Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Biologia

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO I. B.

Joan Grande Barau

Caracterização molecular do metabolismo de fontes de Carbono durante o desenvolvimento da interação fitopatogênica Vassoura-de-Bruxa em cacau

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) TOAN GANTÉ MARI	Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microrganismos.
e aprovada pela Comissão Julgadora.	
Orientador: Prof. Dr. Gonç Co-Orientadora: Dra. Joha	alo Amarante Guimarães Pereira ana Rincones

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

B231c	Barau, Joan Grande, 1981- Caracterização molecular do metabolismo de fontes de carbono durante o desenvolvimento da interação fitopatogênica vassoura-de-bruxa em cacau / Joan Grande Barau. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.
	Orientadores: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Johana Rincones Peres. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	1. Xilema. 2. Glicerina. 3. Cacau. 4. <i>Moniliopthora perniciosa</i> . 5. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia). I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964 II. Rincones Peres, Johana. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Carbon source metabolic interactions during the development of witche's broom disease of cocoa

Palavras-chave em Inglês: Xylem Glycerin Cocoa Moniliopthora perniciosa Witche's broom disease (Phytopathology) Área de concentração: Genética de Microorganismos Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular Banca examinadora: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador] Marisa Vieira de Queiroz Antonio Rossi Filho Fabio Papes Marcelo Menossi Teixeira Data da defesa: 26-08-2011 Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular Campinas, 26 de Agosto de 2011.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (Orientador)

Profa. Dra. Marisa Vieira de Queiroz

Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

Prof. Dr. Fabio Papes

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Prof. Dr. Marcelo Brocchi











Assinatura

Assinatura

Assinatura

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada "Caracterização molecular do metabolismo de fontes de Carbono durante o desenvolvimento da interação fitopatogênica Vassoura-de-Bruxa em cacau"

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

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

(X) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No.CIBio/IB 2001/03, Instituição: Unicamp.

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. _____, Instituição:

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

* 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.

Aluno: (Joan Grande Barau) Orientador: (Gonçalo Anarante Guímarães Pereira) Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: (Deferido () Indeferido The 102 Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI Carimbo e assinatura Presidente da Comissão Interna de Biossegurança Instituto de Biologia - UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: () Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Agradecimentos

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro concedido nesses cinco anos de trabalho (processos Nº 2006/5694-0 e 2009/50119-9).

Agradeço ao professor Gonçalo pela oportunidade de trabalho e aprendizado, e pelo exemplo diário de entusiasmo e energia incondicionais.

Agradeço aos motores do LGE, Eliane, Welbe, Silvia, Jonatas, Mariana e Ernestina, sem vocês nada do que fazemos seria possível.

Agradeço aos pós-doutorandos que se envolveram com o projeto da vassoura de bruxa, Johana, Odalys, Tibúrcio, Jorge Mondego, Carol e Ana Deckmann pela dedicação ao projeto e ao ensino de nós, alunos.

Agradeço à excelente equipe de bioinformática do LGE, Marcelo, Gustavo, Ramon, Leandro, Lucas, Osvaldo e Roberto, o trabalho de vocês é a fundação de tudo o que fazemos.

Agradeço aos colegas do LGE pelo companheirismo, colaboração, alegria, amplas discussões científicas e também pelas não científicas, ainda mais frutíferas.

Agradeço a Amanda, pelo papel multifuncional de suporte à minha existência diária, pelo amor e companheirismo - sem você eu seria uma pessoa (muito) pior.

Agradeço a toda a minha família, em especial aos meus avós maternos e paternos pelos inúmeros exemplos de humildade, dedicação, trabalho e sacrifício, e em especial aos meus pais e irmão por todo o amor, carinho e apoio incondicionais.

A todos o meu mais sincero muito obrigado!

Joan Barau

"Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito."

