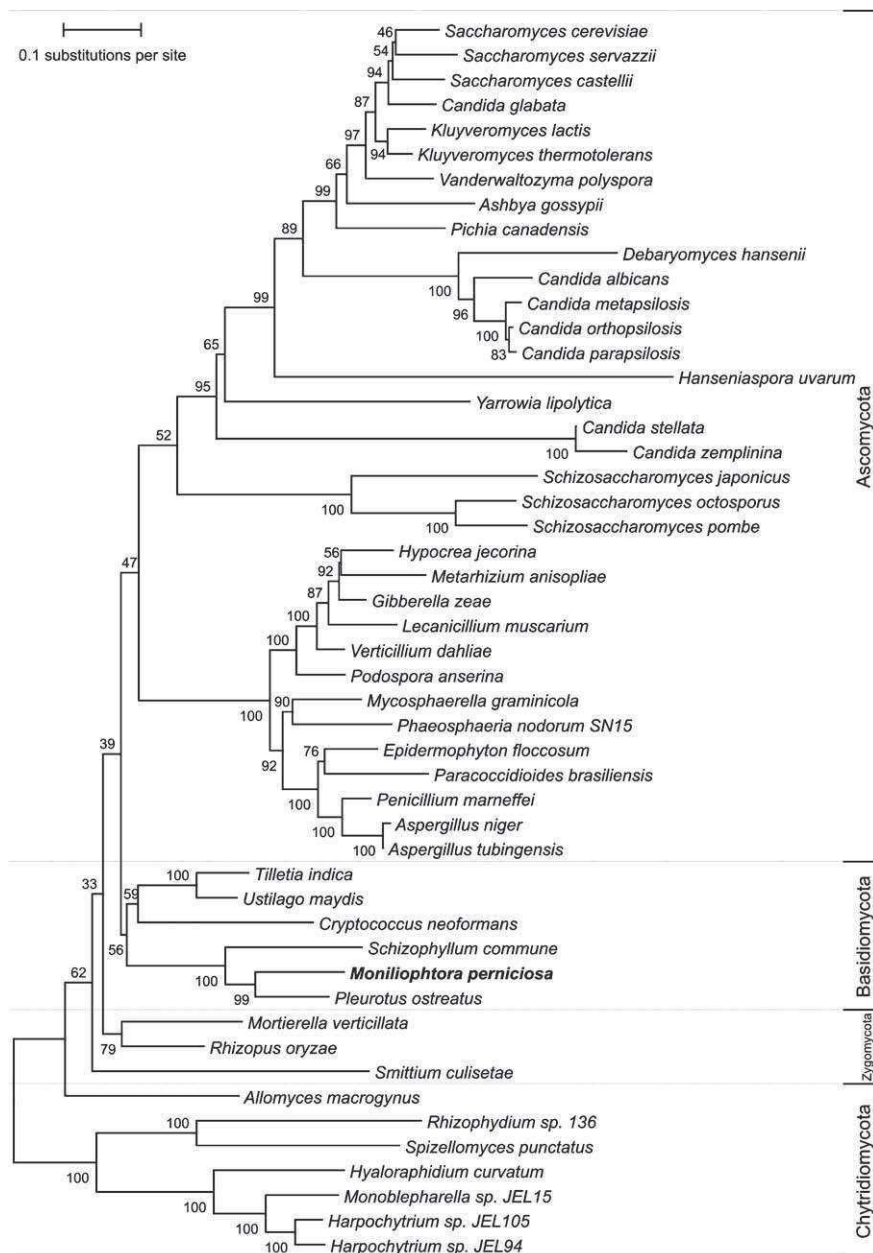


Fig 6 – Phylogenetic tree built from the aligned portions of concatenated protein sequences of cox1, cox2, and cox3. GenBank sequences used from: *Allomyces macrogynus* (NC 001715), *Ashbya gossypii* (NC 005789), *Aspergillus niger* (NC 007445), *A. oryzae* (NC 008282), *A. tubingensis* (NC 007597), *Candida albicans* (NC 002653), *C. glabrata* (NC 004691), *C. metapsilosis* (NC 006971), *C. orthopsilosis* (NC 006972), *C. parapsilosis* (NC 005253), *C. zemplinina* (NC 005972), *C. neoformans* (NC 004336), *Debaryomyces hansenii* (NC 010166), *Epidermophyton floccosum* (NC 007394) *Gibberella zeae* (NC 009493), *Hanseniaspora uvarum* (NC 007780), *Harpochytrium* sp. JEL105 (NC 004623), *Harpochytrium* sp. JEL94 (NC 004760), *Hyaloraphidium curvatum* (NC 003048), *Hypocrea jecorina* (NC 003388), *Kluyveromyces lactis* (NC 006077), *K. thermotolerans* (NC 006626), *Lecanicillium muscarium* (NC 004514), *Metarhizium anisopliae* (NC 008068), *Moniliophthora perniciosa* (NC 005927), *Monoblepharella* sp. JEL15 (NC 004624), *Mortierella verticillata* (NC 006838), *Mycosphaerella graminicola* (NC 010222), *Paracoccidioides brasiliensis* (NC 007935), *Penicillium marneffei* (NC 005256), *Phaeosphaeria nodorum* SN15 (NC 009746), *Pichia canadensis* (NC 001762), *Pleurotus ostreatus* (NC 009905), *Podospora anserina* (NC 001329), *Rhizophydium* sp. 136 (NC 003053), *Rhizopus oryzae* (NC 006836), *Saccharomyces castellii* (NC 003920), *S. cerevisiae* (NC 001224), *S. servazzii* (NC 004918), *Schizophyllum commune* (NC 003049), *Schizosaccharomyces japonicus* (NC 004332), *S. octosporus* (NC 004312), *S. pombe* (NC 001326), *Smittium culisetae* (NC 006837), *Spizellomyces punctatus* (NC 003052), *Tilletia indica* (NC 009880), *Ustilago maydis* (NC 008368), *Vanderwaltozyma polyspora* (NC 009638), *Verticillium dahliae* (NC 003060) and *Yarrowia lipolytica* (NC 002659).

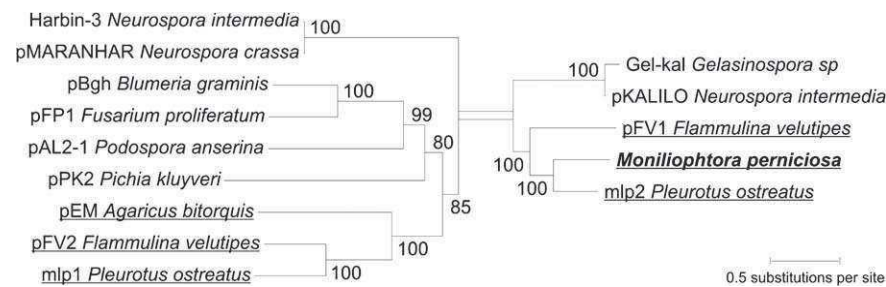


Fig 7 – Phylogenetic tree of the genes encoding polymerases from invertron-like mitochondrial plasmids. GenBank sequences used from: pEM in *Agaricus bitorquis* (AF096908 and X63075), pBgh in *Blumeria graminis* (NC 004935), pFV1 in *Flammulina velutipes* (AB028633), pFV2 in *F. velutipes* (AB028634), pFP1 in *Fusarium proliferatum* (NC 010425), Gel-kal in *Gelasinospora* sp. G114 (L40494), *Moniliophthora perniciosa* (NC 005927), pMARANHAR in *Neurospora crassa* (X55361), Harbin-3 in *N. intermedia* (NC 000843), pKALILO in *N. intermedia* (X52106), pPK2 in *Pichia kluyveri* (Y11606), mlp1 in *Pleurotus ostreatus* (NC 002135), mlp2 in *P. ostreatus* (AF355103) and pAL2-1 in *P. anserina* (X74137). Double line branch indicates a major separation of sequences in two groups: kalilo-like (right) and non-kalilo-like (left). *Basidiomycota* are underlined.

sequenced so far (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/fu.html>), the sixth among *Basidiomycota*, and the third of the class *Agaricomycetes*. To the best of our knowledge, the two members of the genus *Moniliophthora*, *M. perniciosa* and *M. roreri*, are the only ones from this taxonomic class with hemibiotrophic life-styles that also infect the aerial parts of plants. Therefore, the analysis of the sequence adds information to the knowledge of the fungal mitochondrial genomes, more specifically to the *Basidiomycota*, with potential to unveil specific information of this kind of organism.

This genome presents a circular topology, as have most of the fungal mitochondrial genomes sequenced so far. Only five, out of 50, have been described as linear. Also, it is A + T biased, like most other fungi. The tendency of A or T predominance becomes evident by the A/T frequency at the third codon position of the protein coding genes, 88.7 %, which is nearly a neutral position that could normally be occupied by any of the four bases without changing the amino acid identity. An explanation for this bias in the mitochondrial genome proposed by Xia (1996) suggest that, in order to maximize transcriptional efficiency, codon usage will be adapted to the most abundant nucleotide. Due to the high abundance of ATP over the other triphosphate nucleotides, codons ending in A are used more frequently.

All the 14 genes coding for the inner mitochondrial membrane proteins involved in the respiratory chain and the two genes for the rRNAs (*ml* and *ms*) are present in the *M. perniciosa* mitochondrial genome. Also, it contains an ancient gene coding for a ribosomal protein (*rps3*) present in the mitochondrial genome of some *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*, and a few *Chytridiomycota* (Bullerwell *et al.* 2000). These genes make up the standard set of genes found in other fungi.

The size of the fungal mitochondrial genome varies widely, the smallest reported is around 11 kbp from *Hanseniaspora uvarum* (Pramateftaki *et al.* 2006) and the largest is around 121 kbp from *Suillus grisellus* (Bruns & Palmer 1989); and most of them are smaller than 60 kbp (Bullerwell & Lang 2005). It is generally accepted that any variation in

mitochondrial genome size is 'due mainly to the amount of noncoding material, because all mitochondrial DNA code for the same thing: some components of the electron transport chain, some structural RNAs of the mitochondrial ribosomes, and a range of mitochondrial tRNA' (Deacon 2006). The increased size of two of the biggest genomes appears to have different origin (Fig 5). Whereas *P. anserina* has larger sizes and numbers of intronic regions, *M. perniciosa* has bigger intergenic regions between the known conserved genes. In these intergenic regions we were able to find a set of conserved and non-conserved hypothetical ORFs (Fig 1). The existence of the plasmid region also contributes to the increased size of this genome. This region, between the large inverted repeats, represents around 10 % of the total genome.

The analysis of the codon usage by PCA showed that a group of 17 of those ORFs present a similar pattern to that of the known conserved genes (group B in Fig 2). Moreover, 14 of these ORFs are present a clockwise orientation, as most of the known conserved genes. Although little is known regarding transcription and RNA metabolism in non-model organisms, the presence of mitochondrial genes in the same orientation is an indication of the presence of one transcription unit, as transcription in mitochondria is universally accepted as polycistronic (Schäfer *et al.* 2005). Also, these ORFs and the known conserved genes are located in genomic regions not populated by tRNAs (Fig 1); so the protein coding regions are not superimposed by the tRNA coding regions, thus avoiding transcriptional problems. Conversely, the ORF coding for the tRNA without a defined anti-codon is located in a region populated by conserved genes (Fig 1, X at the inner-most circle); this might indicate that the ORF is not real and does not code for anything. Transcription in mitochondria generates big transcripts that are processed with the tRNA regions indicating breaking points (tRNA punctuation model) in order to generate the final mRNAs (Ojala *et al.* 1981).

It is known that there are a large number of proteins in mitochondria, most of them encoded by nuclear genes (Dimmer & Rapaport 2008). Moreover, it is believed that most of these genes migrated from the mitochondrial genome

to the nucleus. Therefore, it is possible that in fungi, which present a large variability in the size and structure of their mitochondrial genomes, some functional genes still remain in the mitochondrial genome contributing to the mitochondrial proteome.

With this information, together with the data presented here, we propose the existence of 17 potential new genes in the mitochondrial genome of *M. perniciosa* coding for proteins without known functions in this fungus. If this assumption is true, it is probable that the sequencing of new fungal mitochondrial genomes will lead to the identification of homologues.

Phylogeny

Concatenated sequences have been used successfully in phylogenetic analysis based on mitochondrial genes (Woo et al. 2003; Kouvelis et al. 2004). The phylogenetic analysis of the known fungal mitochondrial genomes is in accordance with recent studies using mitochondrial genes (Woo et al. 2003; Kouvelis et al. 2004), even considering the limited number of available complete genomes of *Basidiomycota*. Also, it concurs with the same type of analysis performed using genomic genes (James et al. 2006).

The phylogenetic tree built with the polymerase genes present in the plasmid region show a completely different picture. The species segregates into two groups according to the type of plasmid, kalilo-like and non-kalilo-like (Fig 7, right and left, respectively). Both groups have members of the *Ascomycota* and *Basidiomycota* not following the phylogenetic analysis using the *cox* mitochondrial genes (Woo et al. 2003; Kouvelis et al. 2004) or genomic genes (James et al. 2006). The most significant finding is the segregation of the plasmids in two groups. This segregation suggests an ancient duplication of these plasmids, before the separation of *Ascomycota* and *Basidiomycota*, following a separate evolutionary path independently of the host.

Synteny

Fungal mitochondrial genomes do not show an overall high degree of synteny (Kouvelis et al. 2004), in contrast to the metazoan mitochondrial genomes that show the same gene content and order (Boore 1999). Significant synteny has been described for species belonging to the classes *Sordariomycetes* (Kouvelis et al. 2004) and *Eurotiomycetes* (Cardoso et al. 2007). These data indicate that, at least at the level of class, some fungal mitochondrial genomes from *Ascomycota* show significant synteny. In the case of *Basidiomycota*, the number of sequenced mitochondrial genomes is significantly lower, but out of six genomes three of them belong to the class *Agaricomycetes*. The analysis of the content and order of genes did not show an overall synteny in this case, in contrast to what happens in the case of the *Sordariomycetes* and *Eurotiomycetes*, which have clear synteny. Although we have very limited data, they seem to indicate that some groups of *Basidiomycota* are more diverse than some groups of *Ascomycota*.

Conversely, we have recently sequenced the complete mitochondrial genome of *Moniliophthora roreri*, a species very close to *M. perniciosa*. A preliminary analysis showed that, in

this case, all known conserved genes present the same order in the two genomes (result not shown) indicating a high degree of synteny. Taken together, our data indicate that synteny is not a general feature of the *Basidiomycota* mitochondrial genome and that possibly gene order is mixed during speciation.

Mitochondrial plasmid

Many filamentous fungi have mitochondrial plasmids (Griffiths 1995). These plasmids do not appear to have any phenotypic effect on their hosts with a few exceptions (Bertrand 2000; Griffiths 1992). These include the mitochondrial plasmids pKALILo of *Neurospora intermedia* (Bertrand et al. 1985, 1986), pMARANHAR of *N. crassa* (Court et al. 1991), and pAL2-1 of *Podospora anserina* (Maas et al. 2004). These plasmids have a typical invertron structure (with long inverted repeats) and affect the life span of their hosts. *Neurospora* strains normally do not senesce, but those carrying one of the mitochondrial plasmids pKALILo or pMARANHAR die in two to three weeks. This is associated with mitochondrial instability and insertions of the plasmid into the mitochondrial genome (Bertrand et al. 1985, 1986; Myers et al. 1989; Rieck et al. 1982), and for that these mitochondrial plasmids have been named senescence plasmids (Griffiths 1992). In the naturally senescent species *P. anserina*, insertion of pAL2-1 in strain AL2 is correlated with an increased life-span, and therefore, this mitochondrial plasmid has been named life-span-prolonging plasmid (Hermanns et al. 1994). However, this life-span extension requires more than the presence of pAL2-1, as the majority of natural isolates containing pAL2-1 homologous plasmids do not show this effect (van der Gaag et al. 1998). This process seems to be a combination of the insertion of the plasmid and a complex set of mitochondrial DNA rearrangements, including two insertions of the plasmid and a 3.6 kb deletion of the region between the *cytb* and *atp6* genes (Osiewacz et al. 1989; Hermanns & Osiewacz 1992). This process may have stabilized the plasmid sequence as an integral part of a mitochondrial genome, which thereby may have acquired new functions.

We detected possible sequence rearrangements in the neighbourhood of the plasmid region of the *Moniliophthora perniciosa* mitochondrial genome. Typically, the length of inverted repeats found in linear plasmids is around 1000 bp (Griffiths 1998). The plasmid region in *M. perniciosa* shows four sets of inverted repeats, two smaller (130 bp) and two larger (347 bp), and three conserved hypothetical ORFs located between the smaller and the larger repeats (Fig 4A). It seems that these ORFs were inserted inside the inverted repeats disrupting them, creating the new four smaller inverted repeats. Also, four non-conserved, hypothetical ORFs are located just after the last of the larger inverted repeats in the same region of the genome that is defined by its lower GC content and a change in direction of the GC skew (Fig 3). It is interesting to note that two of the conserved hypothetical ORFs, *hypP1* and *hypP3*, present a significant degree of similarity and they are located at the inner part of the extremities of the region delimited by the larger inverted repeats, their coding region starts just inside the inverted repeats, and they present opposite orientation. Also, the non-conserved hypothetical ORFs



Fig 8 – Macroscopic morphology of young (left) and old (right) cultures of *Moniliophthora perniciosa* grown in rich media.

hyp58 shows significant similarity with *hypP1* and *hypP3*. There are two more non-conserved hypothetical ORFs, *hyp57* and *hyp28*, with opposite orientation and significant similarity. The existence of ORFs between the inverted repeats is an indication of an integration-recombination event that took place in this region. We believe that this event disrupted the typical inverted repeats present in linear plasmids, and as a consequence, the plasmid became stably integrated and remained part of the genome. Also, the non-conserved, hypothetical ORFs with significant similarity and opposite orientation indicate the occurrence of such integration-recombination events at this region of the genome.

Some symptoms that characterize fungal ageing are a decrease of growth rate and fertility, a reduction in the formation of aerial hyphae, and an increase in pigmentation. Except for the fertility, which has not been studied, all of the other symptoms have been observed in *M. perniciosa* growing in the laboratory (Fig 8). We are currently studying this process in order to see whether it can be characterized as senescence. Ageing in *Neurospora* is linked to the process of integration-excision of the linear plasmids (Osiewacz *et al.* 1989; Hermanns & Osiewacz 1992). Our sequencing data showed that the plasmid in *M. perniciosa* is stably integrated, thus, the origin of the ageing process observed in this fungal species seems to be different from that provoked by the linear plasmids in *Neurospora*.

The plasmid exists in all the isolates of *M. perniciosa* analysed indicating that it is an integral part of its mitochondrial genome. The GC content and GC skew indicate that the integration of the plasmid is a recent event and that the sequence is not adapted to the rest of the mitochondrial genome, thus maintaining some of its original features. It would be interesting to know the behaviour of the species before the integration of this element in its mitochondrial genome.

In our survey of many isolates of *M. perniciosa* from diverse geographical origins, we consistently found the plasmid integrated in the mitochondrial genome and concluded that this is a feature of the species, mitochondrial genome. Remarkably, a preliminary analysis of the mitochondrial genome of the close species *M. roreri* showed a high degree of similarity between both genomes (a similarity of 57 % for the comparison of *M. roreri* with *M. perniciosa*) but, curiously, the plasmid region was not present (not shown).

Although speculative, we believe that the insertion could confer some evolutionary advantage to the species. If this

was not the case, the insertion would have suffered a negative selection or, as happens in *P. anserina*, we would have two types of isolates: one without the integrated plasmid and one with it in the mitochondrial genome.

In summary, we described in this work the largest basidiomycete mitochondrial genome sequenced so far. This genome has some remarkable features, such as the presence of putative new mitochondrial genes and the stable integration of a complete linear plasmid sequence. We are currently investigating how these elements can contribute to the physiology of this fungus.

Acknowledgements

This research was supported by the Brazilian agencies CNPq (research fellowship to N. C.), Capes, CNPq Regional Genoma Program, SEAGRI and FAPESP (No. 02/09280-1).