Aristóteles

Resumo

A introdução da doença vassoura de bruxa do cacaueiro no Sul da Bahia representa um dos maiores exemplos da magnitude de impacto sócio econômico que uma fitopatologia pode aflingir a uma região ou país com um predominante perfil agroexportador. Com a execução do projeto genoma do fungo causador da vassoura de bruxa, o Basidiomiceto Moniliopthora perniciosa, uma série de trabalhos de caracterização morfológica, fisiológica e genética da doença foram inciados. Em um primeiro momento, em paralelo com a caracterização das alterações bioquímicas da doença, buscamos entender as diferenças de expressão gênica através de microarranjos de DNA e bibliotecas ESTs comparando as duas fases morfo-genéticas do fungo reproduzidas in vitro. Apesar de esse esforço pioneiro ter permitido a formação de um modelo panorâmico das alterações genéticas do fungo e fornecido importantes diretrizes para a pesquisa futura, ficou claro a necessidade de se explorar em maior detalhe a interação in vivo. Dentre os aspectos importantes investigados, o estudo do metabolismo do glicerol durante a fase biotrófica da interação através de marcadores de expressão mostrou que essa fonte de carbono em potencial pode ter um papel importante no início da infecção e participar da sinalização de stress através da modulação do shuttle mitocondrial de glicerol 3-fosfato. No entanto, a necessidade de se entender melhor o panorama das fontes de carbono disponíveis no apoplasto, o microambiente ocupado pelo fungo nas fases iniciais da interação, nos motivou a caracterizar as alterações nutricionais desse espaço ao longo da doença. Foi possível demonstrar que a vassoura de bruxa quebra o ciclo de carbono normal do apoplasto e que induz o corte da comunicação vascular com as partes sadias da planta ao final da fase biotrófica. Uma correlação entre a sinalização por carbono e a expressão de genes de patogenicidade secundária foi explorada. Com a expansão dos dados de genoma e transcriptoma utilizando seguenciamento de DNA de terceira geração (Illumina e 454 Life Sciences), dezenas de genes-alvo com potencial participação em vias de patogenicidade e desenvolvimento da doenca foram identificados. Nesse contexto, dentre as ferramentas para análises de genômica funcional nesse modelo, a inativação ou nocaute de genes por gene targeting e o estudo da atividade de proteínas através de fusões com genes repórteres são essenciais ao teste das hipóteses geradas como fruto da pesquisa genômica da Vassoura-de-bruxa. Transformantes de M. perniciosa carregando uma cópia do gene marcador de autofagia MpATG8 fusionado ao marcador GFP apresentaram um padrão de fluorescência característico da biologia celular de

ATG8, permitindo acompanhar o processo de autofagia sob condições de deprivação de nutrientes, demonstrando a possibilidade da aplicação de fusões com repórteres fluorescentes para experimentos de localização subcelular de proteínas desse fitopatógeno. Por fim, uma estratégia baseada na seleção de recombinantes através da técnica *split marker* em conjunto com um silenciamento transiente do sistema de reparo NHEJ por RNAi foi traçada e executada de modo a obter o nocaute do gene MpKu70, essencial a essa via de reparo, cuja inativação está associada a um aumento da eficiência de recombinação homóloga e *gene targeting*.

Abstract

Cocoa's Witches Broom Disease (WBD) is caused by the hemibiotrophic interaction between the Basidiomycete fungus Moniliopthora perniciosa and plants of Theobroma cacao. One remarkable feature of WBD is its unusual long biotrophic phase in which the fungal growth is restricted to the apoplastic space of plants. We compared differential gene expression between biotrophic and saprotrophic-like hyphae in vitro and proposed based on microarray and EST results that the maintenance of biotrophic-like cultures of M. perniciosa in vitro is subject to Carbon source regulation, especially regarding the use of glycerol as a preferential carbon source for biotrophy. To further gain insight into the carbon source regulation of WBD biotrophic phase in vivo, we characterized glycerol utilization using fungal expression markers during the initial phases of infection. We also characterized the carbon source fluctuations in the apoplast of healthy and infected cocoa seedlings. We showed that healthy cocoa plants possess a rhythmic carbon cycle in the apoplast that is in fine tune with periodical leaf flushing, expansion and photosynthetic maturation. WBD completely disrupts the carbon cycle in the apoplast of infected plants and also arrests leaf photosynthesis at pre sink-to-source transition levels. It was also possible to distinguish two different phases of carbon availability in the apoplast. The two phases correlated with fungal growth rates, the expression of a characterized necrosis inducing gene and the development of a tumor-like callus at the base of infected stems that completely disrupted normal vascular communication between healthy and diseased parts of the plant. A possible correlation between carbon starvation and phase switch from biotrophic to necrotrophic was explored and the evolution of the vascular-disrupting callus was discussed in the view of the tradeoff between the physiological behavior of infected tissues as sinks and the avoidance of nutrient remobilization during infected tissue senescence. Finally, we focused on the development of functional genomic tools for the study of gene function in this pathogen. As a proof-of-concept, we successfully obtained fungal strains expressing the autophagy related gene MpATG8 fused with GFP reporter, in which was possible to visualize the autophagy process in vivo by fluorescence imaging. In addition we also obtained the first successful gene targeting knockout of MpKu70, an M. perniciosa homologous of a gene essential to NHEJ in Eukaryotes. MpKu70 knockouts strains have reported phenotypes of increased homologous recombination, and the M. perniciosa strain may be an important platform for future functional studies of genes important in witches broom disease pathogenesis.

Sumário

Resumo	07
Resumo geral da tese em Português.	
Abstract	09
Resumo geral da tese em Inglês.	
Sumário	10
Sumário da estrutura da tese em introdução geral e quatro capítulos.	
Introdução Geral ao Modelo de Pesquisa	11
Introdução à importância do cacau e a biologia da vassoura de bruxa.	
Capítulo 1	19
Reprodução do artigo: Differential Gene Expression Between the Biotrophic-Like and Saprotrophic Mycelia of the Witches' Broom Pathogen <i>Moniliophthora</i> <i>perniciosa</i> .	
Capítulo 2	39
Estudo da expressão dos genes do metabolismo do glicerol de Moniliophthora	
perniciosa cultivado in vitro e durante a interação patogênica com o cacaueiro.	
Capítulo 3	67
Caracterização das alterações nas concentrações de poli-álcoois e fontes de	
carbono no apoplasto de cacau infectado por Moniliopthora perniciosa.	
Capítulo 4	93
Desenvolvimento de ferramentas básicas de inativação gênica e localização	
subcelular de proteínas no fitopatógeno Moniliopthora perniciosa para fins de genômica funcional.	

Introdução Geral ao Modelo de Pesquisa

Apresentado em 1964 por Ehrlich e Raven, o termo *coevolução* faz referência às mudanças evolutivas recíprocas dirigidas pelas interações ecológicas entre espécies. De fato a história da evolução e da biodiversidade é fundamentalmente a história dessas interações e das mudanças genéticas decorrentes (Thompson, 1999).

Dentre a ampla gama de interações ecológicas existentes, as do tipo parasitahospedeiro, particularmente entre plantas e patógenos, estão entre as mais importantes ao homem devido ao impacto econômico causado às atividades agrícolas (Madden & Wheelis, 2003). No Brasil, um país de forte perfil agroexportador, a magnitude do prejuízo econômico proveniente dessas interações é ainda mais importante, adquirindo inclusive uma conotação social. Um dos maiores exemplos brasileiros do impacto sócio-econômico gerado por uma interação desse tipo foi à drástica diminuição da produção de cacau no país durante o período de 1989 até hoje, devido à introdução da praga Vassoura-de-bruxa no sul do estado da Bahia (Pereira *et al.*, 1989; Purdy & Schmidt, 1996; Pereira *et al.*, 1996; Griffith *et al.*, 2003).

O cacau, *Theobroma cacao* L. [Theo-broma = comida dos deuses], é uma planta frutífera arbórea de médio porte, pertencente à família Sterculiaceae e originária da Bacia Amazônica (Purdy & Schmidt, 1996). É unicamente cultivada nos trópicos úmidos e suas sementes representam uma importante *commodity* de países tropicais exportadores de matéria-prima para a fabricação de chocolate.

Até 1994, o Brasil figurava como o segundo maior produtor de cacau do mundo com uma participação de quase 20% do mercado internacional. Em 1989 a Vassoura-debruxa foi identificada pela primeira vez nas plantações de cacau do estado da Bahia

(Pereira *et al.*, 1996), a mais importante região produtora no Brasil. Em poucos anos ocorreu o primeiro surto da doença na região, causando um impacto devastador, diminuindo a produção e a participação do país no mercado internacional, que passou a ser de apenas 4%. Estima-se que o impacto econômico da Vassoura-de-bruxa no período seja da ordem de U\$ 10 bilhões, afetando não só a balança comercial brasileira e os produtores de cacau, mas também a estabilidade socioeconômica de cerca de 2,5 milhões de empregados dependentes dessa cultura na Bahia (Griffith, 2004).