REFERENCES

- Adams KL, Palmer JD, 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 380–395.
- Aime MC, Phillips-Mora W, 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97: 1012–1022.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Arakawa K, Saito R, Tomita M, 2007. Noise-reduction filtering for accurate detection of replication termini in bacterial genomes. *FEBS Letters* 581: 253–258.
- Benson G, 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27: 573–580.
- Bertrand H, 2000. Role of mitochondrial DNA in the senescence and hypovirulence of fungi and potential for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology* 38: 397–422.
- Bertrand H, Chan BS, Griffiths AJ, 1985. Insertion of a foreign nucleotide sequence into mitochondrial DNA causes senescence in *Neurospora intermedia*. *Cell* 41: 877–884.
- Bertrand H, Griffiths AJ, Court DA, Cheng CK, 1986. An extra-chromosomal plasmid is the etiological precursor of kalDNA insertion sequences in the mitochondrial chromosome of senescent *Neurospora*. *Cell* 47: 829–837.
- Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27: 1767–1780.
- Bruns TD, Palmer JD, 1989. Evolution of mushroom mitochondrial DNA: *Suillus* and related genera. *Journal of Molecular Evolution* 28: 349–362.
- Bullerwell CE, Burger G, Lang BF, 2000. A novel motif for identifying *rps3* homologs in fungal mitochondrial genomes. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 363–365.
- Bullerwell CE, Forget L, Lang BF, 2003. Evolution of monoblepharidalean fungi based on complete mitochondrial genome sequences. *Nucleic Acids Research* 31: 1614–1623.
- Bullerwell CE, Lang BF, 2005. Fungal evolution: the case of the vanishing mitochondrion. *Current Opinion in Microbiology* 8: 362–369.
- Burger G, Gray MW, Lang BF, 2003. Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends in Genetics* 19: 709–716.

- Burger G, Lang BF, 2003. Parallels in genome evolution in mitochondria and bacterial symbionts. *IUBMB Life* **55**: 205–212.
- Campbell A, Mrazek J, Karlin S, 1999. Genome signature comparisons among prokaryote, plasmid, and mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**: 9184–9189.
- Cardoso MAG, Tambor JHM, Nobrega FG, 2007. The mitochondrial genome from the thermal dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast* **24**: 607–616.
- Clark-Walker GD, 1992. Evolution of mitochondrial genomes in fungi. In: Welstenholme DR, Jeon KW (eds), *Mitochondrial Genomes*. Academic Press, San Diego, pp. 89–127.
- Court DA, Griffiths AJF, Kraus SR, Russel PJ, Bertrand H, 1991. A new senescence inducing mitochondrial linear plasmid in field-isolated *Neurospora crassa* strains from India. *Current Genetics* **19**: 129–137.
- Cummings DJ, McNally KL, Domenico JM, Matsuura ET, 1990. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospora anserina*. *Current Genetics* **17**: 375–402.
- Deacon JW, 2006. *Fungal Biology*, 4th edn. Blackwell Publishing, Oxford.
- Dimmer KS, Rapaport D, 2008. Proteomic view of mitochondrial function. *Genome Biology*. doi:10.1186/gb-2008-9-2-209.
- D'Souza AD, Sultana S, Maheshwari R, 2005. Characterization and prevalence of a circular mitochondrial plasmid in senescence-prone isolates of *Neurospora intermedia*. *Current Genetics* **47**: 182–193.
- Evans HC, Holmes KA, Phillips W, Wilkinson MJ, 2002. What's in a name? *Crinipellis*, the final resting place for the frosty pod rot pathogen of cocoa? *Mycologist* **16**: 148–152.
- Ewing B, Green P, 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* **8**: 186–194.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P, 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* **8**: 175–185.
- Felsenstein J, 1985. Confidence-limits on phylogenies — an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.
- Forget L, Ustinova J, Wang Z, Huss VAR, Lang BF, 2002. *Hyaloraphidium curvatum*: a linear mitochondrial genome, tRNA editing, and an evolutionary link to lower fungi. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 310–319.
- Fox AN, Kennell JC, 2001. Association between variant plasmid formation and senescence in retroplasmid-containing strains of *Neurospora* spp. *Current Genetics* **39**: 92–100.
- Garcia O, Joci N, Macedo J, Tibúrcio R, Zaparoli G, Rincones J, Bittencourt L, Ceita G, Micheli F, Gesteira A, Mariano A, Schiavinato M, Medrano FJ, Meinhardt L, Pereira GAG, Cascardo J, 2007. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in *Theobroma cacao*. *Mycological Research* **111**: 443–455.
- Gordon D, Abajian C, Green P, 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* **8**: 195–202.
- Gray MW, Burger G, Lang BF, 1999. Mitochondrial evolution. *Science* **283**: 1476–1481.
- Griffiths AJF, 1992. Fungal senescence. *Annual Review of Genetics* **26**: 351–372.
- Griffiths AJF, 1995. Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiological Reviews* **59**: 673–685.
- Griffiths AJF, 1998. The kalilo family of fungal plasmids. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **39**: 147–152.
- Grigoriev A, 1998. Analyzing genomes with cumulative skew diagrams. *Nucleic Acids Research* **26**: 2286–2290.
- Guindon S, Gascuel O, 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696–704.
- Haenfler J, Teepe H, Weigl C, Kruff V, Lurz R, Woestemeyer J, 1992. Circular extra-chromosomal DNA codes for a surface protein in the (positive) mating type of the zygomycete *Absidia glauca*. *Current Genetics* **22**: 319–325.
- Heath PJ, Stephens KM, Monnat Jr RJ, Stoddard BL, 1997. The structure of I-Crel, a group I intron-encoded homing endonuclease. *Nature Structural Biology* **4**: 468–476.
- Hermanns J, Asseburg A, Osiewacz HD, 1994. Evidence for a life span-prolonging effect of a linear plasmid in a longevity mutant of *Podospora anserina*. *Molecular and General Genetics* **243**: 297–307.
- Hermanns J, Osiewacz HD, 1992. The linear mitochondrial plasmid pAL2-1 of a long-lived *Podospora anserina* mutant is an invertein encoding a DNA and RNA polymerase. *Current Genetics* **22**: 491–500.
- Higgins DG, 1994. CLUSTAL W: multiple alignment of DNA and protein sequences. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **25**: 307–318.
- Huang X, Madan A, 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* **9**: 868–877.
- Hur M, Geese WJ, Warig RB, 1997. Self-splicing activity of the mitochondrial group-I introns from *Aspergillus nidulans* and related introns from other species. *Current Genetics* **32**: 399–407.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schussler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Budel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R, 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**: 818–822.
- Jolliffe IT, 1986. *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag, New York.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM, 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *CABIOS* **8**: 275–282.
- Jukes TH, 1984. The wobble rule. *Journal of Applied Biochemistry* **6**: 115–116.
- Kempken F, 1995a. Plasmid DNA in mycelial fungi. In: Kuck U (ed), *The Mycota. Part II. Genetics and Biotechnology*, vol. II. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 169–187.
- Kempken F, 1995b. Horizontal transfer of a mitochondrial plasmid. *Molecular and General Genetics* **248**: 89–94.
- Kim EK, Jeong JH, Youn HS, Koo YB, Roe JH, 2000. The terminal protein of a linear mitochondrial plasmid is encoded in the N-terminus of the DNA polymerase gene in white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Current Genetics* **38**: 283–290.
- Kouvelis VN, Ghikas DV, Typas MA, 2004. The analysis of the complete mitochondrial genome of *Lecanicillium muscarium* (synonym *Verticillium lecanii*) suggests a minimum common gene organization in mtDNAs of Sordariomycetes: phylogenetic implications. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 930–940.
- Kurtz S, Choudhuri JV, Ohlebusch E, Schleiermacher C, Stoye J, Giegerich R, 2001. REPuter: the manifold applications of repeat analysis on a genomic scale. *Nucleic Acids Research* **29**: 4633–4642.

- Lang BF, Gray MW, Burger G, 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annual Review of Genetics* **33**: 351–397.
- Lowe TM, Eddy SR, 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research* **25**: 955–964.
- Maas MFP, de Boer HJ, Debets AJM, Hoekstra RF, 2004. The mitochondrial plasmid pAL2-1 reduces calorie restriction mediated life span extension in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genetics and Biology* **41**: 865–871.
- Maas MFP, Sellem CH, Hoekstra RF, Debets AJ, Sainsard-Chanet A, 2007. Integration of a pAL2-1 homologous mitochondrial plasmid associated with life span extension in *Podospora anserina*. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 659–671.
- Meinhardt F, Kempken F, Kamper J, Esser K, 1990. Linear plasmids among eukaryotes: fundamentals and application. *Current Genetics* **17**: 89–95.
- Meinhardt F, Schaffrath R, Larsen M, 1997. Microbial linear plasmids. *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**: 329–336.
- Meinhardt LW, Bellato CM, Rincones J, Azevedo RA, Cascardo JC, Pereira GAG, 2006. *In vitro* production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Current Microbiology* **52**: 191–196.
- Myers CJ, Griffiths AJF, Bertrand H, 1989. Linear kalilo DNA is a *Neurospora* mitochondrial plasmid that integrates into the mitochondrial DNA. *Molecular and General Genetics* **220**: 113–120.
- Nakagawa CC, Jones EP, Miller DL, 1998. Mitochondrial DNA rearrangements associated with mF plasmid integration and plasmidial longevity in *Physarum polycephalum*. *Current Genetics* **33**: 178–187.
- Nakai R, Sen K, Kurosawa S, Shibai H, 2000. Basidiomycetous fungus *Flammulina velutipes* harbors two linear mitochondrial plasmids encoding DNA and RNA polymerases. *FEMS Microbiology Letters* **190**: 99–102.
- Nosek J, Tomaska L, 2003. Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. *Current Genetics* **44**: 73–84.
- Ojala D, Montoya J, Attardi G, 1981. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* **290**: 470–474.
- Osiewacz HD, Hermanns J, Marcou D, Triffi M, Esser K, 1989. Mitochondrial DNA rearrangements are correlated with a delayed amplification of the mobile intron (pIDNA) in a long-lived mutant of *Podospora anserina*. *Mutation Research* **219**: 9–15.
- Peden JF, 1999. Analysis of codon usage. PhD Thesis. University of Nottingham, Nottingham, pp. 226.
- Pramateftaki PV, Kouvelis VN, Lanaridis P, Typas MA, 2006. The mitochondrial genome of the wine yeast *Hanseniaspora uvarum*: a unique genome organization among yeast/fungal counterparts. *FEMS Yeast Research* **6**: 77–90.
- R Development Core Team, 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing Vienna.
- Rieck A, Griffiths AJ, Bertrand H, 1982. Mitochondrial variants of *Neurospora intermedia* from nature. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **24**: 741–759.
- Rincones J, Mazotti GD, Griffith GW, Pomela A, Figueira A, Leal Jr GA, Queiroz MV, Pereira JF, Azevedo RA, Pereira GAG, Meinhardt LW, 2006. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis perniciosa* from various plant hosts in South America. *Mycological Research* **110**: 821–832.
- Rincones J, Meinhardt LW, Vidal BC, Pereira GAG, 2003. Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycological Research* **107**: 452–458.
- Rincones J, Scarpari LM, Carazzolle MF, Mondego JMC, Formighieri EF, Barau JG, Costa GGL, Carraro DM, Vilas-Boas LA, De Oliveira BV, Sabha M, Dias R, Cascardo JM, Azevedo RA, Meinhardt LW, Pereira GAG. Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the Witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, in press.
- Rio MCS, de Oliveira BV, de Tomazella DPT, da Silva JAF, Pereira GAG, 2008. Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. *Current Microbiology* **56**: 363–370.
- Robison MM, Horgen PA, 1999. Widespread distribution of low-copy-number variants of mitochondrial plasmid pEM in the genus *Agaricus*. *Fungal Genetics and Biology* **26**: 62–70.
- Rycovska A, Valach M, Tomaska L, Bolotin-Fukuhara M, Nosek J, 2004. Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. *Microbiology* **150**: 1571–1580.
- Sakaguchi K, 1990. Invertrons, a class of structurally and functionally related genetic elements that includes linear DNA plasmids, transposable elements, and genomes of adeno-type viruses. *Microbiological Reviews* **54**: 66–74.
- Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella AW, Schiavinato MA, Cascardo JC, Pereira GAG, 2005. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. *Journal of Experimental Botany* **56**: 865–877.
- Schäfer B, Hansen M, Lang BF, 2005. Transcription and RNA-processing in fission yeast mitochondria. *RNA* **11**: 785–795.
- Seif E, Leigh J, Liu Y, Roewer I, Forget L, Lang BF, 2005. Comparative mitochondrial genomics in zygomycetes: bacteria-like RNase P RNAs, mobile elements and a close source of the group I intron invasion in angiosperms. *Nucleic Acids Research* **33**: 734–744.
- Shepherd HS, 1992. Linear, non-mitochondrial plasmids of *Alternaria alternata*. *Current Genetics* **21**: 169–172.
- Stewart JB, Beckenbach A, 2006. Insect mitochondrial genomics 2: the complete mitochondrial genome sequence of a giant stonefly, *Pteronarcys princeps*, asymmetric directional mutation bias, and conserved plecopteran A + T-region elements. *Genome* **49**: 815–824.
- Surzcki S, 2000. *Basic Methods in Molecular Biology*. Springer-Verlag, New York.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673–4680.
- Torriani SF, Goodwin SB, Kema GH, Pangilinan JL, McDonald BA, 2008. Intraspecific comparison and annotation of two complete mitochondrial genome sequences from the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 628–637.
- Touchon M, Nicolay S, Audit B, Brodie of Brodie E-B, d'Aubenton-Carafa Y, Arneodo A, Thermes C, 2005. Replication-associated strand asymmetries in mammalian genomes: toward detection of replication origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **102**: 9837–9841.
- van der Gaag M, Debets AJM, Osiewacz HD, Hoekstra RF, 1998. The dynamics of pAL2-1 homologous linear plasmids in *Podospora anserina*. *Molecular and General Genetics* **258**: 521–529.
- van Roey P, Waddling CA, Fox KM, Belfort M, Derbyshire V, 2001. Intertwined structure of the DNA-binding domain of intron endonuclease I-TevI with its substrate. *The EMBO Journal* **20**: 3631–3637.

- Venter JC, Adams MD, Sutton GG, Kerlavage AR, Smith HO, Hunkapiller M, 1998. Shotgun sequencing of the human genome. *Science* **280**: 1540–1542.
- Wang Y, Zeng F, Hon CC, Zhang Y, Leung FC, 2008. The mitochondrial genome of the basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *FEMS Microbiology Letters* **280**: 34–41.
- Woo PCY, Zhen HJ, Cai JJ, Yu J, Lau SKP, Wang J, Teng JLL, Wong SSY, Tse RH, Chen R, Yang HM, Liu B, Yuen KY, 2003. The mitochondrial genome of the thermal dimorphic fungus *Penicillium marneffei* is more closely related to those of molds than yeasts. *FEBS Letters* **555**: 469–477.
- Xia X, 1996. Maximizing transcription efficiency causes codon usage bias. *Genetics* **144**: 1309–1320.
- Zivanovic Y, Wincker P, Vacherie B, Bolotin-Fukuhara M, Fukuhara H, 2005. Complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA from *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* **5**: 315–322.

Research article

Open Access

A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao

Jorge MC Mondego^{†1}, Marcelo F Carazzolle^{†1}, Gustavo GL Costa¹, Eduardo F Formighieri¹, Lucas P Parizzi¹, Johana Rincones¹, Carolina Cotomacci¹, Dirce M Carraro², Anderson F Cunha³, Helaine Carrer⁴, Ramon O Vidal¹, Raíssa C Estrela¹, Odalys García¹, Daniela PT Thomazella¹, Bruno V de Oliveira¹, Acássia BL Pires⁵, Maria Carolina S Rio¹, Marcos Renato R Araújo¹, Marcos H de Moraes¹, Luis AB Castro⁶, Karina P Gramacho⁷, Marilda S Gonçalves⁸, José P Moura Neto⁸, Aristóteles Góes Neto⁹, Luciana V Barbosa¹⁰, Mark J Gultinan¹¹, Bryan A Bailey¹², Lyndel W Meinhardt^{†12}, Julio CM Cascardo^{†5} and Gonçalo AG Pereira^{*1}

Address: ¹Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, 13083-970, Campinas – SP, Brazil, ²Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, Hospital A.C. Camargo, 01509-010, São Paulo – SP, Brazil, ³HEMOCENTRO, Laboratório de Genoma e Hemoglobina, Universidade Estadual de Campinas, 13084-878, Campinas – SP, Brazil, ⁴Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ, USP, 13418-900, Piracicaba – SP, Brazil, ⁵Laboratório de Genômica e Expressão Gênica, Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, 45650-000, Ilhéus – BA, Brazil, ⁶Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte, 70770-900, Brasília – DF, Brazil, ⁷CEPLAC/CEPEC/SEFIT, 45600-970, Itabuna – BA, Brazil, ⁸Laboratório de Biologia Molecular – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170-290, Salvador – BA, Brazil, ⁹Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), 44031-460, Feira de Santana – BA, Brazil, ¹⁰Laboratório de Biologia Molecular – Departamento de Biologia Geral, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, 40170-290, Salvador – BA, Brazil, ¹¹Department of Horticulture, Pennsylvania State University, University Park, Chester, PA 16802, USA and ¹²Sustainable Perennial Crops Laboratory, USDA-ARS, 10300 Baltimore Av, Bldg. 001, 18 Beltsville MD 20705-2350, USA

Email: Jorge MC Mondego - jmcmondego@lge.ibi.unicamp.br; Marcelo F Carazzolle - mcarazzo@lge.ibi.unicamp.br; Gustavo GL Costa - glacerda@lge.ibi.unicamp.br; Eduardo F Formighieri - eduformi@gmail.com; Lucas P Parizzi - lucas@lge.ibi.unicamp.br; Johana Rincones - johanarp@unicamp.br; Carolina Cotomacci - caca@unicamp.br; Dirce M Carraro - dirce.carraro@hccancer.org.br; Anderson F Cunha - anderf@unicamp.br; Helaine Carrer - hecarrer@esalq.usp.br; Ramon O Vidal - vidal@lge.ibi.unicamp.br; Raíssa C Estrela - raissa@lge.ibi.unicamp.br; Odalys García - odalys@lge.ibi.unicamp.br; Daniela PT Thomazella - danitt@lge.ibi.unicamp.br; Bruno V de Oliveira - bvo@lge.ibi.unicamp.br; Acássia BL Pires - acassia@lge.ibi.unicamp.br; Maria Carolina S Rio - scatolin@lge.ibi.unicamp.br; Marcos Renato R Araújo - marcos.araujo@griaulebiometrics.com; Marcos H de Moraes - mhmoraes@lge.ibi.unicamp.br; Luis AB Castro - lbarreto@mct.gov.br; Karina P Gramacho - karina@cepec.gov.br; Marilda S Gonçalves - mari@bahia.fiocruz.br; José P Moura Neto - jpneto@cpqgm.fiocruz.br; Aristóteles Góes Neto - agoesnt@uefs.br; Luciana V Barbosa - veiga@ufba.br; Mark J Gultinan - mjg9@psu.edu; Bryan A Bailey - bryan.bailey@ars.usda.gov; Lyndel W Meinhardt - lyndel.meinhardt@ars.usda.gov; Julio CM Cascardo - cascardo@uesc.br; Gonçalo AG Pereira* - goncalo@unicamp.br

* Corresponding author †Equal contributors

Published: 18 November 2008

Received: 17 June 2008

BMC Genomics 2008, 9:548 doi:10.1186/1471-2164-9-548

Accepted: 18 November 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/548>

© 2008 Mondego et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The basidiomycete fungus *Moniliophthora perniciosa* is the causal agent of Witches' Broom Disease (WBD) in cacao (*Theobroma cacao*). It is a hemibiotrophic pathogen that colonizes

the apoplast of cacao's meristematic tissues as a biotrophic pathogen, switching to a saprotrophic lifestyle during later stages of infection. *M. pernicioso*, together with the related species *M. roreri*, are pathogens of aerial parts of the plant, an uncommon characteristic in the order Agaricales. A genome survey (1.9× coverage) of *M. pernicioso* was analyzed to evaluate the overall gene content of this phytopathogen.

Results: Genes encoding proteins involved in retrotransposition, reactive oxygen species (ROS) resistance, drug efflux transport and cell wall degradation were identified. The great number of genes encoding cytochrome P450 monooxygenases (1.15% of gene models) indicates that *M. pernicioso* has a great potential for detoxification, production of toxins and hormones; which may confer a high adaptive ability to the fungus. We have also discovered new genes encoding putative secreted polypeptides rich in cysteine, as well as genes related to methylotrophy and plant hormone biosynthesis (gibberellin and auxin). Analysis of gene families indicated that *M. pernicioso* have similar amounts of carboxylesterases and repertoires of plant cell wall degrading enzymes as other hemibiotrophic fungi. In addition, an approach for normalization of gene family data using incomplete genome data was developed and applied in *M. pernicioso* genome survey.

Conclusion: This genome survey gives an overview of the *M. pernicioso* genome, and reveals that a significant portion is involved in stress adaptation and plant necrosis, two necessary characteristics for a hemibiotrophic fungus to fulfill its infection cycle. Our analysis provides new evidence revealing potential adaptive traits that may play major roles in the mechanisms of pathogenicity in the *M. pernicioso*/cacao pathosystem.

Background

Moniliophthora pernicioso, previously known as *Crinipellis pernicioso* (Singer) Stahel, is a hemibiotrophic basidiomycete (Tricholomataceae, Agaricales, Marasmiaceae) fungus that causes Witches' broom disease (WBD) in cacao (*Theobroma cacao* L.) [1-3]. WBD and frosty pod rot (FPR), caused by *Moniliophthora roreri*, are the most devastating diseases of cacao in the Americas [4]. Cacao production in southeastern Bahia, the main production area in Brazil, was severely affected by the introduction of WBD at the end of 1980's [5]. This disease damaged Bahian agribusiness, caused major social problems and has contributed to the degradation of the Atlantic Rainforest ("Mata Atlântica"). This is because cacao producing areas, typically, maintained old-growth native tree species as shade for the cacao plantations, which were converted to pasture [6].

The symptoms displayed by cacao plants during WBD parallel the hemibiotrophic development of *M. pernicioso* [7]. Briefly, the disease begins when fungal spores germinate and infect meristematic tissues, developing into monokaryotic biotrophic hyphae without clamp connections that slowly occupy the intercellular space. This stage of WBD is characterized by the emergence of hypertrophic and hyperplastic anomalous branches, and the formation of parthenocarpic fruits. Infected branches, known as "green brooms", grow without apical dominance, with a phototropic orientation and displaying epinastic leaves [7]. After two to three months the infected tissue turns necrotic (dry brooms) and the hyphae become saprotrophic with two nuclei per cell and clamp connections,

invading the inter and intracellular spaces of the infected tissue [6,8]. This fungal species exhibits primary homothallism as its reproductive strategy [9]; thus, the change from the monokaryotic to the dikaryotic mycelium occurs without the prerequisite of mating between compatible individuals. After alternate wet and dry periods, basidiomes produced by the saprotrophic hyphae release basidiospores that are spread by wind or rain, thus completing the *M. pernicioso* life cycle [7].

The Witches' broom Genome Project <http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura> involving several Brazilian laboratories was initiated to increase the knowledge of this disease. The genome size, chromosomal polymorphism, genetic variability and the *M. pernicioso* mitochondrial genome have already been described [10-12]. Additionally, a biochemical study revealed the metabolic modifications that occur in cacao plantlets during WBD development [13]. Technical improvements have been achieved in the manipulation of cacao [14,15] and *M. pernicioso* [16,17]. One of the main bottlenecks in *M. pernicioso* research was solved with the development of the *in vitro* production of biotrophic-like cultures [18]. Necrotic inducing proteins expressed by *M. pernicioso* have been characterized [19], and the analysis of EST libraries and DNA microarrays have identified differentially expressed genes during its development [[20]; A.B.L. Pires *et al.*, unpublished data] and for the interaction of the fungus with cacao [21,22]. Despite the substantial progression in understanding WBD, many questions remain unsolved, mainly those concerning the mechanisms controlling processes such as: (i) the fungal switch from biotrophism

to saprotrophism; (ii) the drastic phenotypic alteration of cacao during disease development and (iii) the death of infected tissues. *In vitro* cultures in our laboratory demonstrate that this fungus has a great capacity to adapt to media containing different sources of carbon and nitrogen and it is able to grow in extremely nutrient-poor media. These results together with the fact that hemibiotrophic fungi, such as *M. pernicioso*, display complex lifestyles [23] suggest that this fungus has a significant genomic and transcriptomic plasticity that contributes to the successful pathogenic mechanisms expressed during its life cycle. In a recent review, Meinhardt *et al.*, give a historical account and summarize the current state of knowledge about WBD [24].

Around two thirds of the known Basidiomycota species are included in the order Agaricales [25]. In addition to being an interesting group for carrying out developmental genetic studies concerning fungal development and reproduction, the Agaricales contain many important industrial species (i.e., edible mushrooms, fiber bleaching fungus), and species with unique lifestyles: saprophytes (i.e., wood-decaying fungus *Phanerochaete chrysosporium*), symbionts (i.e., ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*), leaf-litters decomposers (i.e., *Agaricus bisporus*) and root pathogens (i.e., *Armilaria mellea*). Interestingly, *M. pernicioso* and *M. roreri* are members of a group of Agaricales species that are able to infect aerial parts of plants, an uncommon characteristic among this Basidiomycota order.

Genome sequencing and analysis is an important strategy to obtain comprehensive information concerning the metabolism and development of organisms. The initial objective of the *M. pernicioso* Genome Project was to obtain a genome survey sequence using a whole shotgun strategy to provide genomic information for the WBD research community. Recently, the bioinformatics and genomic communities have been debating about the benefits and costs of finishing a complete genome as compared to applying a genome survey strategy [26-32]. It has been proposed that a two-fold genome sequence coverage is sufficient to support a high percentage of EST alignments and exon similarity matches [26,31]. Additionally, gene models resulting from a genome survey can be predicted accurately by the comparison with complete genomes of phylogenetically related organisms [26,31]. This strategy has been used for genomic surveys of dog (1.5× coverage) [31] and of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* (0.4× coverage) [33]. Recently, the genomes of the basidiomycete species *Laccaria bicolor*, *Cryptococcus neoformans*, *Ustilago maydis*, *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*) and *Phanerochaete chrysosporium* have been determined and many additional Basidiomycota genome projects are ongoing or about to be released <http://www.broad.mit.edu/annotation/cgi>; <http://www.jgi.doe.gov>, which could provide a rich database for additional Basidiomycota genomic survey evaluations.

www.jgi.doe.gov, which could provide a rich database for additional Basidiomycota genomic survey evaluations.

With the existence of several complete Basidiomycota genomes, and both *M. pernicioso* ESTs libraries, and a 1.9 × genome coverage, we decided to conduct a genome survey of *M. pernicioso* to obtain further information about this important phytopathogen. This report describes a survey of the genome sequences of *M. pernicioso*, with specific emphasis on the genes potentially involved in disease development such as a cytochrome P450 monooxygenases, transposable elements, putative plant defense elicitors, pathogenicity effectors, cell wall degrading enzymes, proteins related to methylotrophy and the biosynthesis of plant hormones by the fungus. The identification of such genes in the *M. pernicioso* genomic data lead us to hypothesize a connection between molecular processes involved in the growth phases of the fungus and the progression of WBD.

Results and discussion

Genome assembly and estimation of genome size

A diagram flow describing the bioinformatic procedures applied in the *M. pernicioso* genome survey are depicted in Figure 1. After sequencing, a total of 124,565 reads were obtained and assembled using the whole genome shotgun strategy. During the initial assembly process, a large contig including 6,920 reads was found. This contig was identified as the mitochondrial genome of the fungus (RefSeq NC 005927), which comprised approximately 6% of *M. pernicioso* sequences [12]. The remaining genome sequences were assembled resulting in 17,991 contigs and 7,065 singlets with average lengths of 1,300 bp and 455 bp, respectively. The largest contig consisted of 25,364 bp, and was formed by 513 reads. The sum of all reads was close to 75 Mbp and the total assembly consisted of 26.7 Mbp (Fig. 1).

Previous Feulgen-image analysis experiments estimated *M. pernicioso* genome size to be 32.98 ± 7.95 Mbp [10]. Due to the large error in this estimation we decided to assess the genome size using the genome estimation protocol established in the dog genome survey [31] (more details in Additional File 1). This analysis resulted in a genome size ranging from 38.7 to 39.0 Mbp, a value similar to the genome length of another fungus belonging the order Agaricales, *C. cinerea* (37.5 Mbp), and that agrees with the previous size estimated by Feulgen-image analysis [10].

The Lander Waterman theory (LW) [34] and its applications [35,36] were used to confirm the estimate of the *M. pernicioso* genome size. The theoretical values for the expected number of clusters (contigs + singlets), contigs, gaps, average cluster length and average gap length can be calculated using the LW theory from the effective average

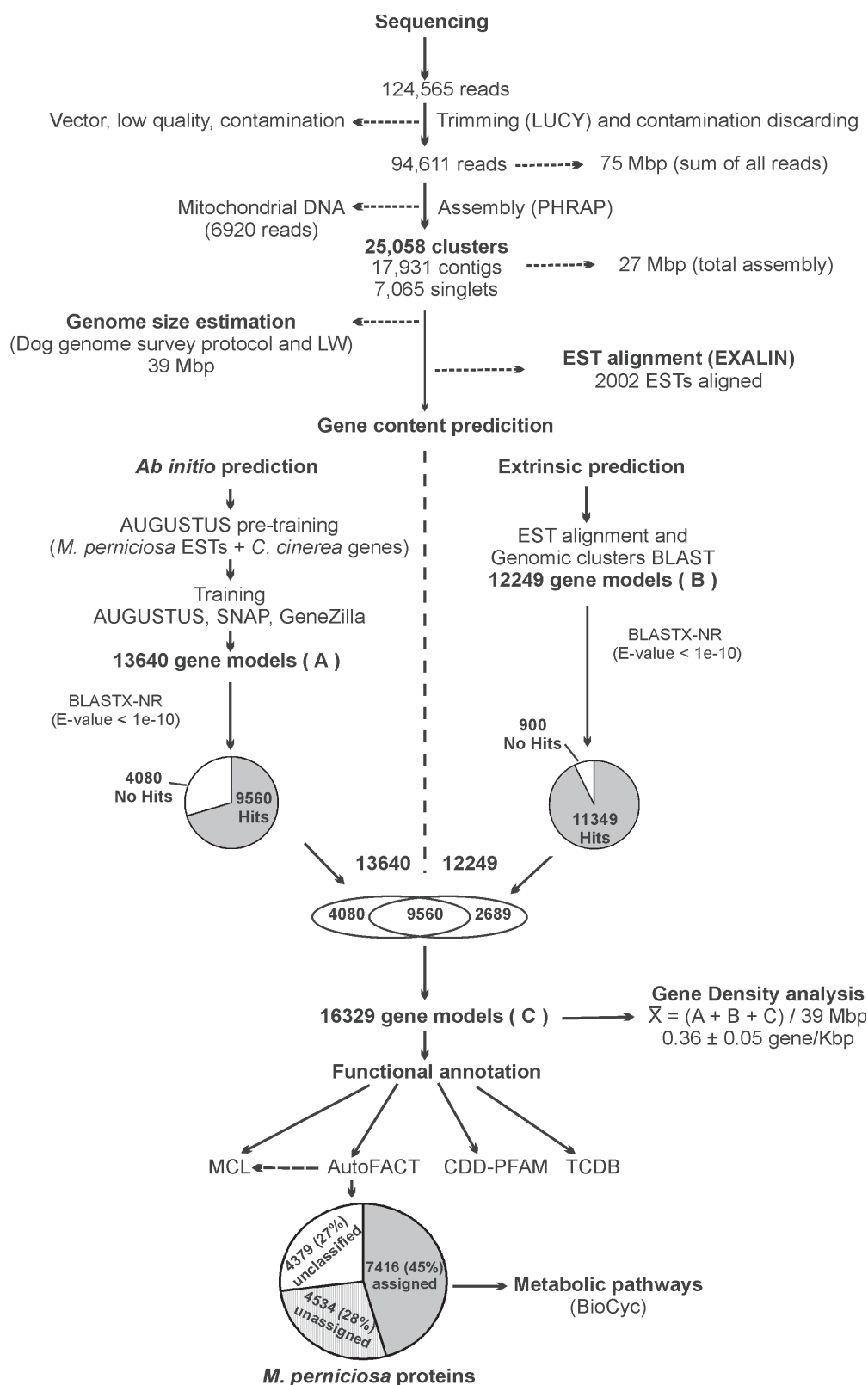


Figure 1
Flow diagram of bioinformatics procedures applied in *M. perniciosus* genome survey.

read length, the number of reads and the genome size as parameters. If the calculated values derived from the genome assembly were close to the theoretical values derived from LW calculations, then it is possible to confirm the estimated genome size. A summary of the results obtained from the assembly data and from the estimation using the LW theory is shown in Table 1. The experimental values agreed with the theoretical calculations, thus supporting our genome size estimation. According to LW analysis the average gap size was 413 bp. To have more information about the distribution of the gap size, we performed a comparison between a set of eukaryotic core proteins (generated by CEGMA pipeline [37]) and *M. perniciosus* contigs (See Additional file 1). Using this methodology, we detected that the average gap size was around 500 ± 300 bp, corroborating with LW average gap size estimate (413 bp). Considering that most of the gaps are around 500 bp and that *C. cinerea* average gene size is 1,678 bp, the majority of *M. perniciosus* genes or partial gene regions are likely to be included in the contigs. Corroborating this notion, we have found all genes encoding proteins of essential metabolic pathways such as Glycolysis, Gluconeogenesis, Pentose Phosphate pathway, and several others, which are available in the website <http://www.lge.ibi.unicamp.br/biocyc/MP> (see below).

In order to estimate the number of sequences misassembled due to repeat regions, we applied the integrated pipeline for assembly validation, called amosvalidate [38] (Further information in Additional file 1). This analysis resulted in 664 contigs with overrepresented regions totaling 1.1 Mbp. Multiplying the number of bases in overrepresented regions by over-coverage estimate resulted in 7.4 Mbp of repeat regions in the genome. Since reads from repetitive regions were eliminated from the estimation of the genome length using dog genome survey protocol (Additional file 1), this misassembling does not invalidates the genome size estimate.

Gene content

The initial step to uncover the gene content of *M. perniciosus* was performed using the genomic sequences together with a library of 3,145 ESTs, previously annotated and partially published [20]. Genes were identified by comparing these two libraries using the program Exalin [39]. This analysis allowed us to identify expressed genes and intron structure. The result was 2,002 ESTs aligned to the

genome contigs. Based on this EST-genome sequence alignment, the average intron length was estimated as 52 bp. This information was then used in the next steps of the process.

A more detailed investigation of the gene content was carried out using a combination of *ab initio* (gene predictor programs) and comparative gene prediction (BLAST-EST sequence alignment). For *ab initio* gene prediction, we first applied the methodology described for the AUGUSTUS gene predictor [40] <http://augustus.gobics.de/binaries/retraining.html>. This methodology essentially trains the AUGUSTUS program using a combination of sequences from the species of interest together with sequences of a phylogenetically related species, specifically with similarities in intron and exon length distributions. Using this approach, the coding content sensors (codon usage, GC content) are trained with sequences of the species of interest, and signal sensors (splice sites, TATA-box, polyadenylation sites, etc) are trained with the sequences of the related species. Sequences from *C. cinerea* were used in the training process; together with selected *M. perniciosus* ESTs with E-value in BLASTX-NR $\leq 1E-10$. The sequences of the ESTs that aligned with proteins in the databank were concatenated, giving rise to a 240 Kbp sequence. Ten copies of this *M. perniciosus* EST concatamers (total of 2.4 Mbp) together with a dataset of genes from *C. cinerea* <http://augustus.gobics.de/datasets>, comprised of 1.2 Mbp, were used to "pre-train" AUGUSTUS. The *M. perniciosus* predictions that came out of this pre-training were compared with the protein databank NR using BLASTp. The resulting predictions with similarities in the NR databank, and with a coverage $\geq 90\%$, were selected. After eliminating redundancies, 134 complete (containing the start codon and stop codon) and 1,136 partial (without the start codon and/or stop codon) *M. perniciosus* gene models were used to train AUGUSTUS [40] and two other gene predictors (SNAP [41] and Genezilla [42]). Predictions with less than 30 amino acids were eliminated. The remaining predictions were grouped into 19,932 overlapping clusters; that is, genomic regions covered by at least one prediction. The predictions in each overlapping cluster were ranked according to the criteria used by the Fungal Genome Initiative at the Broad Institute <http://www.broad.mit.edu>, with some adaptations. The *ab initio* gene finding pipeline generated 13,640 gene models, 9,560 of which contained

Table 1: Comparison between assembly values and values calculated using Lander Waterman theory

	Calculated from assembling	Calculated from LW theory
# Clusters (contigs+singlets)	25,056	24,950
# Contigs	17,991	18,370
# Gaps	-	24,951
Average cluster size (bp)	1,065	1,152
Average gap size (bp)	-	413

significant similarity to GenBank sequences (Fig. 1 and Fig. 2).

The extrinsic prediction methodology consisted of a combination of genomic similarity searches (BLASTX) using contigs and singlets, with the alignment of *M. perniciosus* ESTs in the genomic clusters. 17,991 contigs and 7,065 singlets were submitted to similarity analysis in a databank containing BLASTX-NR plus *P. chrysosporium* proteins. The genomic regions containing homologues in this databank were selected and exon-intron boundaries were determined. We also selected the alignments between ESTs and genomic clusters. Then, we evaluated if there was a superposition of BLAST alignments and EST alignments. After this analysis, the extrinsic prediction methodology revealed 12,249 gene models. Most of these gene models (9,560) were also predicted by the *ab initio* gene predictor programs. Of the 2,689 remaining gene models not predicted by the gene predictor programs, 1,789 presented significant similarity to sequences deposited in the GenBank (E-value $\leq 1E-10$) and 900 did not have any significant similarity in the GenBank (E-value $> 1E-10$) (Fig. 1 and Fig. 2). One of the reasons why these genes were not detected by the gene prediction programs could be the presence of low quality sequences that may have lead to frameshifts, thus making them impossible to detect by these programs. The total number of gene models obtained using both approaches, *ab initio* and extrinsic predictions, is 16,329. Assuming that the average contig length is 1.3 Kbp and the average gap length is 413 bp, it is possible that this total number of gene models (16,329) represents an overestimation. For instance, in our assem-

bly a gene with > 2 Kbp (protein ~ 700 aa) could be represented by two gene models, with each one in different contigs, which suggests a possible redundancy in this gene model prediction. Thus, it is very likely that the real number of gene models will be less and closer to the *ab initio* or extrinsic predictions separately. However, to obtain the maximum amount of information, we decided to evaluate the results of similarity searches in GenBank (BLASTX-NR) for all 16,329 gene models. As a result, 69.5% (11,349) of the gene models showed significant sequence similarity (E-value $\leq 1e-10$) to GenBank proteins. The remaining 30.5% (4,980), designated as "no-hits", were sequences with lower E-value scores (E-value $> 1e-10$). Of these gene models 4,080 were predicted with the *ab initio* gene predictors and 900 with the extrinsic predictions (Fig. 1 and Fig. 2).

As expected, BLASTX analysis against available complete fungal genomes showed that *M. perniciosus* gene models present higher similarity to genes from Basidiomycota (*L. bicolor*, *C. cinerea* and *P. chrysosporium*) than those from Ascomycota (Table 2).

In order to find groups of similar proteins in our dataset, we applied a Markov Clustering (MCL) algorithm [43] to the *M. perniciosus* gene models. Although the output by this method is not highly reliable, they correlate well with "real" gene families and can be applied efficiently to cluster large quantities of genes in a high throughput fashion [44,45]. MCL also helped to the assemble genes without similarity in the GenBank into gene families, which are described in the following sections.

Those gene models that were not grouped into gene families by the MCL algorithm have been compared with the genome of *C. cinerea* in order to discard those genes with parts of their sequences present in more than one contig. In order to perform this comparison (TBLASTN) we assume that the length distribution of *M. perniciosus* proteins is similar to those from *C. cinerea*. In this comparison we evaluated similar genes according to the length of the protein (Fig. 3). This comparison showed that there is a clear correlation between complete genes in *C. cinerea* and *M. perniciosus* gene models coding for proteins smaller than 300 aa. However, for larger proteins more than one *M. perniciosus* gene model showed similarity to a single *C. cinerea* protein, thus confirming the overestimation of the number of gene models. Given the fact that the genome sequence is incomplete, there is high probability that we are predicting more than one gene model per gene.