Em 2011, estima-se que o cultivo de cacau, produção e exportação de amêndoas movimentarão cerca de U\$ 5 bilhões, impulsionando um mercado de chocolate e cosméticos derivados que deve operar na casa de U\$ 80 bilhões (www.icco.org). As taxas de crescimento do mercado têm variado em torno de 3% ao ano sem um acompanhamento equivalente dos níveis de produção, gerando um déficit acumulado responsável por uma tendência significativa de aumento dos preços nos últimos cinco anos.

Existe uma grande discrepância geoeconômica em relação a produção de cacau e o refinamento e consumo. Tradicionalmente a produção comercial só é possível em uma pequena faixa tropical de dez graus ao Norte e Sul da linha do Equador contendo um conjunto bem particular de condições climáticas e de solo típicos de floresta equatorial. Por essa razão ela ocorre somente em países tropicais, em sua grande maioria com um histórico de baixo padrão de desenvolvimento tecnológico. De modo contrário, o refinamento e consumo dos produtos finais ocorrem preferencialmente nos países desenvolvidos, notavelmente União Europeia e América do Norte, representando o único setor da cadeia produtiva do cacau que historicamente recebeu investimentos em ciência e tecnologia.

Na década de noventa, o impacto econômico mundial da disseminação da Vassoura-de-bruxa no sul da Bahia foi atenuado pelos baixos preços do cacau e pelo drástico aumento da produção de cacau na África e Indonésia. Como consequência desse cenário econômico e da restrição da doença à America do Sul, apesar da importância do cacau e das características biológicas singulares da fitopatologia da Vassoura-de-bruxa, pouco se investiu em ciência visando o conhecimento das bases moleculares dessa interação.

Nesse contexto, a iniciativa conjunta do sequenciamento do genoma de *Moniliopthora perniciosa* foi uma plataforma pioneira essencial para a construção de um modelo de estudo da Vassoura-de-bruxa, seguida de amplas caracterizações fisiológicas e bioquímicas, da expressão gênica do fungo e da interação com a planta. Mais recentemente, com a estabilização da produção de cacau Africana e o constante aumento da demanda e preços do cacau, uma crescente preocupação em relação ao melhoramento genético do cacaueiro visando o aumento da produção e a resistência a patógenos têm refletido em um maior interesse mundial no desenvolvimento da ciência e tecnologia da produção cacaueira. O sequenciamento do genoma do cacaueiro por dois grupos independentes Norte Americanos e Europeus, sua recente publicação e o alto impacto resultante, estão entre os primeiros frutos dessa nova realidade.

A doença Vassoura-de-bruxa do cacaueiro é causada pelo fitopatógeno *Moniliopthora perniciosa* (Stahel) Singer, um fungo hemibiotrófico homotálico primário (Delgado e Cook, 1976), pertencente ao filo Basidiomicota e a família Tricholomataceae. Trata-se de um homobasidiomiceto estruturalmente típico (fungo filamentoso com estruturas reprodutivas do tipo cogumelo) embora, alguns aspectos peculiares da sua biologia só foram descritos até o momento nessa espécie. Homobasidiomicetos são relativamente raros como fitopatógenos e apesar de uma série de fungos dessa subclasse

serem conhecidos por manterem infecções biotróficas simbióticas nas raízes de plantas (micorrizas), o fungo *M. perniciosa* é provavelmente o único representante capaz de infectar o tecido das partes aéreas vivas (Griffith, 2004).

A infecção e o início do desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa ocorre através dos basidiósporos de *C. perniciosa* que germinam sobre a cutícula da planta, penetrando os tecidos meristemáticos do cacau (Figura 1A) (Sreenivasan & Dabydeen, 1989). Após a penetração inicia-se a fase biotrófica da doença. Nela ocorre a proliferação de um micélio monocariótico presente unicamente no apoplasto (Figura 1B) e induzindo uma série de alterações fisiológicas e morfológicas no ramo infectado (Evans, 1980; Silva & Matsuoka, 1999, Orchard *et al.*, 1994). Este estágio é chamado de vassoura-verde e é caracterizado visualmente na planta pela perda de dominância apical e um crescimento anormal hiperplásico do ramo e dos brotos laterais.