In order to have a measurement of the overestimation and use it to correct our database, the corresponding relationship between the protein size and the number of gene models was calibrated with the genome of *C. cinerea* using

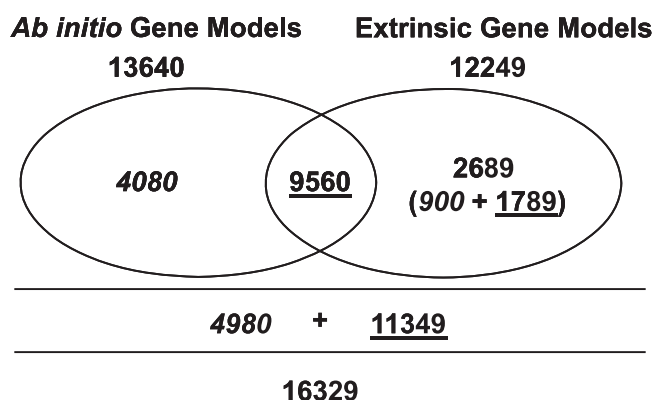


Figure 2
Number of *M. perniciosus* gene models predicted by *ab initio* and/or extrinsic prediction methods. Left ellipse: gene models predicted by *ab initio* methods. Right ellipse: gene models predicted by extrinsic methods. The intersection contains gene models detected by both methods. Underlined: number of gene models with BLASTX-NR E-value similarity $\leq 1e-10$. In italics: number of gene models with BLASTX-NR E-value similarity $> 1e-10$.

Table 2: *Moniliophthora perniciosa* predicted gene comparisons

Organism Comparison	Genes with* BLASTX hits	Genes with Top BLASTX Hits
<i>Laccaria bicolor</i>	9910 (60.6%)	4811 (29.27%)
<i>Coprinopsis cinerea</i>	10649 (65.1%)	3281 (19.97%)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	9311 (57.0%)	2021 (12.30%)
<i>Fusarium graminearum</i>	5904 (36.1%)	57 (0.35%)
<i>Magnaporthe grisea</i>	5645 (34.5%)	39 (0.2%)
<i>Ustilago maydis</i>	5488 (33.6%)	42 (0.26%)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	5454 (33.4%)	78 (0.47%)
<i>Neurospora crassa</i>	5127 (31.4%)	16 (0.10%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3296 (20.2%)	4 (0.02%)
All NR database	11349 (69.5%)	

* – Each *M. perniciosa* gene model was compared to all the proteins from the organisms listed in the table. BLASTX score was defined as $1e-10$

the gene models unlinked to gene families identified by the MCL algorithm (Fig. 3). A linear regression formula was used to correct for the overestimation according to the protein size. For example, proteins smaller than 300 amino acids will have only one model representing the gene, while larger proteins will have one model and a fraction of a second model representing its gene. This fraction represents the overestimation of the number of gene models.

In order to estimate the gene density in *M. perniciosa*, and deal with the overestimation evident by the previous analysis, we averaged the total number of gene models obtained by the different predictions: *ab initio* predictions (13,640), extrinsic predictions (12,249) and total number of gene predictions (16,329). This resulted in 14,072 gene predictions that were divided by the 39 Mbp estimated genome size, which gave a gene density of approximately 2.77 ± 0.37 Kbp/gene or 0.36 ± 0.05 gene/Kbp for the genome of *M. perniciosa*. Figure 4 depicts the gene density

comparison between *M. perniciosa*, two eubacteria (*Xylella fastidiosa* and *Escherichia coli*), one archaea (*Haloquadratum walsbyi*), an apicomplexan (*Theileria parva*), a primitive chordate (*Ciona intestinalis*) and a series of fungal genomes, and this showed that our gene density evaluation is in agreement with gene density data of other filamentous fungi [46].

The overall *M. perniciosa* genomic features are summarized in Table 3. The genomic clusters of *M. perniciosa* were submitted to NCBI (GenomeProject ID 28951, Locus-tag prefix MPER) and the Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank under the project accession ABRE00000000. The version described in this paper is the first version, ABRE01000000.

Overall Functional Annotation and Metabolic maps

The number of gene models used for the functional annotation and building of the metabolic maps was 16,329, which represents the total number of gene models

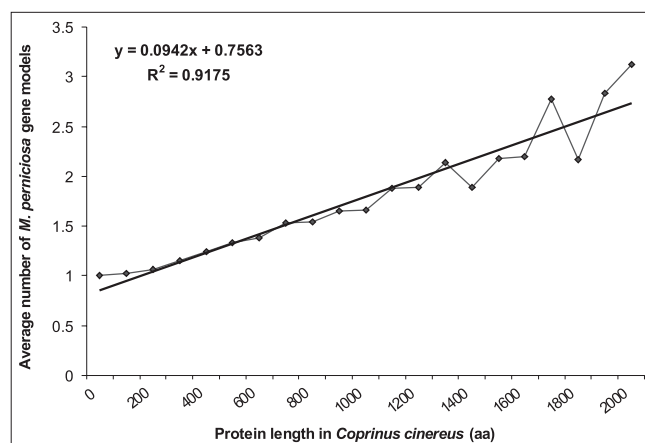


Figure 3
Correlation between the average number of *M. perniciosa* gene models and the length of *C. cinereus* proteins.

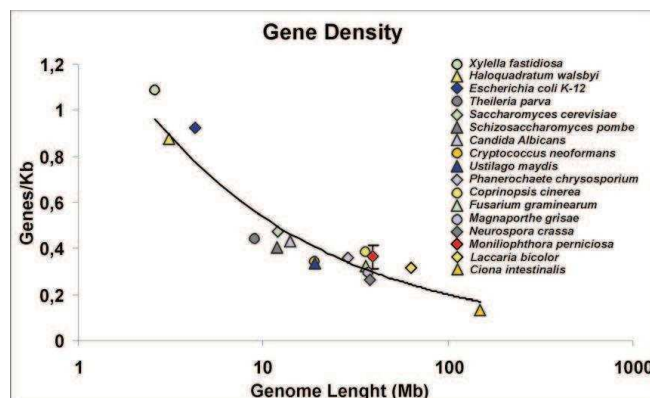


Figure 4
Correlation of various organisms' genome size and number of genes (Gene Density). Error bar in *M. perniciosa* data point depicts the Standard Deviation ($SD \pm 0.05$) of Gene/Kbp ratio using *ab initio* predictions, extrinsic predictions and the sum of both predictions (see text).

Table 3: *Moniliophthora perniciosa* genome survey features

Genome survey features	Values
Contigs	17,991
Contigs size (average)	1.3 Kbp
Singlets	7,065
Singlets size (average)	455 bp*
Sum of all reads	75 Mbp
Assembly size	26.7 Mbp
Estimated genome size	39 Mbp
Coverage	1.92×
Gene models	
<i>Ab initio</i> gene models	13,640
Extrinsic gene models	12,249
Total gene models	16,329
Gene density	2.77 Kbp/gene (SD ± 0.39)
	0.36 gene/Kbp (SD ± 0.05)
Average gene size	651.4 bp
GC content overall	47.7
GC content coding	49.7
GC content non coding	46.8
Intron size (mode)	52 bp
Intron size (average)	63 bp
Exon size (mode)	60 bp
Exon size (average)	166 bp
AutoFACT annotation	
Classified (Hits)	11,950 (73%)
Assigned (Conserved expressed proteins)	7,416 (45%)
Unassigned (Conserved hypothetical proteins)	4,534 (28%)
Unclassified (No Hits)	4,379 (27%)

* – Singlet size after LUCY quality trimming (phred ≥ 16).

obtained using *ab initio* and extrinsic predictions. Although this number represents an overestimation of the real number of genes (see above), it was used to maximize the information acquired from these sequences. All data obtained in the gene families and protein domain analyses were corrected according to the normalization procedure developed from the gene models not included in any of the MCL families based on comparisons with the *C. cinerea* genome (see above).

The program AutoFACT [47], an automated annotation tool, was used to evaluate the putative functions of *M. perniciosa* gene models. This program determines the most informative functional description by combining multiple BLAST reports from a number of user selected databases, and provides a consensus result [47]. AutoFACT classifies proteins as "classified proteins", which can be "assigned" (containing similarity to proteins with annotated function) or "unassigned" (containing similarity to proteins with unknown function), and "unclassified proteins" (without similarity to any other protein in data-banks). Using this software, 73% of gene models (11,950) were annotated as previously classified proteins. From these 7,416 (45%) were assigned proteins, and 4,534 (28%) were classified as unassigned proteins, which can

be interpreted as a class of conserved hypothetical proteins (Table 3). The remaining 4,379 gene models (27%) were considered as unclassified proteins. The number of gene models with E-value scores > 1e-10 obtained by BLASTX-NR (no-hits, see previous section) was 4,980 and represented 30.5% of the total number of models. The result obtained with AutoFACT increased the number of classified proteins by 3.5% (Fig. 1; Table 3). This indicates that the use of domain classification databases is helpful in the identification and annotation of gene models.

Additionally, we correlated the AutoFACT annotation with the gene families assembled by the MCL algorithm. As depicted in Table 4 and additional file 2, MCL data indicated that the cytochrome P450 monooxygenase family had the largest number of *M. perniciosa* members, followed by a gypsy-like retrotransposon gene family, and a gene family that has similarity to a *C. cinerea* hypothetical protein (EAU86912.1) and to a shitake mushroom *Lentinula edodes* EST (EB016963). This new gene family appears to be related to specific developmental traits of the Agaricales. Also found were new gene families with unknown functions based on their lack of homology with GenBank sequences (Additional file 2; Additional File 3 – Worksheet Unknown Gene Families). These families

Table 4: MCL analysis of *M. perniciosus* gene models

MCL family ID	#members ^a	Norm Factor ^b	Norm #members ^c	Manual annotation ^d
1	175	1.24987	140	Cytochrome P450 monooxygenase
2	143	1.82632	78	Gypsy like-retrotranspon
4	84	1.35205	62	Conserved hypothetical protein
3	84	1.46889	57	Alcohol oxidases and GMC oxidoreductase
5	82	1.26479	65	Gypsy like-retrotranspon
6	76	1.57535	48	Serine threonine kinase
7	64	1.54312	41	Conserved hypothetical protein
8	59	1.54180	38	Conserved hypothetical protein
9	57	1.46370	39	Proteins containing WD-40 and NACHT domain
10	55	-	-	No hits protein family
11	52	1.34190	39	Cytochrome P450
12	50	1.52169	33	Serine threonine kinase
13	46	1.18098	39	Conserved hypothetical protein
14	43	1.21555	35	Cytochrome P450
15	41	1.45275	28	Carboxylesterase/lipase
16	39	1.67524	23	Gypsy like-retrotranspon
17	38	1.26598	30	Hexose transporter
19	35	1.11159	31	MFS transporter
18	35	1.43881	24	Splicing factor
20	32	1.17902	27	Laccase – Multicopper oxidase

a – Number of gene models present in each family

b – Normalization Factor used to normalize the number of gene models present in each family (see methods)

c – Normalization number of gene models present in each family

d – Manual annotation of MCL families according to BLAST similarity analysis

could possibly be linked to *M. perniciosus* physiological characteristics.

A comparison of the gene models with the CDD-PFAM databank [48] was performed to obtain information about protein domains present in *M. perniciosus* proteins. The data obtained were normalized using the procedure described above. Cytochrome P450 monooxygenase was the most prevalent protein domain assigned in *M. perniciosus* (gnl|CDD|40168), followed by protein kinases (gnl|CDD|40170), sugar transporters (gnl|CDD|40184), short chain dehydrogenases (gnl|CDD|40206) and carboxylesterases/lipases (gnl|CDD|40235) (Table 5; Additional File 4). The prevalence of Cytochrome P450 monooxygenase domains in the genome agrees with the results of MCL analysis. CDD-PFAM analysis was also used to evaluate the protein domains in other genome fungi (Additional File 4). The comparisons between *M. perniciosus* and the other fungi analyzed are described below.

A hypothetical metabolic map of *M. perniciosus* was built using BioCyc [49]. This analysis allowed us to annotate 235 metabolic pathways. These include 1358 enzymatic reactions incorporating a total of 2139 enzymes <http://www.lge.ibi.unicamp.br/biocyc/MP>. A comparison of this metabolic map with the fungal model *Saccharomyces cere-*

visiae S288C (documented with 132 pathways, 925 enzymatic reactions, and 675 enzymes – <http://www.lge.ibi.unicamp.br/biocyc/comparatives/MP-SCER>) showed that *M. perniciosus* has more metabolic pathways than *S. cerevisiae*; a result that corresponds to the smaller genome size of *S. cerevisiae* and possibly the more complex lifestyle of *M. perniciosus*. Interestingly, *M. perniciosus* has a higher number of reactions involving O₂, CO₂, H₂O₂, and NAD(P)⁺/NAD(P)H than *S. cerevisiae*, suggesting a greater capacity to use and deal with oxidation-reduction reactions (Additional File 5 – worksheet compounds). We also detected reactions with farnesyl pyrophosphate and dimethylallyl-diphosphate, which are involved in the biosynthesis of the secondary metabolites such as isoprenoids and indoles. Moreover, according to BioCyc analysis, *M. perniciosus* has more amino acid catabolic pathways, alternative carbon sources degradation and biosynthesis routes and C1 compounds (i.e., methanol) utilization and assimilation reactions than *S. cerevisiae* (Additional File 5 – worksheet pathways). These pathways are under manual annotation and will be published on BioCyc web page. The existence of these pathways in *M. perniciosus* suggest ecological and physiological adaptations to environmental stresses; to competition present in its native habitat in the Amazon Basin, and to traits that enable it to colonize cacao and trigger WBD.

Table 5: Top 20 CDD-PFAM domains in *M. perniciosus* proteins

CDD – ID ^a	Domain PFAM ^b	#Hits ^c Domains	%Hits ^d PTN	Rank ^e	Norm Factor	# Hits ^g Domains Norm	%Hits ^h PTN Norm	Rank ⁱ Norm
gnl CDD 40168	pfam00067, Cytochrome P450	256	1.57%	1	1.3565	188.71427	1.15%	1
gnl CDD 40170	pfam00069, Protein kinase	141	0.86%	2	1.6059	87.80184	0.54%	2
gnl CDD 40184	pfam00083, Sugar (and other) transporters	89	0.54%	3	1.6902	52.65651	0.32%	3
gnl CDD 40206	pfam00106, adh short, short chain dehydrogenase	84	0.51%	4	1.7141	49.00442	0.30%	4
gnl CDD 40235	pfam00135, COesterase, Carboxylesterase	57	0.35%	5	1.4738	38.67603	0.24%	5
gnl CDD 40207	pfam00107, ADH zinc N, Zinc-binding dehydrogenase	43	0.26%	8	1.2398	34.68221	0.21%	6
gnl CDD 40813	pfam00732, GMC oxred N, GMC oxidoreductase	52	0.32%	6	1.5402	33.76192	0.21%	7
gnl CDD 40345	pfam00248, Aldo ket red, Aldo/keto reductase family	41	0.25%	9	1.2881	31.83088	0.19%	8
gnl CDD 41245	pfam01185, Hydrophobin, Fungal hydrophobin	26	0.16%	21	0.8460	30.73119	0.19%	9
gnl CDD 40253	pfam00153, Mito carr, Mitochondrial carrier protein	38	0.23%	12	1.3890	27.35860	0.17%	10
gnl CDD 40748	pfam00665, rve, Integrase core domain	50	0.31%	7	1.8943	26.39449	0.16%	11
gnl CDD 40493	pfam00400, WD40, WD domain, G-beta repeat	35	0.21%	13	1.5151	23.10130	0.14%	12
gnl CDD 40179	pfam00078, RVT, Reverse transcriptase	39	0.24%	11	1.7620	22.13448	0.14%	13
gnl CDD 45101	pfam05199, GMC oxred C, GMC oxidoreductase	28	0.17%	16	1.2741	21.97654	0.13%	14
gnl CDD 40588	pfam00501, AMP-binding, AMP-binding enzyme	40	0.24%	10	1.8537	21.57819	0.13%	15
gnl CDD 41412	pfam01360, Monooxygenase, Monooxygenase	25	0.15%	22	1.2253	20.40382	0.12%	16
gnl CDD 40107	pfam00005, ABC tran, ABC transporter	33	0.20%	14	1.7198	19.18851	0.12%	17
gnl CDD 40367	pfam00270, DEAD, DEAD/DEAH box helicase	30	0.18%	15	1.5947	18.81230	0.12%	18
gnl CDD 40419	pfam00324, AA permease, Amino acid permease	26	0.16%	20	1.4641	17.75798	0.11%	19
gnl CDD 41783	pfam01753, zf-MYND, MYND finger	25	0.15%	23	1.4288	17.49737	0.11%	20

a – Number of CDD entry

b – Number and description of PFAM domain

c – Number of gene models containing each CDD-PFAM domain

d – Percentage of gene models containing each CDD-PFAM domain in relation to total number of *M. perniciosus* gene models (proteins).

e – Non-normalized CDD-PFAM ranking

f – Factor used to normalize the number of gene models containing each CDD-PFAM domain (see methods)

g – Normalized number of gene models containing a CDD-PFAM domain

h – Percentage of normalized number of gene models containing each CDD-PFAM domain in relation to total number of *M. perniciosus* gene models (proteins)i – Normalized *M. perniciosus* CDD-PFAM ranking

Detoxification and general resistance mechanisms: cytochrome P450 monooxygenases, efflux transporters and anti-oxidative apparatus

Based on CDD-PFAM and MCL analyses gene members of the cytochrome P450 monooxygenase superfamily are prevalent in the genome of *M. perniciosa* (Tables 4 and 5; Additional File 3 – Worksheet P450; Additional File 4). Cytochrome P450 monooxygenases play a role in hydroxylation and oxidation processes involved in biosynthesis and degradation of different compounds [50]. Therefore, a large number of gene models similar to cytochrome P450 monooxygenases suggest a significant capacity for synthesis of secondary metabolites, such as hormones or toxins, and for detoxification. Among the fungi analyzed, *M. perniciosa* has the highest number of cytochrome P450 monooxygenase genes (188 gene models) representing 1.15% of the gene models (Fig. 5A). Saprotrophic basidiomycetes *P. chrysosporium* and *C. cinerea* and the hemibiotrophic ascomycetes *Magnaporthe grisea* and *Fusarium graminearum* also have more than one hundred cytochrome P450 monooxygenase genes representing between 1.25% and 0.9% of their gene models (Figure 5A; Additional File 4). The basidiomycete *L. bicolor* (an ectomycorrhizal fungus) and the ascomycete *Neurospora crassa* (a fire-scoured landscape colonizer) follow with fewer genes. *U. maydis* (a biotrophic pathogen), *C. neoformans* (an animal pathogen) and *S. cerevisiae* (a fermentative fungus) have the fewest cytochrome P450 monooxygenase genes of the fungi compared in this study (Fig. 5A; Additional File 4). This analysis clearly demonstrates the prevalence of cytochrome P450 monooxygenases in saprotrophic and hemibiotrophic fungi, which have to hydrolyze complex wood polymers and deal with a highly oxidative environment. As discussed by Gonzalez and Nebert [50], cytochrome P450 monooxygenase polymorphisms may be the product of the "molecular warfare" that occurs during the co-evolution of preys and predators, which produce toxins and detoxifying genes, respectively. This logic can be extrapolated to the plant-fungus interaction, and in that sense, we believe that the plethora of cytochrome P450 monooxygenases in *M. perniciosa* may be critical to detoxification and environmental adaptation as well as for disease development.