Após um período de aproximadamente 70 dias, a interação planta-hospedeiro deixa de ser biotrófica e passa a ser necrotrófica (Lawrence *et al.*, 1991). Nesta segunda fase as hifas de *M. perniciosa* tornam-se dicarióticas, portando típico grampo de conexão (Evans, 1980; Purdy & Schmidt, 1996). Há um aumento significativo da taxa de crescimento do fungo que, penetra as células do ramo de cacau infectado (Penman, 2000; Griffith, 2004). Essa fase é caracterizada pelo aparecimento de lesões necróticas distais ao ponto inicial de infecção (Figura 1C), e pela morte do ramo infectado, que serve de substrato para o crescimento das estruturas reprodutivas do fungo ou basidiomas, responsáveis pela maturação e dispersão de cerca de 10⁷ basidiósporos cada, os únicos propágulos da infecção conhecidos até o momento nesse fitopatógeno (Rocha & Wheeller, 1985; Almeida *et al.*, 1997; Griffith, 2004).



Figura 1: Ciclo de vida de *Moniliophthora perniciosa*. A) Basidiocarpos emergem dos tecidos necrosados mortos, produzindo basidiósporos que eventualmente caem sobre um tecido vivo de cacau em crescimento e germinam dando início a infecção. B) Micélio monocariótico "biotrófico" que coloniza o apoplasto de cacau e paralela os sintomas da Vassoura-verde em plantas infectadas. C) Micélio dicariótico "necrotrófico" que invade o espaço intracelular, paralela os sintomas da Vassoura-seca em plantas infectadas e se diferencia nas estruturas reprodutivas, os Basidiocarpos.

Referências Bibliográficas

Ehrlich PR and Raven PH. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. Evolution 18(4):586-608.

Almeida OC, Chiacchio FPB and Rocha HM. 1997. Sobrevivência de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer, em vassouras secas de cacaueiros (*Theobroma cacao* L.) do estado da Bahia. Agrotrópica 9(1):23–28.

Delgado JC and Cook AA. 1976. Nuclear condition of basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius perniciosus*. Can. J. Botany 54(1/2):66-72.

Evans HC. 1980. Pleomorphism of *Crinipellis perniciosa* causal agent of witches' broom disease of cacao. T. Brit. Mycol. Soc. 74(3):515-523.

Griffith GW. 2004. Witches'brooms and frosty pods: threats to world cacao production. Biologist. 51(2):71-76.

Griffith GW, Nicholson J, Nenninger A, Birch RN and Hedger JN. 2003. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. New Zeal. J. Bot. 41(3):423–435.

Lawrence JS, Campelo AMFL and Figueiredo JM. 1991. Enfermidades do cacaueiro: Doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco. Agrotrópica 3(1):1–14.

Madden LV and Wheelis M. 2003. The threat of plant pathogens as weapons against U.S. crops. Ann. Rev. Phytopathol. 41:155-76.

Orchard J, Collin HA, Hardwick K and Isaac S. 1994. Changes in morphology and measurement of cytokin levels during the development of witches' broom on cocoa. Plant Pathol. 43(1):65-72.

Penman D, Britton G, Hardwick K, Collin HA and Isaac S. 2000. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. Mycol. Res. 104(6):671-675.

Pereira JL, Ram A, Figuereido JM and Almeida LC. 1989. La primera aparición de la "escoba de bruja" en la principal área productora de cacao del Brasil [Article in Spanish]. Turrialba 39(3):459-461.

Pereira JL, Almeida LCC and Santos SM. 1996. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: attempts at erradication and containment. Crop Protect. 8:740-752.

Purdy LH and Schmidt RA. 1996. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management. Ann. Rev. Phytopathol. 34:537-594.

Rocha HM and Wheeler BEJ. 1985. Factors influencing the production of basidiocarps and the deposition and germination of basidiospores of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease on cocoa (*Theobroma cacao* L.). Plant Pathol. 34:319-328.

Silva SDVM and Matsuoka K. 1999. Histologia de *Crinipellis Perniciosa* (Stahel) Singer em cacaueiro (*Theobroma Cacao* L.) suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa [Article in Portuguese]. Fitopatolol. Bras. [Sociedade Brasileira de Fitopatologia] 24(01):54-59.

Sreenivasan TN and Dabydeen S. 1989. Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis perniciosa*. Plant Dis. 73:478–481.

Thompson JN. 1999. The evolution of species interactions. Science 284(5423):2116-18.

Capítulo 1

Expressão Gênica Diferencial Entre o Micélio Biotrófico - Monocariótico e Saprotrófico - Dicariótico do Fungo Causador da Vassoura-de-bruxa, *Moniliopthora perniciosa*.

Johana Rincones, Leandra M. Scarpari, Marcelo F. Carazzolle, Jorge M. C. Mondego, Eduardo F. Formighieri, Joan G. Barau, Gustavo G. L. Costa, Dirce M. Carraro, Helena P. Brentani, Laurival A. Vilas-Boas, Bruno V. de Oliveira, Maricene Sabha, Robson Dias, Júlio M. Cascardo, Ricardo A. Azevedo, Lyndel W. Meinhardt, e Gonçalo A. G. Pereira.

Molecular Plant-Microbe Interactions, Vol. 21, No. 7, p. 891-908, 2008. (Reprodução do artigo)

Differential Gene Expression Between the Biotrophic-Like and Saprotrophic Mycelia of the Witches' Broom Pathogen *Moniliophthora perniciosa*

Johana Rincones,¹ Leandra M. Scarpari,¹ Marcelo F. Carazzolle,¹ Jorge M. C. Mondego,¹ Eduardo F. Formighieri,¹ Joan G. Barau,¹ Gustavo G. L. Costa,¹ Dirce M. Carraro,² Helena P. Brentani,² Laurival A. Vilas-Boas,³ Bruno V. de Oliveira,¹ Maricene Sabha,¹ Robson Dias,⁴ Júlio M. Cascardo,⁴ Ricardo A. Azevedo,⁵ Lyndel W. Meinhardt,⁶ and Gonçalo A. G. Pereira¹

¹Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil; ²Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, Centro de Pesquisa Hospital A. C. Camargo, Rua Prof. Antonio Prudente 109, 1° andar, São Paulo city 01509-010, São Paulo, Brazil; ³Laboratório de Virologia e Bacteriologia de Plantas, Instituto Agronômico do Parana—IAPAR, Londrina 86047-902, Paraná, Brazil; ⁴Laboratório de Genômica e Expressão Gênica, Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus 45650-000, Bahia, Brazil; ⁵Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba 13400-970, São Paulo, Brazil; ⁶Sustainable Perennial Crops Laboratory, United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service, 10300 Baltimore Ave., Bldg. 001, Beltsville, MD 20705-2350, U.S.A.

Submitted 11 December 2007. Accepted 3 March 2008.

Moniliophthora perniciosa is a hemibiotrophic fungus that causes witches' broom disease (WBD) in cacao. Marked dimorphism characterizes this fungus, showing a monokaryotic or biotrophic phase that causes disease symptoms and a later dikaryotic or saprotrophic phase. A combined strategy of DNA microarray, expressed sequence tag, and real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction analyses was employed to analyze differences between these two fungal stages in vitro. In all, 1,131 putative genes were hybridized with cDNA from different phases, resulting in 189 differentially expressed genes, and 4,595 reads were clusterized, producing 1,534 unigenes. The analysis of these genes, which represent approximately 21% of the total genes, indicates that the biotrophic-like phase undergoes carbon and nitrogen catabolite repression that correlates to the expression of phytopathogenicity genes. Moreover, downregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation and the presence of a putative ngr1 of Saccharomyces cerevisiae could help explain its lower growth rate. In contrast, the saprotrophic mycelium expresses genes related to the metabolism of hexoses, ammonia, and oxidative phosphorylation, which could explain its faster growth. Antifungal toxins were upregulated and could prevent the colonization by competing fungi. This work significantly contributes to our understanding of the molecular mechanisms of WBD and, to our knowledge, is the first to analyze

Corresponding author: G. A. P. Pereira; Telephone: +55 19 35216650; Fax: +55 19 35216235. E-mail: goncalo@unicamp.br

GenBank accession numbers. dbEST: EY219053 through EY223257; dbGSS: ET065114 through ET065303; GEO: GSM243318 through GSM243333 (samples); GPL6148 and GPL6149 (platforms), GSE9626, GSE9627, and GSE9701 (series).