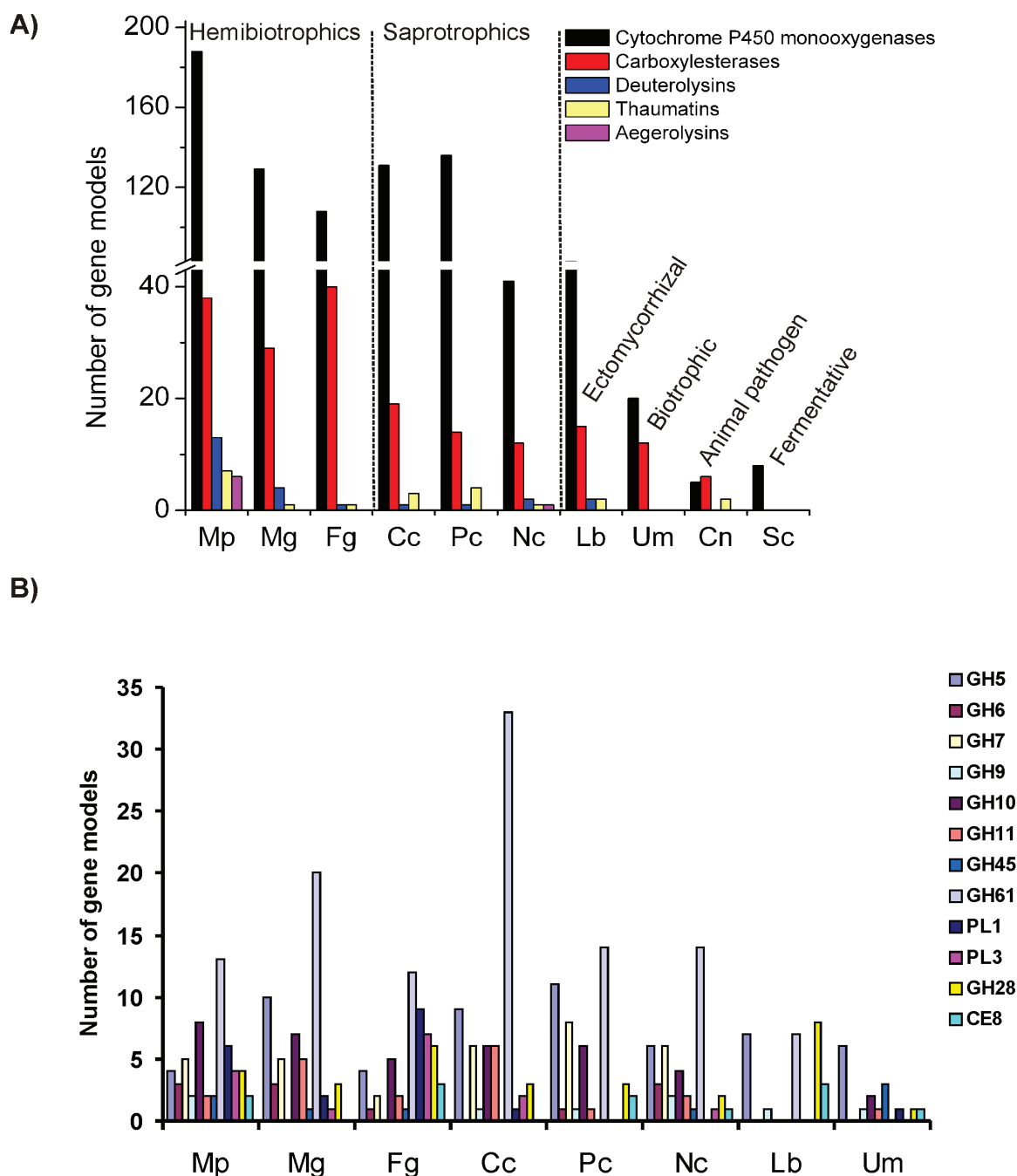
Another set of proteins related to detoxification processes are the efflux transporters. Similarity searches in the Transport Classification Database (TCDB – <http://www.tcdb.org>) [51] which compare the genome of *M. perniciosa* with other fungal genomes (Additional File 3 – Worksheet Functional annotation and Worksheet Transporters) verified an extended set of efflux transporters from classes 3.A.1 (ABC superfamily) and 3.A.3 (P-type ATPase Superfamily). The majority of ABC transporters identified in *M. perniciosa* belong to the Pleiotropic Drug Resistance (PDR) family and the ABC Conjugate (ABCC)

Transporter family. These proteins have been associated with fungal pathogenesis [52] and heavy metal resistance [53]. The members of P-type ATPase superfamily in *M. perniciosa* include phospholipid translocating ATPases family and fungal ENA-ATPases transporters, which are involved with the efflux of excessive Na⁺, and especially K⁺, encountered by fungi during colonization of plants [54].

During the plant defense, reactive oxygen species (ROS) are produced to limit the pathogen invasion [55]. However, pathogenic fungi produce antioxidant enzymes that enable them to neutralize host ROS. *M. perniciosa* contains a myriad of O₂⁻ and H₂O₂ decomposing enzymes such as superoxide dismutases, catalases, peroxiredoxins, glutathione-system, thioredoxin-system enzymes and manganese dependent peroxidases (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). Therefore, this fungal genome harbors a complete ROS detoxification system. Reports indicate that H₂O₂ favors necrotrophic pathogens infection [56,57]. Furthermore, *M. perniciosa* produces calcium oxalate crystals (COC) [58], and a cacao susceptible genotype accumulates COC during *M. perniciosa* infection, followed by a programmed cell death (PCD) [59]. The degradation of COC produces carbon dioxide and H₂O₂, suggesting that COCs can be important to necrotrophic mycelia development. In addition, oxalate chelates Ca²⁺, an important secondary plant defense messenger and a key cross-linker of pectin in the middle lamella pectin [60], and was found to be a trigger of PCD in plants [61]. These findings suggest that oxalate favors *M. perniciosa* infection by disorganizing plant defense and plant cell wall structure, by facilitating the action of fungal pectinases and possibly triggering PCD in the later stages of WBD [59].

Genome variability: Mating-type genes and transposable elements

Seven *M. perniciosa* gene models were found to be similar to pheromone receptors (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). As a primary homothallic fungus, *M. perniciosa* does not use its mating type system to outcross, but probably to promote the formation of clamp connections, hyphae dikaryotization and for the expression of pathogenicity genes as in *U. maydis* [62]. Previous reports have indicated that *M. perniciosa* exhibits high genetic variability at the molecular level [11,63,64]. This level of variability may be the reason *M. perniciosa* overcomes resistant genotypes of cacao, such as Scavina 6 [65]. Furthermore, it has been postulated that the genome variability found in homothallic *M. perniciosa* may be due to transposable elements (TEs) and ectopic recombination guided by the numerous copies of these elements found in the genome [10]. The fact that retrotransposons were identified in EST libraries and differentially expressed dur-

**Figure 5**

Comparison of *M. perniciosa* protein families with other fungi. (A) comparison between cytochrome P450 monooxygenases, carboxylesterases, deuterolysins, thaumatin and aegerolysins; (B) comparison of plant cell wall degrading enzymes from fungi that interact with plants. Mp = *Moniliophthora perniciosa*, Lb = *Laccaria bicolor*, Cc = *Coprinopsis cinerea*, Pc = *Phanerochaete chrysosporium*, Um = *Ustilago maydis*, Mg = *Magnaporthe grisea*, Cn = *Cryptococcus neoformans*, Fg = *Fusarium graminearum*, Nc = *Neurospora crassa*, Sc = *Saccharomyces cerevisiae*. The legend at the right refers to the nomenclature of plant cell wall degrading enzymes according to CAZy <http://www.cazy.org>.

ing *M. perniciosa* development [20], indicates that they are active elements, which could contribute to genetic variability. Among the *M. perniciosa* TE families, Gypsy-like retrotransposons were the most abundant, followed by *Copia*-like retrotransposons (Tables 4 and 5; Additional File 2; Additional File 3 – Worksheet Transposons). TEs similar to *P. chrysosporium* *Copia*-like elements were found in *M. perniciosa* genome inserted within putative cytochrome P450 monooxygenase genes [66]. Curiously, they were also inserted in a *P. chrysosporium* cytochrome P450 monooxygenase subfamily (Additional file 2 – family 255; Additional File 3 – Worksheet P450), suggesting that these TEs may have a common ancestral origin in Basidiomycota. Retroelements of the tyrosine recombinase (YR) order [67] and DNA transposons (class II transposons) from CACTA [68], hATC [69,70] and Tc/Mariner [71] superfamilies were also found. Finally, a previously described *Boto* DNA transposon [M.V. Queiroz *et al.*, unpublished data] from the PIF/IS5 superfamily [72] was also identified in a MCL family (Additional File 2 – family 251; Additional File 3 – Worksheet Transposons).

Plant Hormonal Disarrangement: Fungal genes related to plant hormones biosynthesis

There is growing evidence of phytohormones being produced by pathogens during some infective processes [73]. For instance, the production of gibberellins (GA); hormones involved in the regulation of stem elongation, seed germination, flowering and fruit maturation; have been identified in phytopathogenic bacteria and fungi that cause overgrowth symptoms, such as *Giberella fujikuroi* and *Sphaceloma manihoticola* [74,75]. A search for homologues of the fungal specific bi-functional ent-kaurene synthase (CPS/KS) responsible for the two-step cyclization of GGDP in fungi [76] identified gene models similar to the N-terminal domain of *G. fujikuroi* CPS/KS but did not detect any sequence similar to the C-terminal domain of this protein in *M. perniciosa*. Another gene model similar to CPS/KS that lacks the C-terminal domain was found in the *Aspergillus niger* genome (AM270241.1). Genes similar to GA-4 desaturase and GA oxidases (cytochrome P450), part of a GA biosynthesis gene cluster present in *G. fujikuroi* and *Phaeosphaeria* sp. were detected (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). Reinforcing our data mining discover, is the fact that a gibberellin-like compound was detected in basidiospores of *M. perniciosa* [77]. We can theorize that the production of GA by *M. perniciosa* may confer the hyperplastic phenotype of the green broom that resembles stem hyper-elongation caused by GA-producing phytopathogens.

Another interesting discovery in the *M. perniciosa* genome is the presence of genes encoding enzymes of two biosynthetic pathways of indole-3-acetic acid (IAA), the most abundant natural plant auxin. We found a gene similar to

plant nitrilases (E.C 3.5.5.1) which catalyzes the direct conversion of indole-3-acetonitrile into ammonia and IAA. Additionally, potential genes for the IAA-producing tryptamine pathway (one tryptophan decarboxylase, copper amine oxidases and a hypothetical indole-acetaldehyde oxidase) were found (Fig. 6; Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). Furthermore, a manual annotation of EST libraries reveal the presence of an aromatic amino acid aminotransferase, which could make part of Indole-3-pyruvate IAA biosynthetic pathway (Fig. 6). IAA regulates many plant biological processes including cell elongation and fruit ripening. Recently, the presence of IAA in *M. perniciosa* basidiocarps was reported [78]. IAA is produced by other fungal phytopathogens such as biotrophics *U. maydis* and *Taphrina deformans* and hemibiotrophic *Colletotrichum gloeosporioides* sp. [79-81], and induces filamentation and invasive growth in *S. cerevisiae* [82]. Curiously, both Gibberellin and IAA induce fruit parthenocarp and act synergistically in plant organ expansion [83], both of which are traits of WBD.

Cacao plantlets inoculated with *M. perniciosa* spores emit higher levels of ethylene during the late stages of infection than non-inoculated plants [13]. The plant hormone ethylene stimulates elongation at low concentrations, and senescence, fruit ripening, and epinasty at high doses [84]. Auxins stimulate the synthesis of ethylene [85], which together with gibberellins have integrated actions in plant cell death [86] and stem elongation during phytochrome-mediated shade avoidance, a phenomenon that occurs in response to the low red to far-red light ratios (R:FR) under dense canopies [87]. We hypothesize that in a dense and shaded environment, such as a cacao plantation, the low R:FR ratio effects can be increased by the action of the aforementioned phytohormones, explaining the shade

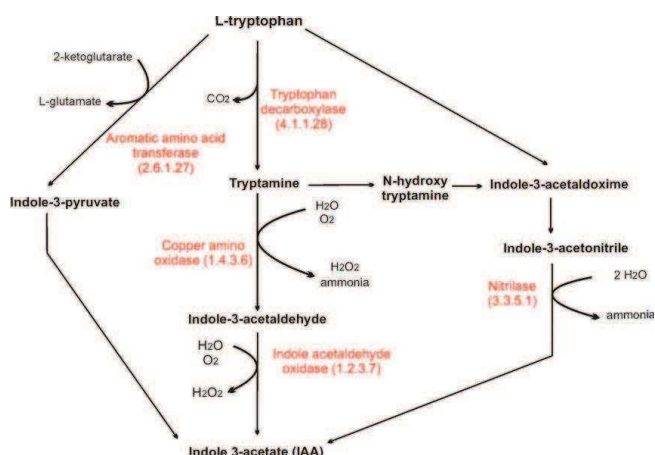


Figure 6
Indole-3-acetate (IAA) biosynthesis pathways. *M. perniciosa* gene models are annotated in red.

avoidance, hypertrophy, and elongation of green brooms. The presence of genes related to plant hormones production in *M. pernicioso* supports previous data [77,78] and suggests that this fungus can influence the plant metabolism and defense, by altering hormonal balance during infection [73,88].

Pathogenicity: Fungal effectors and pathogenicity associated proteins

As a pathogen that colonizes the plant apoplast during its biotrophic stage, *M. pernicioso* may release elicitor or effector proteins into the extracellular medium, which in turn could evade or suppress the plant defense response. Throughout WBD, *M. pernicioso* produces proteins with the potential to kill plant cells, thereby releasing their contents, which are absorbed by the fungus during its saprotrophic stage. Thus, *M. pernicioso* uses a varied arsenal of effector proteins in order to complete its infection cycle. Although some phytopathogenic fungi deliver effector proteins into the cytoplasm by means of haustoria [89,90] this type of structure is absent in *M. pernicioso*. Therefore it is possible that this fungus secretes these proteins into the apoplast, as has been described for other fungi [91]. Effector proteins that are recognized by plant resistance (R) proteins are known as *avr* proteins. No orthologues to the known Ascomycota *avr* genes, not even the *U. maydis* genes contained in "biotrophic clusters" [92], were found in the genome of *M. pernicioso*. However, *ab initio* gene prediction with peptide signal analysis revealed 70 "no hits" small proteins containing secretion signals and at least two cysteines (see methods, Additional File 6), which is a common trait of many proteins that are delivered into the host apoplast by phytopathogens [93]. In order to validate 22 selected *ab initio* predictions, we conducted RT-PCR using RNA from *M. pernicioso* saprotrophic mycelia. We validated the expression of 13 gene models out of 22 tested, all of which contained secretion signals (Additional File 7 – Primers No Hits Cys protein). Possibly, the gene models that were not confirmed by RT-PCR are expressed in other developmental stages of the fungus (basidiome, spore, etc.). Additional File 8 depicts the amplification of three of these genes. Whether these proteins play a role in the pathogenicity of *M. pernicioso* or in elicitation of cacao defense remains to be elucidated.

M. pernicioso contains Necrosis and Ethylene inducing proteins (NEPs) and cerato platanins [19,94], which can act in conjunction with a series of proteinases, hemolysin-like proteins and carboxylesterases/lipases found in the genome (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). These proteins appear to be part of the destructive arsenal of *M. pernicioso*. The most abundant proteinases in the genome of *M. pernicioso* are deuterolysins, a type of fungal metalloproteinases that are similar to bacterial thermolysin [95]. Compared to other fungi indicates that *M. pernicioso* has a deuterolysin expansion (13 gene

models; Fig. 5A; Additional File 4), suggesting an important role for these proteinases during this fungus development.

We also identified a gene family similar to agaricales *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe aegerita* hemolysin-like aegerolysins. These proteins have cytolytic properties [96] and seems to play an important role at the initial phase of fungal fruiting by making the fungal membranes permeable during cell signaling [96]. *M. pernicioso* genome contain a family of aegerolysins (6 aegerolysins; Fig. 5A; Additional File 4). None of the other agaricales fungi analyzed (*L. bicolor*, *C. cinerea* and *P. chrysosporium*) contain these proteins. Even though we could not assess the genomic data of the basidiomycete containing aegerolysins, we suggest that the diversification of these proteins in WBD causative agent indicates their importance in *M. pernicioso* development or even in fungi defense and infective process.

Carboxylesterases and lipases are overrepresented in *M. pernicioso* (Tables 4 and 5; Additional Files 2 and 4). According to CDD-PFAM, *M. pernicioso* have 38 gene models annotated as carboxylesterases, approximately twice the number of such proteins in other basidiomycete (ectomycorrhizal *L. bicolor* (15); saprobes *C. cinerea* (19) and *P. chrysosporium* (14); and biotrophic *U. maydis* (12); Figure 5A; Additional File 3); while the hemibiotrophic ascomycete *F. graminearum* and *M. grisea* have 40 and 29 carboxylesterases, respectively. We postulate that the great number of carboxylesterases and lipases in *M. pernicioso*, *F. graminearum* and *M. grisea* is related to their hemibiotrophic lifestyle. In fact, these enzymes are induced during carbon and nitrogen starvation [97], and cell wall degradation [98], two events that occur during hemibiotrophism.

Other genes associated with the plant-pathogen interaction found in our analysis were similar to the SCP-like superfamily proteins, which comprise pathogenesis related (PR) proteins of family 1 (PR-1). Additionally, gene models similar to PR-5/thaumatin superfamily were also detected in the *M. pernicioso* genome (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). PR proteins are well described as associated with defense reactions in plants against various pathogens [99]. For instance, transgenic plants overexpressing PR-1 proteins were more resistant to oomycete infection [100] and some Thaumatin-like proteins (TLPs) have β -glucanase activity, inhibit xylanase and have antifungal properties [101-103]. Recently, proteins similar to PR-1 and thaumatin have been characterized in animals and fungi [104,105], indicating a conserved and important role in diverse organisms. Based on CDD-PFAM analysis, *M. pernicioso* contains the largest number of thaumatins of any fungus sequenced, so far (7 thaumatins, Fig. 5A; Additional File 4).

Both PR-1 and PR-5 are induced by salicylic acid (SA) in plants [99]. Curiously, the *M. perniciosus* necrotrophic (saprotrophic) mycelia were found to produce and have tolerance to SA in axenic cultures [70]. Plants with WBD have a higher content of SA when compared with healthy plants [106]. *M. perniciosus* tolerance to SA could be explained by the expression of genes encoding salicylate hydroxylases, which were also detected in the genome (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). In this scenario, high levels of SA could block the synthesis of jasmonic acid (JA), a defense compound against necrotrophic pathogens that acts as a necrosis inducer, thus rendering the plant susceptible to the spread of *M. perniciosus* [78,106]. In addition, it is possible that SA and SA-induced proteins (i.e., PR-1, PR-5) may act to limit competition from other microbial competitors during WBD progression, which would be an important component of the *M. perniciosus* pathogenicity strategy.

Colonization: Plant cell wall degrading enzymes (PCWDE)

Degradation of hemicellulose, cellulose, pectin and depolymerization of lignin are some of the mechanisms that necrotrophic fungi use to colonize plant tissues [107]. We identified genes encoding enzymes involved in degradation of hemicellulose and cellulose, including β -1,4 cellulases, exocellobiohydrolases, endo-beta-1,4-xylanases and endoglucanases; genes encoding lignolytic enzymes including manganese dependent peroxidase and multicopper polyphenoloxidases (laccases); and genes encoding enzymes involved in pectin degradation, such as pectate lyases, polygalacturonases (pectinases) and pectin methylesterases (pectinesterase) (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). *M. perniciosus* have an arsenal of plant cell wall degrading enzymes that is similar to that found in the hemibiotrophic pathogens *F. graminearum* and *M. grisea* (Fig. 5B; Additional File 9). Biotrophic *U. maydis* and symbiont *L. bicolor* have a minimal set of PCWDEs what is in accordance with their lifestyle (Fig. 5B; Additional File 9).

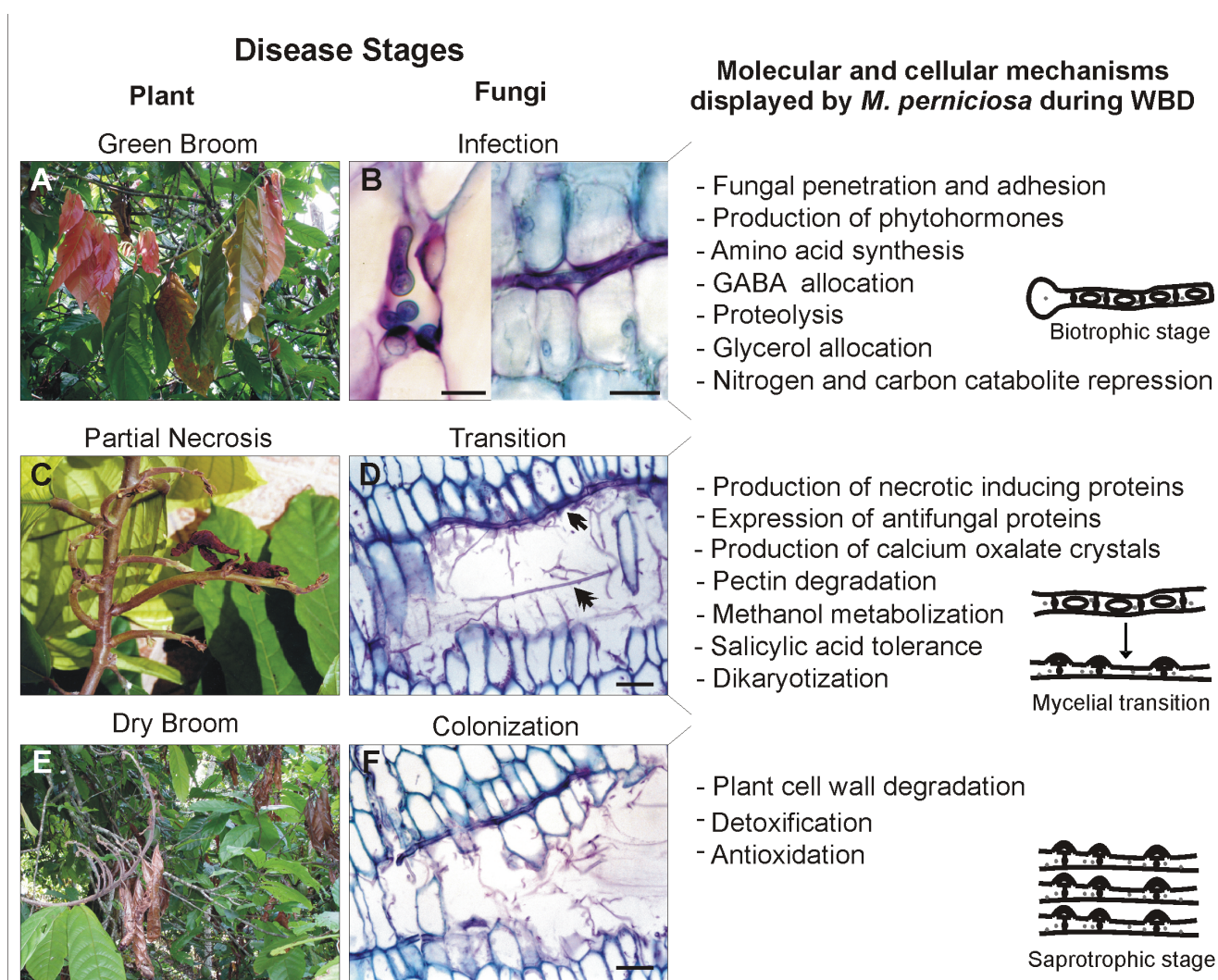
Pectate lyases (PL1 and PL3 according to CAZy nomenclature – <http://www.cazy.org>) cleave pectin, an essential component of plant cell walls. Among the fungi analyzed, *F. graminearum* and *M. perniciosus* contain the largest number of PLs (Fig. 5B; Additional File 9). Unlike *M. grisea*, the other hemibiotrophic analyzed, *F. graminearum* and *M. perniciosus* does not have specialized structures (appressoria) for non-enzymatic penetration of plants, and colonizing the apoplast by breaching the middle lamella barrier (Fig. 7). In addition, both are able to infect dicotyledons that contain cell walls with larger amounts of pectin than monocots [108]. This analysis suggests that PLs have an important role for pathogens that colonize the apoplast of dicotyledons.

Insights into *M. perniciosus* intermediary metabolism and WBD development

Pathogen energy status and the acquisition of host metabolic compounds by the pathogen are factors that determine the outcome of disease onset. Therefore, enzymes of *M. perniciosus* involved in intermediary metabolism (i.e., reactions concerned with storing and generating metabolic energy) may have an important role during WBD (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). During the first stages of WBD, *M. perniciosus* may encounter a nutrient-poor and extreme oxidative environment containing host defense molecules, such as nitric oxide (NO), an inhibitor of the cytochrome respiratory pathway [109]. Under these conditions, the activity of a NO tolerant alternative oxidase (AOX) may constitute a critical bypass mechanism for the cytochrome pathway [110-112]. A single copy of AOX was detected in *M. perniciosus*, and preliminary experiments indicate that this gene has a higher expression in fungi grown in nutrient-poor media (data not shown).

Following this scenario, in the low-energy status represented by the biotrophic phase, AOX may provide NAD⁺ for the turnover of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle (TCA) and the peroxisomal glyoxylate cycle (GLOX). Many reports have documented the importance of GLOX for phytopathogens during host infection [113-115]. All genes coding for proteins of this enzymatic pathway are present in the genome of *M. perniciosus*, including the key enzymes isocitrate lyase and malate synthase (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation).

Curiously, *M. perniciosus* is able to use methanol as the only carbon source (data not shown), indicating that this fungus may have a methylotrophic metabolism. Methylotrophism have been extensively studied in methylotrophic yeasts such as *Pichia angusta* and recently methanol oxidases (MOX) have been described in filamentous fungi such as *C. fulvum* [116] and wood-degrading basidiomycete *Gloeophyllum trabeum* [117]. A gene encoding a MOX was identified in *M. perniciosus* genome (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). Interestingly, this gene was previously detected as being overexpressed in biotrophic-mycelia [20]. The methanol catabolism enzymes formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation) were also found in the genome, which provides evidence that *M. perniciosus* indeed hydrolyzes methanol. Methanol is, possibly, derived from the first step of pectin hydrolyzation performed by the cell wall degrading enzyme pectin methylesterase [118], or from demethylation of lignin that occurs after manganese peroxidase and/or laccase action [117]. We can not discount the possibility that the biotrophic fungi can use the methanol produced by pectin metabolism during normal

**Figure 7**

An illustrated hypothetical model for WBD. Model correlating classical symptoms of green and dry broom in the field (A, C and E), *M. pernicioso* development inside cacao (B: biotrophic stage, D: transition from biotrophic to saprotrophic stage, F: saprotrophic stage) and molecular and cellular events displayed by the fungus in each developmental stages, based on genes annotated in genome survey (right side of the panel). Notice in B (right side) the presence of biotrophic mycelia in the apoplast surrounded by intact living cells. Also notice in C the presence of biotrophic mycelia (arrowhead) and saprotrophic mycelia (double arrowhead) inside a necrotic region. Micrographs scales: B left side: 15 μ M; B right side: 25 μ M; D: 50 μ M; F: 50 μ M.

cell wall synthesis in early stages of plant expansion [119]. The possibility that *M. pernicioso* is methylotrophic resembles the methyllobacteria nutritional strategy, which provides an ecological advantage over non-methylotrophic microorganisms present in the phyllosphere [120].

Previous data indicated that the utilization of glycerol, instead of fermentable sugars (i.e., glucose), is an important environmental clue for the maintenance of the biotrophic stage [18,121]. Accordingly, our group detected higher amounts of glycerol during the biotrophic fungal phase of the green brooms development than in dry brooms [13]. Additionally, *in vitro* assays showed that the

shift from glucose to glycerol media increased anti-oxidative defenses of *M. pernicioso* mycelia [122]. This result correlates well with green broom environment (high content of glycerol and ROS) raising the possibility that glycerol is a critical metabolite during the initial stages of the disease cycle. Genes involved in glycerol metabolism and uptake are present in *M. pernicioso*, including a biotrophic induced aquaglyceroporin transporter [20] (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation), suggesting that this fungus is able to acquire extracellular glycerol.

After 35 days of WBD, glucose levels increase again, concomitant with a reduction in starch levels [13]. We found

a gene model similar to a secreted glucoamylase in the *M. perniciosa* genome (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). Gibberellin is an inducer of α -amylase production [123]. We can envisage a disease scenario in which the fungus produces an extracellular amylase and hormones (i.e., gibberellin) that triggers plant amyolytic activity, which then decrease starch content. The resulting glucose can be utilized by the plant since at this stage the green brooms/infected tissues are rapidly growing or even be acquired by the pathogen at the transition phase between biotrophic and necrotrophic stages.

Nitrogen starvation also appears to be a factor that influences the biotrophic lifestyle [124] and is associated with the expression of pathogenicity genes and PCWDE, mainly in hemibiotrophic and biotrophic fungi that deal with nutrient deprivation during early infection [125]. Our data from microarray and EST analysis suggests that nitrogen catabolite repression (NCR) occurs in *M. perniciosa* by the induction of GABA permease, tRNA synthetases and AROM protein [20]. As reported previously [20] *M. perniciosa* contains a gene homologous to *CLNR1* from the hemibiotrophic fungus *C. lindemuthianum* (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation), a global nitrogen regulator that belongs to the AREA/NIT2 family. *CLNR1* activates enzymes and transporters that enable uptake and catabolism of secondary nitrogen sources [126]. The depletion of *CLNR1* impaired the fungal switch to necrotrophy [124], emphasizing the importance of nitrogen catabolism in hemibiotrophic development. Our genomic data mining identified a gene similar to *NPR2*, which encodes a regulatory protein that may act upstream of the AREA/NIT2 protein (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). *NPR2* is required for the expression of the *M. grisea* pathogenicity gene *MPG1* [127]. In addition, genes that encode enzymes involved in alternative nitrogen sources uptake (i.e., GABA transporter, urea permease and nitrate transporter) and metabolism (i.e., urease, nitrate reductase, nitrite reductase, arginase and uricase) were identified (Additional File 3 – Worksheet Functional Annotation). The presence of such genes in *M. perniciosa* genome indicates that this fungus could allocate and utilize alternative nitrogen sources in the absence of preferential nitrogen sources (glutamine and ammonia) reinforcing our hypothesis that *M. perniciosa* suffers NCR during early stages of WBD.

Conclusion

Our analysis of the *M. perniciosa* genome survey yielded interesting insights and clues into the molecular mechanisms underlying WBD. As far as we know, this is the first phytopathogen included in the order Agaricales sequenced. Therefore, our results support the investigation of pathogenicity mechanisms among Agaricales and Basidiomycete. In addition, we provide an approach for normalization of gene family data in a genome survey that

can aid the genomics community interested in functional analysis in incomplete genome data.

Based on annotated fungal genes from this report and from previous other studies, we designed a hypothetical model for WBD that correlates plant phenotype changes that happen during the disease with the developmental progression of *M. perniciosa* (Fig. 7).

After penetration and adhesion to the plant, the biotrophic fungus slowly grows inside the apoplast causing a series of phenotype changes in cacao, such as hypertrophy and hyperplasia, phototropism and epinasty, by secreting phytohormones that unbalance cacao metabolism (Fig 7A and 7B). In addition, *M. perniciosa* has to deal with nitrogen deprivation in the apoplast, which signals the production of proteins related to the acquisition of alternative nutrient sources, proteolysis and amino acid synthesis. Furthermore, the fungus takes advantage of the increasing content of glycerol in the green broom, an important cue for biotrophic stage maintenance, by expressing aquaglyceroporins. As previously discussed [13], the starch accumulated in early stages of green brooms seems to be metabolized to glucose, which suggests an amyolytic activity exerted by fungi and/or by plant amylases. This increase of glucose is not accompanied by an increase of fructose, but by a sucrose augmentation. Since photosynthesis is not increased during WBD, we suggest that sucrose is translocated from other tissues to the green brooms. Therefore, we hypothesize that these mechanisms cause a source-to-sink transition in stem, turning green brooms into a drain of nutrients.

After numerous physiological and biochemical changes in the plant, which may be caused by the fungal infection, there occurs a transition from the biotrophic to the saprotrophic lifestyle (Fig. 7C and 7D). This change could result from the increase of nutrients in the fungal environment and may be controlled by an AREA/NIT2-like regulator. During this transition phase, the plant displays the beginning of necrosis at the distal portion of the leaves that could be due to the action of NEPs and cerato-platanins that are expressed in the biotrophic hyphae. In addition, *M. perniciosa* produces PCWDEs, such as pectinases, whose action aids the fungus in breaching the middle lamella barrier. Pectin degradation releases methanol, which in turn could be used by *M. perniciosa* as a carbon source, through the action of a MOX and other methanol metabolizing enzymes. Moreover, the calcium released from pectin disruption could be scavenged by the oxalate synthesized by the fungus, a compound that triggers cell death. The release of cell content during necrosis, and the probable aforementioned source-to-sink transition, may influence, or even be indispensable to the *M. perniciosa* switch from biotrophism to saprotrophism. Thus, the postulated carbon and nitrogen catabolite repression dis-

played by the biotrophic mycelia would be switched off, thus causing the mycelial change to its invasive dikaryotic/saprotrophic stage.

During disease progression, and mainly during colonization of saprotrophic hyphae, *M. perniciosa* must deal with an intense oxidative environment. Based on our analysis this stress can be overcome by the action of several antioxidative and detoxifying enzymes. Furthermore, we believe that *M. perniciosa* exerts a negative control on plant defense against necrotrophic/saprotrophic fungi by producing salicylic acid, which would limit competition by other fungi by the action of antifungal proteins. Finally, after alternating wet and dry periods, the formation of the basidiomes produced by saprotrophic hyphae occurs.

Latin American cacao crops suffer tremendous damages caused by WBD, which mainly affects small acreage farmers. Such impact in the relatively primitive cacao cultivation system not only affects the socio-economic status of farmers but also the preservation of the rainforest. The demand for strategies that limit cacao diseases requires an intense effort in understanding the pathogenicity and plant resistance mechanisms. Further sequencing projects of cacao and its pathogens will serve as a background for the integration of transcriptomics, proteomics and metabolomics of these species in a systems biology approach. Such initiatives will provide tools for biological control, crop management and cacao biotechnology to combat cacao diseases. We believe that our report is the first step towards such an integrative initiative and provides insights into the molecular mechanisms of WBD which can aid the cacao's WBD-concerned community to develop control strategies for this plant-fungus interaction.

Methods

Biological material, libraries construction and sequencing

Total DNA was extracted from saprotrophic hyphae of *M. perniciosa* strain FA553 (CP02) maintained in Malt Yeast Extract Agar (Difco) at 27°C. DNA was extracted from grounded mycelia by incubation in CTAB buffer (CTAB 3%, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM pH 8.0, Tris-HCl 10 mM pH 8.0, PVP 1.0%, β -mercaptoethanol 0.2%) at 65°C during 30 min; followed by one phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25/24/1) wash, precipitation with sodium acetate pH 5.2 (0.1 Vol) and cold 100% ethanol (2 Vol). DNA was eluted in deionized water and sheared by nebulization and sonication into fragments of approximately 2 Kbp, which were size selected on agarose gels and purified with S.N.A.P. Gel Purification Kit (Invitrogen – Life technologies, USA). DNA fragments were blunt-end ligated into the pCR4Blunt plasmid (Invitrogen – Life technologies, USA). Approximately 50 genomic libraries were constructed, each one corresponding to individually

growing cultures. Sequencing was done in an ABI Prism 3700 sequencer (Applied Biosystems, USA).

Clustering

The resulting chromatograms were submitted to the *M. perniciosa* database and subjected to automatic base calling using the software PHRED [128]. The contaminating vector sequences and low quality shotgun reads, without at least 100 bp with phred note ≥ 16 were trimmed by using the program LUCY [129]. Shotgun reads showing significant sequence similarity (BLASTn, E-value $\geq 1E-30$) with *M. perniciosa* mitochondrial sequences (see above) were removed from subsequent assemblies. The clustering and assembly were performed using the software PHRAP <http://www.phrap.org>. Afterwards, low quality regions of singlets previously evaluated by LUCY (the last window of 10 bp that has an average probability of error given by phred ≤ 10) were trimmed. The remaining clusters were subjected to similarity searches against the NCBI non-redundant protein and nucleotide database using the BLASTx and tBLASTx, respectively, with an E-value cutoff of 1E-5.

Genome Length Statistical Validations

Statistical analyses of the genome length were performed using two approaches. The first one was based on the Dog genome survey using counting of start positions offsets for overlapping reads [31] (for further details see Additional File 1). The second was based on Lander Waterman Theory, [34] and their applications [35,36], which estimate the theoretical values of expected number of clusters (contigs + singlets), contigs, gaps, average cluster size and average gap size, using the effective average read length (L), the total number of reads in the assembly (N) and the estimated genome size (G). L is the average number of base pairs of a read that contributes to the contig through parsing of ace file <http://www.phrap.org>. In our analysis L was equal to 550 bp. In order to estimate the gap size distribution in the *M. perniciosa* genome survey, we performed a comparison between a set of eukaryotic core protein (generated by CEGMA pipeline [37]) and *M. perniciosa* contigs using TBLASTN with threshold of 1e-10 for the E-value (Further details in Additional File 1). The estimation of misassembled sequences due to repetitive regions in the genome was performed using the integrated pipeline amosvalidate [38] (Further details in Additional File 1).

Gene Finding

EST against genome alignments

The alignment of ESTs with genomic sequences was performed using the package GeneSequer [130] with the pre-built *Aspergillus* intron model. 300 highly confident introns were selected and used as an input for Exalin program [39] that is able to build a splice site model for an organism. The positions of the splice sites as assigned by

Exalin were used to rank overlapping gene predictions (see below).

Ab initio gene models prediction

The *ab initio* gene models prediction was performed with the trainable, open source gene predictors AUGUSTUS [40], SNAP [41] and GENEZILLA [42]. Ten copies of an artificial sequence of 240 Kbp (total of 2.4 Mbp) formed by the concatenation of the *M. perniciosus* ESTs coding regions, together with a *C. cinerea* gene dataset containing 1.2 Mbp were submitted to "pre-training" in AUGUSTUS gene predictor. *M. perniciosus* resulting predictions were compared with the protein databank NR using BLASTp. The predictions with similarities in NR, and with coverage $\geq 90\%$, were selected. After redundancy elimination, *M. perniciosus* gene models were used to train the three gene finders aforementioned. Predictions with less than 30 amino acids were eliminated, and the remaining predictions were grouped in overlapping clusters.

Ab initio gene models ranking

The predictions in each overlapping cluster were ranked according to the criteria used by the Fungal Genome Initiative at Broad institute <http://www.broad.mit.edu>. In each cluster, the "best" *ab initio* gene model according to the stipulated criteria was selected for functional annotation. The criteria for the ranking of the gene models were the following:

1. Manual annotation had priority over all other evidences;
2. Predictions with EST evidences had priority over the predictions without EST evidences;
3. If two predictions had EST evidences, the one with more splice sites in exact agreement with ESTs had priority;
4. Prediction with similarities with known proteins had priority. A prediction was considered to be similar to some known protein if it had an E-value of at most $1e-10$ (BLASTP against NR+*Phanerochaete chrysosporium* protein set);
5. If two predictions had similarity with known proteins, the one with better coverage score had priority. The coverage score was defined as $2 \times CP \times CH / (CP + CH)$, where CP is the coverage of the prediction and CH is the coverage of the similar protein;
6. In clusters without similarity with known proteins and without EST evidence, the priority was for AUGUSTUS, SNAP and GENEZILLA, in this order. This criterion was chosen according to the performance of the three pro-

grams in a dataset of 60 genes structures visually inspected.

A final filter discarded gene predictions reported by only one program, without similarity to known proteins and without EST evidence.

Extrinsic gene models prediction

The extrinsic gene model predictions were performed by two methodologies. First, 17,991 contigs and 7,065 singlets were submitted to similarity analysis in a databank containing BLASTX-NR plus *Phanerochaete chrysosporium* proteins. The genomic regions containing homologues in this databank were selected and assigned as putative gene models. GenomeThreader [131] program was used to make protein-DNA spliced alignments between the BLAST first hit against and the genomic sequence, serving as a guide to delimit the start and stop codons and exon-intron boundaries of the regions of the contigs containing similarity with GenBank.

Concurrently, *M. perniciosus* ESTs aligned with genomic clusters (see above) were inspected to verify if the region in which they aligned contained a BLAST extrinsic prediction gene model. These extrinsic gene models (EST and BLAST) were compared with each other to evaluate the amount of gene models predicted by these methods. After these comparisons, the extrinsic gene models were divided into 4 datasets:

- (i) ESTMODELS: retrieved from the spliced alignments of the ESTs against the genomic clusters not covered to a BLAST extrinsic gene models prediction. Low score spliced alignments and ESTs that seen clearly to be UTR of a neighboring prediction were not included.
- (ii) BLASTMODELS: derived from BLAST extrinsic gene models predictions analysis covering genomic regions without EST evidence.
- (iii) COMBINEDMODELS: gene models derived from genomic sequence regions with BLAST hit and EST evidence.
- (iv) CURATEDMODELS: extrinsic predictions manually annotated for manual correction of merged or split predictions. The genomic survey and gene models nomenclature are depicted in additional file 10.

tRNA prediction

For tRNA prediction, the tRNAscan-SE program [132] was taken into account with the default parameters, which searched for conserved sequences and the characteristic secondary structure of tRNAs.

MCL-families clustering

MCL graph clustering algorithm was applied to generate *M. perniciosus* gene families using WU-TBLASTx "all against all" as the tool used for aligning the gene models [43].