*The *e*-Xtra logo stands for "electronic extra" and indicates four supplementary documents listing GenBank accession numbers and describing annotation and nomenclature are published online.

differential gene expression of the different phases of a hemibiotrophic fungus.

Additional keywords: DNA microarrays.

Moniliophthora perniciosa (Aime and Phillips-Mora 2005) (*Agaricales, Marasmiaceae*) is the causal agent of witches' broom disease (WBD) of cacao (*Theobroma cacao*). This basidiomycete fungus is a sister taxon of *M. roreri*, the causal agent of frosty pod rot. Together, these fungal pathogens cause the two more devastating diseases of cacao in the Americas. In Brazil, WBD was introduced to the cacao-producing region of southeastern Bahia in the 1980s (Pereira et al. 1989). Since then, production of this commodity has dropped by more than half (Brazilian Ministry of Agriculture 2005) and resulted in major socioeconomic and environmental problems for the region (Griffith et al. 2003; Pereira et al. 1996; Purdy and Schmidt 1996).

The biology of the *M. perniciosa*–cacao interaction is complex and molecular studies have only recently begun. A draft of the genome has been established by our group based on a twofold coverage derived from shotgun libraries of total DNA. This databank is currently used for gene discovery and to support gene expression experiments, such as expressed sequence tag (EST) analysis and DNA microarrays.

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 this case, the infection causes hypertrophy, hyperplasy, and loss of apical dominance, producing a characteristic green broom (Evans 1978, 1980).

In spite of these symptoms, the biotrophic hyphae are found in low density inside the infected plant tissues (Penman et al. 2000) and grow slowly in the intercellular space (Silva and Matsuoka 1999). During the biotrophic phase, the infected tissue seems to be under intense oxidative stress, indicated by the increase in lipid peroxidation (Scarpari et al. 2005) and eventual production of reactive oxygen species (ROS) (Gratao et al. 2005), such as hydrogen peroxide produced by the enzymatic degradation of calcium oxalate crystals found in infected susceptible cacao plants (Ceita et al. 2007).

During the second stage, the infected plant tissue turns necrotic (dry brooms) and the fungus displays a dikaryotic saprotrophic or necrotrophic mycelium, with clamp connections. Contrary to the biotrophic hyphae, the saprotrophic mycelia grow vigorously, quickly colonizing the broom and completely destroying the vegetal tissues (Evans 1980). Elucidating the mechanisms responsible for the change from the biotrophic to the saprotrophic or necrotrophic phase of the fungus and understanding whether the death of the infected cacao tissue is a consequence or precedes this change in fungal physiology is a central question that remains to be answered. Finally, the necrotrophic mycelia eventually develop into basidiomes, which produce spores and complete the fungal life cycle (Evans 1980; Lawrence et al. 1991).

A detailed biochemical study of the cacao-M. perniciosa interaction was published by our group (Scarpari et al. 2005). A systematic analysis of the changes in the contents of soluble sugars, amino acids, alkaloids, ethylene, phenolics, tannins, flavonoids, pigments, malondialdehyde (MDA), glycerol, and fatty acids in cacao shoots during the development of WBD was performed and revealed a concerted number of biochemical alterations in the infected plant. These responses appear to be modulated by the production of ethylene, which may play an important role in broom development. Additionally, green brooms exhibited significantly higher amounts of glycerol than dry brooms or uninfected tissues, suggesting that this compound could play a key role in the maintenance of the biotrophic phase of the fungus in the plant. Subsequently, it was established that monokaryotic cultures could be maintained when glycerol was used as the sole carbon source in axenic cultures and that the fungus rapidly changed into the saprotrophic or necrotrophic phase when several other carbon sources (sorbitol, manitol, fructose, sucrose, glucose, and ethanol) were used in the growth medium, independently of their concentration (0.1 to 2%) (Meinhardt et al. 2006). This monokaryotic mycelium of M. perniciosa grown in vitro was termed "biotrophic-like phase" because it had all of the characteristics of the biotrophic phase in planta (Meinhardt et al. 2006). These studies have shed light on the complexity of the biochemical interactions that occur between the plant and the pathogen during the development of WBD, but the question remains: How does the fungus cause or modulate the responses in the plant?