Normalization of gene family data

The normalization of gene family data was performed by comparison between *C. cinerea* proteins and *M. perniciosus* gene models, using TBLASTN with 1E-10 of E-value threshold. The number of gene models similar to a *C. cinerea* protein was plotted according to protein length. The equation that estimates the number of gene models representing the same protein was generated using linear regression fitting. This equation was used to estimate a normalization factor to each MCL family and CDD-PFAM domain according to the average of protein length of their members.

Automatic Annotation and Metabolic Maps

The automatic annotation program AutoFACT [47] was used for functional annotation of gene models. The set of coding sequences from gene models were submitted to similarity searches against the UNIREF100, UNIREF90, NR, and KEGG databases using BLASTx (E-value $\leq 1E-5$) and against CDD-PFAM using RPS-BLAST (E-value $\leq 1E-5$) [48]. These results were submitted to AutoFACT, which searches for a consensus in the results and output descriptions and statistics about protein domains and families.

For an inference of *M. perniciosus* metabolic maps, we used Pathway Tools (version 11.0), a software of BioCyc databases [49], which generates a metabolic map from a previously annotated genome. The pathways that are probably present in the genome are imported from a reference database, following the Pathway Tools parameters [133]. The annotated genome input was obtained from EST manual annotation and from *M. perniciosus* gene models AutoFACT annotation, using as main information the product name and, if available, E.C. numbers. Metabolic pathways of interest were manually annotated for the elimination of false positives.

The analysis of transporters was made based on a BLASTX search of *M. perniciosus* gene models and other fungal genes against TCDB (Transport Classification Database – <http://www.tcdb.org>), using a threshold of E-value 1E-05. All classes from third level that contained at least one species with 2% or more of representations were separately represented in the results.

Selection and expression confirmation of no hits *ab initio* gene models

The selection of *ab initio* gene models was performed using a SQL query wizard. As input, we ask for gene models without similarity in GenBank NR, which encoded

proteins that contained at least 2 cysteines and a signal peptide, previously identified by Signal-P 3.0 program [134]. 74 gene models were then selected and their nucleotide sequences were used as template for the design of primers nested in: (i) the sequence encoding the putative signal peptide (SPE); (ii) the sequence encoding the putative first amino acid of mature protein (MAT) and; (iii) the sequence containing the putative stop codon (END). The latter was designed in reverse complement ("reverse") to allow gene amplification using the other two primers ("forward"). RT-PCR analysis was performed to validate the expression of *ab initio* predicted gene models. RNA from saprotrophic mycelia was extracted using hot-phenol method with modifications [135]. Equal amounts of total RNA from CP02 saprotrophic mycelia cultures (24 h, 48 h, 4 days and 7 days) were mixed. After DNase (Invitrogen, USA) treatment, 2 µg of total RNA was reverse transcribed using Superscript RTII (Invitrogen, USA) in a total volume of 20 µL, following the manufacturer's instructions. PCR reactions were conducted according to primers (MWG, Imprint Genetics Corp) temperature of melting (TMs).

Abbreviations

ABC: ATP Binding Cassette; AOX: Alternative oxidase; bp: base pairs; COC: calcium oxalate crystals; CTAB: Cetyl trimethylammonium bromide; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; EST: Expressed Sequence Tag; FPR: Frosty Pod Rot; GA: Gibberellin; GABA: Gamma-aminobutyric acid; GGPP: Geranylgeranyl Diphosphate; IAA: indole-3-acetic acid; JA: Jasmonic acid; Kbp: One thousand base pairs; LW: Lander Waterman; Mbp: One million base pairs; MOX: Methanol oxidase; NAD(P): Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NCR: nitrogen catabolite repression; NEP: Necrosis and ethylene-inducing proteins; NO: Nitric oxide; PCD: Programmed cell death; PCWDE: Plant cell wall degrading enzymes; PVP: Poly(vinylpyrrolidone); ROS: Reactive oxygen species; RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; SA: Salicylic acid; PCR: Polymerase Chain Reaction; PR: Pathogenesis related protein; TCA: Tricarboxylic acid cycle; TE: Transposable Elements; TM: temperature of melting; tRNA: transfer RNA; UTR: untranslated region; WBD: Witches' Broom Disease.

Authors' contributions

JMCM conceived and wrote the article, was responsible for gene models annotation, gene density analysis, primer design and data interpretation. MFC conceived bioinformatics analysis and was responsible for genome assembly, BLASTs, statistical analysis and data interpretation. GGLC was responsible for gene models predictions, Genome Threader analysis, MCL clustering analysis and gene browser design and implementation. EFF participated in genome assembly, was responsible for transporters analy-

sis and annotation, and made figures edition. LPP was responsible for AutoFACT and BioCyc implementation and analysis. JR was responsible for EST library construction and sequencing and participated in genome annotation. CC, DMC, AFC and HC were responsible for *M. perniciosus* DNA extraction, genome shotgun, cloning and maintenance of genomic libraries. ROV was responsible for gene browser design and implementation, tRNA analysis and *M. perniciosus* sketches. RCE performed RT-PCR and aided in primer design. OG, DPTT BVO and MHM participated in genome annotation and were responsible for the characterization of genes encoding NEPs, AOX, MOX and auxin biosynthetic proteins, respectively. ABLP was responsible for EST library construction. MCSR was responsible for microscopic analysis. MRAR participated in genome assembly and in the development of bioinformatics tools. LABC, KPG, MSG, AGN and LBB were coordinators of sequencing groups. JPMN was responsible for sequencing and libraries maintenance. MJG and BAB participated in final manuscript elaboration and provided additional sequencing in order to close gene gaps. LWM participated in pathogenicity gene data interpretation and final manuscript elaboration. JCC was the co-coordinator of *M. perniciosus* genome project and coordinated UESC sequencing group. GAGP conceived and was the coordinator of *M. perniciosus* genome project, participated in data interpretation and in final manuscript elaboration.

Additional material

Additional file 1

Genome statistical validations. A) Estimation of genome length using dog genome survey protocol, B) Estimate of distribution of gap sizes in *M. perniciosus* genome assembly, C) Estimate of misassembly sequences due to repetitive regions.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-548-S1.pdf>]

Additional file 2

MCL analysis of *M. perniciosus* gene models. All predicted proteins were compared all-against-all using WU-TBLASTX. A score (-log (E-value)) for each pair of proteins (u, v) with significant BLAST hits (E-value $1e-5$) was assigned. The MCL algorithm (inflation parameter 2.0) was applied to find clusters in this graph. This method is fully automatic and protein clusters reported were not subjected to manual curation. ID: number of the MCL family; #members: number of gene models present in each family; Norm factor: factor used to normalize the number of gene models present in each family (see methods); Norm#members: normalized number of gene models present in each family. Annotation: words associated to each family after correlation of gene models with AutoFACT annotation. In parenthesis are the occurrence numbers of each word. Each worksheet shows the ranking of families using normalization factor (Rank Norm) or not using this factor (Rank Non Norm).

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-548-S2.xls>]

Additional file 3

Functional annotation of *M. perniciosus* gene models discussed in this paper. ID: gene model; First Hit (BLASTX-NR): Most similar sequence in GenBank; E-value: E-value of most similar sequence; AutoFACT annotation: automatic annotation by AutoFACT; AutoFACT E-value: E-value of AutoFACT annotation; EST: presence (Y) or absence of an EST aligned in this gene model; MCL family: family annotated by MCL analysis.

Worksheet P450: annotation of gene models similar to cytochrome P450 monooxygenases; Worksheet transposons: classification and annotation of gene models similar to transposable elements; Worksheet unknown gene families; annotation of top 20 MCL unknown gene families; Worksheet functional annotation: classification and annotation of gene models similar to efflux transporters, anti-oxidative enzymes, phytohormones biosynthesis related proteins, pheromone receptors, salicylate hydroxylases, effectors/elicitors/pathogenicity associated proteins, cell wall degrading enzymes and intermediary metabolism enzymes (cytochrome pathway bypass, Glyoxylate pathway and oxalate formation, glycerol uptake and metabolism, extracellular sugar degrading enzymes and nitrogen regulation, uptake and metabolism enzymes), EC = enzyme classification (<http://expasy.org/enzyme/>); Worksheet transporters; Relative percentage of transporters distribution in fungi genomes (see methods).

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-548-S3.xls>]

Additional file 4

Ranking of CDD-PFAM families annotated in *M. perniciosus*. Gene models were annotated based on CDD-PFAM-ID and ranked. This analysis was performed with other fungi genomes, which CDD-PFAM entries were classified according to *M. perniciosus* ranking. CDD-ID: CDD entry; PFAM Domain: PFAM entry; #Hits Domains: number of gene models containing each CDD-PFAM domain; %Hits Domains: percentage of gene models containing each CDD-PFAM domain in relation to total number of gene models containing a CDD-PFAM domain; %Hits PTN: Percentage of gene models containing each CDD-PFAM domain in relation to total number of *M. perniciosus* gene models; Rank: non-normalized *M. perniciosus* CDD-PFAM ranking; PTNS: proteins in each organism; Norm Factor: factor used to normalize the number of gene models containing each CDD-PFAM domain; # Hits Domains Norm: normalized number of gene models containing a CDD-PFAM domain; %Hits Domains Norm: percentage of gene models containing each CDD-PFAM domain in relation to total number of gene models containing each CDD-PFAM domain; %Hits PTN Norm: Normalized percentage of gene models containing each CDD-PFAM domain in relation to total number of *M. perniciosus* gene models; Rank Norm: normalized *M. perniciosus* CDD-PFAM ranking. Worksheets show the ranking of CDD-PFAM domains using normalization (Rank Norm) or not using normalization (Rank Non Norm).

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-548-S4.xls>]

Additional file 5

BioCyc comparison between *S. cerevisiae* and *M. perniciosus* metabolic pathways. Worksheet Compounds: Comparison of number of reactions in each organism containing the compounds described in the table; Worksheet pathways: Comparison of number of pathways in each organism present in each pathway class. The two largest top-level classes, Biosynthesis and Degradation/Utilization/Assimilation, are broken down further to show the distribution of pathways among their next-level subclasses.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-548-S5.xls>]

Additional file 6

Annotation of gene models with no similarity in BLASTX-NR encoding hypothetical small secreted proteins containing at least 2 cysteines. ID: gene model; # residues: number of amino acids of predicted protein encoded by the gene model; # cysteines: number of cysteines in predicted protein; Binomial RT; statistical analysis of cysteines presence in gene models (see methodological details in the file).

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-548-S6.xls>]

Additional file 7

Primers used in the amplification of no hits gene models encoding hypothetical small secreted proteins containing at least 2 cysteines. ID: gene model; Set of primers: Group of primers used for the amplification of a gene model. Primer sequence: sequence of primers (SPE – nested in sequence encoding the putative signal peptide; MAT – nested in sequence encoding the putative first amino acid of mature protein; END – nested in sequence containing the putative stop codon). Amplification: positive (Y) or negative (N); EST: presence (Y) or absence (N) of an EST aligned in this gene model; Length: length of amplicon in genomic and cDNA using two combinations of primers (SPE-END; MAT-END).

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-548-S7.xls>]

Additional file 8

Examples of amplifications of no hits gene models. PCR amplicons were run on 1% agarose gels. SPE: amplicons resulted from amplification with SPE and END primers; MAT: amplicons resulted from amplification with MAT and END primers; Ctl: water as template (control); Gen: genomic DNA as template; Glu: cDNA from saprotrophic mycelia grown in glucose as template; Cac: cDNA from saprotrophic mycelia grown in cacao extract as template; M: DNA molecular marker.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-548-S8.pdf>]

Additional file 9

Comparison of plant cell wall degrading enzymes in fungi that interact with plants. PFAM entries were correlated with the CAZy nomenclature <http://www.cazy.org> of plant cell wall degrading enzymes.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-548-S9.pdf>]

Additional file 10

Genomic survey sequences and gene models nomenclature.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-548-S10.pdf>]

Acknowledgements

We thank CENAPAD-SP (Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho de São Paulo) for data processing support, all sequencing technician for excellent technical assistance, especially Robson Dias (UESC – Brazil), Sulamita Freitas Franco (UNICAMP – Brazil) and Vitor Hugo de Almeida e Silva (UNICAMP – Brazil), and Dr. Francisco Javier Medrano for review and commentaries about the article. We are indebted to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico,

Projects 68.0032/2001-0 and 42.2279/2006-8), SEAGRI (Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária do Estado da Bahia), CARGILL/FUN-CAMP/UNICAMP convenio (number C. 3007), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support.

References

- Purdy LH, Schmidt RA: **Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology, and management.** *Annu Rev Phytopathol* 1996, **34**:573-594.
- Aime MC, Phillips-Mora W: **The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae.** *Mycologia* 2005, **97**(5):1012-1022.
- Griffith GW, Nicholson J, Nenninger A, Birch RN, Hedger JN: **Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao.** *New Zeal J Bot* 2003, **41**(3):423-435.
- Evans HC: **Cacao diseases – The trilogy revisited.** *Phytopathology* 2007, **97**(12):1640-1643.
- Pereira JL, Ram A, Figueiredo JM, de Almeida LC: **La primera aparición de la "escoba de bruja" en la principal área productora de cacao del Brasil.** *Turrrialba* 1989, **39**(7):459-461.
- Pereira JL, deAlmeida LCC, Santos SM: **Witches' broom disease of cocoa in Bahia: Attempts at eradication and containment.** *Crop Protection* 1996, **15**(8):743-752.
- Evans HC: **Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, Causal Agent of Witches Broom Disease of Cocoa.** *Trans Br Mycol Soc* 1980, **74**(Jun):515-523.
- Griffith GW, Hedger JN: **Dual culture of *Crinipellis perniciosa* and potato callus.** *Eur J Plant Pathol* 1994, **100**(6):371-379.
- Delgado JC, Cook AA: **Nuclear condition of basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius pernicius*.** *Can J Bot* 1976, **54**(1-2):66-72.
- Rincones J, Meinhardt LW, Vidal BC, Pereira GA: **Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*.** *Mycol Res* 2003, **107**(Pt 4):452-458.
- Rincones J, Mazotti GD, Griffith GW, Pomela A, Figueira A, Leal GA Jr, Queiroz MV, Pereira JF, Azevedo RA, Pereira GA, Meinhardt LW: **Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis perniciosa* from various plant hosts in South America.** *Mycol Res* 2006, **110**(Pt 7):821-832.
- Formighieri EF, Tiburcio RA, Armas ED, Medrano FJ, Shimo H, Carels N, Góes-Neto A, Cotomacci C, Carazzolle MF, Sardinha-Pinto N, Rincones J, Digiampietri L, Carraro DM, Azeredo-Espin AM, Reis SF, Deckmann AC, Gramacho K, Gonçalves MS, Moura Neto JP, Barbosa LV, Meinhardt LW, Cascardo JCM, Pereira GAG: **The mitochondrial genome of the phytopathogenic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* is 109 kb in size and contains a stable integrated plasmid.** *Mycol Res* 2008, **112**:1136-1152.
- Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella AW, Schiavinato MA, Cascardo JC, Pereira GA: **Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*.** *J Exp Bot* 2005, **56**(413):865-877.
- Gesteira Ada S, Micheli F, Ferreira CF, Cascardo JC: **Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis perniciosa*.** *Biotechniques* 2003, **35**(3):494-496. 498-500
- Pirovani CP, Carvalho HA, Machado RC, Gomes DS, Alvim FC, Pomella AW, Gramacho KP, Cascardo JC, Pereira GA, Micheli F: **Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease.** *Electrophoresis* 2008, **29**(11):2391-2401.
- Lima JO, dos Santos JK, Pereira JF, de Resende ML, de Araujo EF, de Queiroz MV: **Development of a transformation system for *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants.** *Curr Genet* 2003, **42**(4):236-240.
- Filho DF, Pungartnik C, Cascardo JC, Brendel M: **Broken hyphae of the basidiomycete *Crinipellis perniciosa* allow quantitative assay of toxicity.** *Curr Microbiol* 2006, **52**(5):407-412.
- Meinhardt LW, Bellato CM, Rincones J, Azevedo RA, Cascardo JC, Pereira GA: **In vitro production of biotrophic-like cultures of**

- Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*.** *Curr Microbiol* 2006, **52**(3):191-196.
19. Garcia O, Macedo JA, Tiburcio R, Zapparoli G, Rincones J, Bittencourt LM, Ceita GO, Micheli F, Gesteira A, Mariano AC, Schiavinato MA, Medrano FJ, Meinhardt LW, Pereira GA, Cascardo JC: **Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*.** *Mycol Res* 2007, **111**(Pt 4):443-455.
 20. Rincones J, Scarpini LM, Carazzolle MF, Mondego JMC, Formighieri EF, Barau JG, Costa GGL, Carraro DM, Brentani HP, Vilas-Boas LA, Oliveira BV, Sabha M, Dias R, Cascardo JM, Azevedo RA, Meinhardt LW, Pereira GAG: **Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the Witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*.** *Mol Plant Microbe Interact* 2008, **21**(7):891-908.
 21. Gesteira AS, Micheli F, Carels N, Da Silva AC, Gramacho KP, Schuster I, Macedo JN, Pereira GA, Cascardo JC: **Comparative Analysis of Expressed Genes from Cacao Meristems Infected by *Moniliophthora perniciosa*.** *Ann Bot (Lond)* 2007, **100**(1):129-140.
 22. Leal GA, Albuquerque PSB, Figueira A: **Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis perniciosa*.** *Mol Plant Pathol* 2007, **8**(3):279-292.
 23. Munch S, Lingner U, Floss DS, Ludwig N, Sauer N, Deising HB: **The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species.** *J Plant Physiol* 2008, **165**(1):41-51.
 24. Meinhardt LW, Rincones J, Bailey BA, Aime MC, Griffith GW, Zhang D, Pereira GA: ***Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe?** *Mol Plant Pathol* 2008, **9**(5):577-588.
 25. James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schussler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkman-Kohlmeier B, Spotts RA, Sordani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Budel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R: **Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny.** *Nature* 2006, **443**(7113):818-822.
 26. Bouck J, Miller W, Gorrell JH, Muzny D, Gibbs RA: **Analysis of the quality and utility of random shotgun sequencing at low redundancies.** *Genome Res* 1998, **8**(10):1074-1084.
 27. Branscomb E, Predki P: **On the high value of low standards.** *J Bacteriol* 2002, **184**(23):6406-6409. discussion 6409
 28. Fraser CM, Eisen JA, Nelson KE, Paulsen IT, Salzberg SL: **The value of complete microbial genome sequencing (you get what you pay for).** *J Bacteriol* 2002, **184**(23):6403-6405. discussion 6405
 29. Gardner SN, Lam MW, Smith JR, Torres CL, Slezak TR: **Draft versus finished sequence data for DNA and protein diagnostic signature development.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(18):5838-5850.
 30. Taudien S, Ebersberger I, Glockner G, Platzer M: **Should the draft chimpanzee sequence be finished?** *Trends Genet* 2006, **22**(3):122-125.
 31. Kirkness EF, Bafna V, Halpern AL, Levy S, Remington K, Rusch DB, Delcher AL, Pop M, Wang W, Fraser CM, Venter JC: **The dog genome: survey sequencing and comparative analysis.** *Science* 2003, **301**(5641):1898-1903.
 32. Green P: **2x genomes-does depth matter?** *Genome Res* 2007, **17**(11):1547-1549.
 33. Woolfit M, Rozpedowski E, Piskur J, Wolfe KH: **Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera* (*Brettanomyces bruxellensis*).** *Eukaryot Cell* 2007, **6**(4):721-733.
 34. Lander ES, Waterman MS: **Genomic mapping by fingerprinting random clones: a mathematical analysis.** *Genomics* 1988, **2**(3):231-239.
 35. Wendl MC, Waterston RH: **Generalized gap model for bacterial artificial chromosome clone fingerprint mapping and shotgun sequencing.** *Genome Res* 2002, **12**(12):1943-1949.
 36. Wendl MC, Yang SP: **Gap statistics for whole genome shotgun DNA sequencing projects.** *Bioinformatics* 2004, **20**(10):1527-1534.
 37. Parra G, Bradnam K, Korf I: **CEGMA: a pipeline to accurately annotate core genes in eukaryotic genomes.** *Bioinformatics* 2007, **23**(9):1061-1067.
 38. Phillippy AM, Schatz MC, Pop M: **Genome assembly forensics: finding the elusive mis-assembly.** *Genome Biol* 2008, **9**(3):R55.
 39. Zhang M, Gish VV: **Improved spliced alignment from an information theoretic approach.** *Bioinformatics* 2006, **22**(1):13-20.
 40. Stanke M, Steinkamp R, Waack S, Morgenstern B: **AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes.** *Nucleic Acids Res* 2004:W309-312.
 41. Korf I: **Gene finding in novel genomes.** *BMC Bioinformatics* 2004, **5**:59.
 42. Allen JE, Majoros WH, Pertea M, Salzberg SL: **JIGSAW, GeneZilla, and GlimmerHMM: puzzling out the features of human genes in the ENCODE regions.** *Genome Biol* 2006, **7**(Suppl 1):S91-13.
 43. Enright AJ, van Dongen S, Ouzounis CA: **An efficient algorithm for large-scale detection of protein families.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(7):1575-1584.
 44. Enright AJ, Kunin V, Ouzounis CA: **Protein families and TRIBES in genome sequence space.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**(15):4632-4638.
 45. Tekaija F, Latge JP: ***Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen?** *Curr Opin Microbiol* 2005, **8**(4):385-392.
 46. Kupfer DM, Reece CA, Clifton SV, Roe BA, Prade RA: **Multicellular ascomycetous fungal genomes contain more than 8000 genes.** *Fungal Genet Biol* 1997, **21**(3):364-372.
 47. Koski LB, Gray MV, Lang BF, Burger G: **AutoFACT: an automatic functional annotation and classification tool.** *BMC Bioinformatics* 2005, **6**:151.
 48. Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, Hao LN, He SQ, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke ZX, Krylov D, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu CL, Lu F, Lu SN, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang DC, Bryant SH: **CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:D237-D240.
 49. Karp PD, Ouzounis CA, Moore-Kochlacs C, Goldovsky L, Kaipa P, Ahren D, Tsoka S, Darzentas N, Kunin V, Lopez-Bigas N: **Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(19):6083-6089.
 50. Gonzalez FJ, Nebert DW: **Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation.** *Trends Genet* 1990, **6**(6):182-186.
 51. Saier MH Jr, Tran CV, Barabote RD: **TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information.** *Nucleic Acids Res* 2006:D181-186.
 52. Stergiopoulos I, Zwiers LH, De Waard MA: **The ABC transporter MgAt4 is a virulence factor of *Mycosphaerella graminicola* that affects colonization of subtomatal cavities in wheat leaves.** *Mol Plant Microbe Interact* 2003, **16**(8):689-698.
 53. Rogers B, Decottignies A, Kolaczowski M, Carvajal E, Balzi E, Goffeau A: **The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2001, **3**(2):207-214.
 54. Benito B, Garcíadeblas B, Rodríguez-Navarro A: **Potassium- or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi.** *Microbiology* 2002, **148**(Pt 4):933-941.
 55. Apel K, Hirt H: **Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction.** *Annu Rev Plant Biol* 2004, **55**:373-399.
 56. Able AJ: **Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens.** *Protoplasma* 2003, **221**(1-2):137-143.
 57. Govrin EM, Levine A: **The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*.** *Curr Biol* 2000, **10**(13):751-757.
 58. Rio MCS, Oliveira BV, Thomazella DP, Fracassi da Silva JA, Pereira GAG: **Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the Witches' Broom Disease of cacao.** *Curr Microbiol* 2008, **56**(4):363-370.

59. Ceita GO, Macêdo JNA, Santos TB, Alemanno L, Gesteira AS, Micheli F, Mariano AC, Gramacho KP, Silva DC, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pereira GAG, Cascardo JM: **Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*.** *Plant Sci* 2007, **173**(2):106-117.
60. Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A: **Early signaling events induced by elicitors of plant defenses.** *Mol Plant Microbe Interact* 2006, **19**(7):711-724.
61. Kim KS, Min JY, Dickman MB: **Oxalic Acid Is an Elicitor of Plant Programmed Cell Death during *Sclerotinia sclerotiorum* Disease Development.** *Mol Plant Microbe Interact* 2008, **21**(5):605-612.
62. Bolker M: ***Ustilago maydis*-a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence.** *Microbiology* 2001, **147**(Pt 6):1395-1401.
63. de Arruda MCCR, Ferreira MASV, Felipe MSS: **Comparison of *Crinipellis perniciosa* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting.** *Plant Pathology* 2003, **52**(2):236-244.
64. Andebrhan T, Figueira A, Yamada MM, Cascardo J, Furtak DB: **Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis perniciosa*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil.** *Eur J Plant Pathol* 1999, **105**(2):167-175.
65. Bartley BGD: **Cacao (*Theobroma cacao* L.). Breeding for Durable Resistance in Perennial Crops.** *FAO Plant Production and Protection Paper* 1986, **70**:25-42.
66. Larrondo LF, Canessa P, Vicuna R, Stewart P, Wymelenberg A, Vanden, Cullen D: **Structure and transcriptional impact of divergent repetitive elements inserted within *Phanerochaete chrysosporium* strain RP-78 genes.** *Mol Genet Genomics* 2007, **277**(1):43-55.
67. Poulter RT, Goodwin TJ: **DIRS-I and the other tyrosine recombinase retrotransposons.** *Cytogenet Genome Res* 2005, **110**(1-4):575-588.
68. DeMarco R, Venancio TM, Verjovski-Almeida S: **SmTRC1, a novel *Schistosoma mansoni* DNA transposon, discloses new families of animal and fungi transposons belonging to the CACTA superfamily.** *BMC Evol Biol* 2006, **6**:89.
69. Rep M, Does HC van der, Cornelissen BJ: **Drifter, a novel, low copy hATlike transposon in *Fusarium oxysporum* is activated during starvation.** *Fungal Genet Biol* 2005, **42**(6):546-553.
70. Kempken F, Kuck U: **restless, an active Ac-like transposon from the fungus *Tolypocladium inflatum*: structure, expression, and alternative RNA splicing.** *Mol Cell Biol* 1996, **16**(11):6563-6572.
71. Monroy F, Sheppard DC: **TafI: a class II transposon of *Aspergillus fumigatus*.** *Fungal Genet Biol* 2005, **42**(7):638-645.
72. Zhang X, Feschotte C, Zhang Q, Jiang N, Eggleston WB, Wessler SR: **P instability factor: an active maize transposon system associated with the amplification of Tourist-like MITEs and a new superfamily of transposases.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**(22):12572-12577.
73. Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD: **Pathological hormone imbalances.** *Curr Opin Plant Biol* 2007, **10**(4):372-379.
74. Sun S-K, Snyder WC: **The bakanae disease of the rice plant.** In *Fusarium: diseases, biology and taxonomy* Edited by: Nelson TAT PE, Cook RJ. The Pennsylvania State University Press; 1981:104-113.
75. Rademacher W, Graebe JE: **Gibberellin A4 produced by *Sphaceloma manihoticola*, the cause of the superelongation disease of cassava (*Manihot esculenta*).** *Biochem Biophys Res Commun* 1979, **91**(1):35-40.
76. Tudzynski B, Kawaide H, Kamiya Y: **Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene.** *Curr Genet* 1998, **34**(3):234-240.
77. Bastos CN, Andebrhan T: **Presença de giberelina em basidiosporos de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer.** *Fitopatologia Brasileira* 1981, **6**:417-423.
78. Kilaru A, Bailey BA, Hasenstein KH: ***Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves.** *FEMS Microbiol Lett* 2007, **274**(2):238-244.
79. Wolf FT: **The Production of Indole Acetic Acid by *Ustilago-Zeae*, and Its Possible Significance in Tumor Formation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1952, **38**(2):106-111.
80. Maor R, Haskin S, Levi-Kedmi H, Sharon A: **In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. aescynomene.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**(3):1852-1854.
81. Perley JE, Stowe BB: **On the ability of *Taphrina deformans* to produce indoleacetic acid from tryptophan by way of tryptamine.** *Plant Physiol* 1966, **41**(2):234-237.
82. Prusty R, Grisafi P, Fink GR: **The plant hormone indoleacetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**(12):4153-4157.
83. Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Kerckhoffs LH, Elliott RC: **Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea.** *Plant J* 2000, **21**(6):547-552.
84. Pierik R, Tholen D, Poorter H, Visser EJ, Voesenek LA: **The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation.** *Trends Plant Sci* 2006, **11**(4):176-183.
85. Swarup R, Parry G, Graham N, Allen T, Bennett M: **Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development.** *Plant Mol Biol* 2002, **49**(3-4):411-426.
86. Steffens B, Sauter M: **Epidermal cell death in rice is regulated by ethylene, gibberellin, and abscisic acid.** *Plant Physiol* 2005, **139**(2):713-721.
87. Pierik R, Cuppens ML, Voesenek LA, Visser EJ: **Interactions between ethylene and gibberellins in phytochrome-mediated shade avoidance responses in tobacco.** *Plant Physiol* 2004, **136**(2):2928-2936.
88. Maor R, Shirasu K: **The arms race continues: battle strategies between plants and fungal pathogens.** *Curr Opin Microbiol* 2005, **8**(4):399-404.
89. Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti AM, Ayliffe MA, Ellis JG: **The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells.** *Plant Cell* 2004, **16**(3):755-768.
90. Kemen E, Kemen AC, Rafiqi M, Hempel U, Mendgen K, Hahn M, Voegelé RT: **Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells.** *Mol Plant Microbe Interact* 2005, **18**(11):1130-1139.
91. Rooney HC, Van't Klooster JW, Hoorn RA van der, Joosten MH, Jones JD, de Wit PJ: ***Cladosporium Avr2* inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance.** *Science* 2005, **308**(5729):1783-1786.
92. Kamper J, Kahmann R, Bolker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Muller O, Perlin MH, Wosten HA, de Vries R, Ruiz-Herrera J, Reynaga-Pena CG, Sneltselaar K, McCann M, Perez-Martin J, Feldbrugge M, Basse CW, Steinberg G, Ibeas JL, Holloman WV, Guzman P, Farman M, Stajich JE, Sentandreu R, Gonzalez-Prieto JM, Kennell JC, Molina L, Schirawski J, Mendoza-Mendoza A, Greilinger D, Munch K, Rossel N, Scherer M, Vranes M, Ladendorff O, Vincin V, Fuchs U, Sandrock B, Meng S, Ho EC, Cahill MJ, Boyce KJ, Klose J, Klosterman SJ, Deelstra HJ, Ortiz-Castellanos L, Li W, Sanchez-Alonso P, Schreier PH, Hauser-Hahn I, Vaupel M, Koopmann E, Friedrich G, Voss H, Schluter T, Margolis J, Platt D, Swimmer C, Gnirke A, Chen F, Vysotskaia V, Mannhaupt G, Guldener U, Munsterkötter M, Haase D, Oesterheld M, Mewes HW, Mauceli EW, DeCaprio D, Wade CM, Butler J, Young S, Jaffe DB, Calvo S, Nusbaum C, Galagan J, Birren BW: **Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*.** *Nature* 2006, **444**(7115):97-101.
93. Rep M: **Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization.** *FEMS Microbiol Lett* 2005, **253**(1):19-27.
94. Zapparoli G, Garcia O, Medrano FJ, Tiburcio R, Costa GL, Pereira GAG: **Identification of a second family of genes in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of Witches' Broom disease in cacao, encoding necrosis inducing proteins similar to cerato platanins.** *Mycol Res* 2008.
95. Nonaka T, Dohmae N, Hashimoto Y, Takio K: **Amino acid sequences of metalloendopeptidases specific for acyl-lysine bonds from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies.** *J Biol Chem* 1997, **272**(48):30032-30039.
96. Sepcic K, Berne S, Potrich C, Turk T, Macek P, Menestrina G: **Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids.** *Eur J Biochem* 2003, **270**(6):1199-1210.

97. Wymelenberg A, Vanden, Mingos P, Sabat G, Martinez D, Rajangam AS, Teeri TT, Gaskell J, Kersten PJ, Cullen D: **The *Phanerochaete chrysosporium* secretome: database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium.** *J Biotechnol* 2005, **118**(1):17-34.
98. Garcia-Conesa MT, Kroon PA, Ralph J, Mellon FA, Colquhoun IJ, Saulnier L, Thibault JF, Williamson G: **A cinnamoyl esterase from *Aspergillus niger* can break plant cell wall cross-links without release of free diferulic acids.** *Eur J Biochem* 1999, **266**(2):644-652.
99. van Loon LC, Rep M, Pieterse CM: **Significance of inducible defense-related proteins in infected plants.** *Annu Rev Phytopathol* 2006, **44**:135-162.
100. Broekaert WF, Terras FRG, BPA C: **Induced and preformed antimicrobial proteins.** In *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases* Edited by: Slusarenko AJFR, Van Loon LC. Dordrecht: Kluwer; 2000:371-477.
101. Hu X, Reddy AS: **Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a thaumatin-like protein from *Arabidopsis*.** *Plant Physiol* 1995, **107**(1):305-306.
102. Punja Z: **Transgenic carrots expressing a thaumatin-like protein display enhanced resistance to several fungal pathogens.** *Can J Plant Pathol* 2005, **27**:291-296.
103. Fierens E, Rombouts S, Gebruers K, Goesaert H, Brijs K, Beaugrand J, Volckaert G, van Campenhout S, Proost P, Courtin CM, Delcour JA: **TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family.** *Biochem J* 2007, **403**(3):583-591.
104. Miosga T, Schaaff-Gerstenschlager I, Chalwatzis N, Baur A, Boles E, Fournier C, Schmitt S, Velten C, Wilhelm N, Zimmermann FK: **Sequence analysis of a 33.1 kb fragment from the left arm of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X, including putative proteins with leucine zippers, a fungal Zn(II)2-Cys6 binuclear cluster domain and a putative alpha 2-SCB-alpha 2 binding site.** *Yeast* 1995, **11**(7):681-689.
105. Sakamoto Y, Watanabe H, Nagai M, Nakade K, Takahashi M, Sato T: ***Lentinula edodes* tlg1 encodes a thaumatin-like protein that is involved in lentinan degradation and fruiting body senescence.** *Plant Physiol* 2006, **141**(2):793-801.
106. Chaves FC, Gianfagna TJ: **Necrotrophic phase of *Monilophthora perniciosa* causes salicylic acid accumulation in infected stems of cacao.** *Physiol Mol Plant Pathol* 2006, **69**(1-3):104-108.
107. Aro N, Pakula T, Penttila M: **Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi.** *FEMS Microbiol Rev* 2005, **29**(4):719-739.
108. Cuomo CA, Guldener U, Xu JR, Trail F, Turgeon BG, Di Pietro A, Walton JD, Ma LJ, Baker SE, Rep M, Adam G, Antoniw J, Baldwin T, Calvo S, Chang YL, Decaprio D, Gale LR, Gnerre S, Goswami RS, Hammond-Kosack K, Harris LJ, Hilburn K, Kennell JC, Kroken S, Magnuson JK, Mannhaupt K, Mauceli E, Mewes HV, Mitterbauer R, Muehlbauer G, Munsterkotter M, Nelson D, O'Donnell K, Ouellet T, Qi W, Quesneville H, Roncero MI, Seong KY, Tetko IV, Urban M, Waalwijk C, Ward TJ, Yao J, Birren BW, Kistler HC: **The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization.** *Science* 2007, **317**(5843):1400-1402.
109. Millar AH, Day DA: **Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria.** *FEBS Lett* 1996, **398**(2-3):155-158.
110. Juarez O, Guerra G, Martinez F, Pardo JP: **The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1658**(3):244-251.
111. Juarez O, Guerra G, Velazquez I, Flores-Herrera O, Rivera-Perez RE, Pardo JP: **The physiologic role of alternative oxidase in *Ustilago maydis*.** *Febs J* 2006, **273**(20):4603-4615.
112. Joseph-Horne T, Hollomon DW, Wood PM: **Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components.** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1504**(2-3):179-195.
113. Idnurm A, Howlett BJ: **Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*).** *Eukaryot Cell* 2002, **1**(5):719-724.
114. Sakai S, Nishide T, Munir E, Baba K, Inui H, Nakano Y, Hattori T, Shimada M: **Subcellular localization of glyoxylate cycle key enzymes involved in oxalate biosynthesis of wood-destroying basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on glucose.** *Microbiology* 2006, **152**(Pt 6):1857-1866.
115. Wang ZY, Thornton CR, Kershaw MJ, Debaio L, Talbot NJ: **The glyoxylate cycle is required for temporal regulation of virulence by the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*.** *Mol Microbiol* 2003, **47**(6):1601-1612.
116. Segers G, Bradshaw N, Archer D, Blissett K, Oliver RP: **Alcohol oxidase is a novel pathogenicity factor for *Cladosporium fulvum*, but aldehyde dehydrogenase is dispensable.** *Mol Plant Microbe Interact* 2001, **14**(3):367-377.
117. Daniel G, Volc J, Filonova L, Plihal O, Kubatova E, Halada P: **Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* Alcohol Oxidase, an Extracellular Source of H₂O₂ in Brown Rot Decay of Wood.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**(19):6241-6253.
118. Nakagawa T, Miyaji T, Yurimoto H, Sakai Y, Kato N, Tomizuka N: **A methylotrophic pathway participates in pectin utilization by *Candida boidinii*.** *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**(10):4253-4257.
119. Fall R, Benson AA: **Leaf methanol - The simplest natural product from plants.** *Trends Plant Sci* 1996, **1**(9):296-301.
120. Abanda-Nkpawatt D, Musch M, Tschiersch J, Boettner M, Schwab W: **Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site.** *J Exp Bot* 2006, **57**(15):4025-4032.
121. Wei Y, Shen W, Dauk M, Wang F, Selvaraj G, Zou J: **Targeted gene disruption of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Colletotrichum gloeosporioides* reveals evidence that glycerol is a significant transferred nutrient from host plant to fungal pathogen.** *J Biol Chem* 2004, **279**(1):429-435.
122. Santos RX, Melo SC, Cascardo JC, Brendel M, Pungartnik C: **Carbon source-dependent variation of acquired mutagen resistance of *Monilophthora perniciosa*: Similarities in natural and artificial systems.** *Fungal Genet Biol* 2008.
123. Nakayama A, Park S, Zheng-Jun X, Nakajima M, Yamaguchi I: **Immunohistochemistry of active gibberellins and gibberellin-inducible alpha-amylase in developing seeds of morning glory.** *Plant Physiol* 2002, **129**(3):1045-1053.
124. Pellier AL, Lauge R, Veneault-Fourrey C, Langin T: **CLNRI, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle.** *Mol Microbiol* 2003, **48**(3):639-655.
125. Divon HH, Fluhr R: **Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants.** *FEMS Microbiol Lett* 2007, **266**(1):65-74.
126. Marzluf GA: **Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1997, **61**(1):17-32.
127. Lau G, Hamer JE: **Regulatory genes controlling MPG1 expression and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*.** *Plant Cell* 1996, **8**(5):771-781.
128. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P: **Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment.** *Genome Res* 1998, **8**(3):175-185.
129. Chou HH, Holmes MH: **DNA sequence quality trimming and vector removal.** *Bioinformatics* 2001, **17**(12):1093-1104.
130. Usuka J, Zhu W, Brendel V: **Optimal spliced alignment of homologous cDNA to a genomic DNA template.** *Bioinformatics* 2000, **16**(3):203-211.
131. Gremme G, Brendel V, Sparks ME, Kurtz S: **Engineering a software tool for gene structure prediction in higher organisms.** *Inform Software Technol* 2005, **47**(15):965-978.
132. Lowe TM, Eddy SR: **tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(5):955-964.
133. Karp PD, Paley S, Romero P: **The Pathway Tools software.** *Bioinformatics* 2002, **18**(Suppl 1):S225-232.
134. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G: **Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.** *Protein Eng* 1997, **10**(1):1-6.
135. Collart MA, Oliviero S: **Preparation of yeast RNA by extraction with hot acidic phenol.** In *Current Protocols in Molecular Biology* Edited by: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Hoboken KS. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2006.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Doutorado intitulada "Estudo da via alternativa de transporte de elétrons de *Moniliophthora perniciosa* e *Moniliophthora roreri*: possível papel no desenvolvimento dos patógenos e infecção do cacaueiro":

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

(X) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:

Rede Genômica do Estado da Bahia, sob Protocolo(s) nº CiBio 2001/03.

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

Daniela Paula de Toledo Thomazella
Aluno: Daniela Paula de Toledo Thomazella

Gonçalo Amaranante Guimarães Pereira
Orientador: Gonçalo Amaranante Guimarães Pereira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Nome:

Função:

Prof. Dr. MARCELO LANCELOTTI
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - UNICAMP