In the present work, we used DNA microarray analysis, EST sequencing, and real-time polymerase chain reaction (PCR) in order to study differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic stages of the fungus, grown in vitro in the presence of cacao extracts. This work is the first to analyze differential gene expression between the infective (biotrophic) and the saprotrophic stages of a hemibiotrophic fungal pathogen. The results indicate different carbon and nitrogen metabolisms between the two mycelial stages and sheds light on the metabolic pathways that could be essential for the pathogenicity of this hemibiotrophic basidiomycete.

RESULTS

DNA microarray hybridization.

DNA microarrays were prepared using 2,304 putative genes of *M. perniciosa* identified from the draft genome. We selected genes with similarity to proteins annotated in GenBank (BLASTx, *e* value \leq 1E-05). All these genomic survey sequence

data have been submitted to the dbGSS of GenBank database under accession numbers ET065114 to ET065303, ET163645 to ET165559, and ET165560 to ET165565 (Supplementary Data A). With this first approach, our goal was to understand the differential gene expression of known genes during the biotrophic-like and saprotrophic phases of M. perniciosa. Both mycelial phases were obtained from isolate BP10 grown in glycerol supplemented with cacao-meristem extract (A-Sap-CM and A-Bio-CM, respectively), a mixture of components that has been shown to maintain the biotrophic-like mycelia (Meinhardt et al. 2006). As the normalizing condition, BP10 saprotrophic mycelia were grown in glycerol (A-Sap-Gly). These array data have been submitted to the Gene Expression Omnibus (GEO) database of GenBank under accession numbers GSM243318 through GSM243333 (samples); GPL6148 and GPL6149 (platforms); and GSE9626, GSE9627, and GSE9701 (series).

Figure 1 shows a volcano plot analysis for the comparisons between the treatments (A-Bio-CM versus A-Sap-Gly and A-Sap-CM versus A-Sap-Gly). There is a greater dispersion in the comparison A-Bio-CM versus A-Sap-Gly (Fig. 1A) than A-Sap-CM versus A-Sap-Gly (Fig. 1B), which reflects a higher number of differentially expressed genes between two different life phases grown in different media than in the same mycelial type grown in two different media.

Of the 2,304 spots, 1,131 gave consistent hybridization results (i.e., triplicates showing equivalent hybridization signals for each sample). From these 1,131 putative genes, a total of 189 (16.7%) showed significantly different expression between the A-Sap-CM and A-Bio-CM samples (net fold changes >2.0). These differentially expressed genes were separated into five groups by hierarchical clusterization analysis according to their expression patterns (Fig. 2): 17 genes were induced in both conditions (group 1), 63 genes were repressed in A-Sap-CM and induced in A-Bio-CM (group 2), 76 were induced in A-Sap-CM and repressed in A-Bio-CM (group 4), and 30 were repressed in both (group 5). The hierarchical clusterization algorithm created an outgroup with two genes that showed patterns similar to groups 2 and 5, but which failed to cluster into these groups due to a strong repression in A-Sap-CM. One of the genes that failed to clusterize (CP02-S2-041-313-F05-EM.F-RICIN) is probably due to strong repression in A-Sap-CM (-21.7) and induction in A-Bio-CM (2.94). Genes in groups 2 and 4, which show divergent expression patterns in A-Bio-CM and A-Sap-CM, are shown in Figure 2B and C, respectively. GenBank accession numbers for these 189 differentially expressed spots are provided in Supplementary Data B.

EST general analysis.

In parallel with the DNA microarrays, we constructed cDNA libraries to complement the DNA microarray analysis, specially aimed at identifying new genes and finding the elements necessary for gene prediction in the genome draft (e.g., exonintron boundaries, codon usage, and so on). Four cDNA libraries were constructed: E-Sap-CP (CP02 saprotrophic mycelium grown in cacao-pod extract), E-Sap-Glu (CP02 saprotrophic mycelium grown in glucose), E-Sap(C-G) (subtracted library of the saprotrophic mycelium grown in glucose), and E-Bio-CM (biotrophic mycelium grown in cacao meristem extract).

In total, 7,450 reads were generated from the four cDNA libraries, and the analysis of these sequences is summarized in Figure 3. These EST clustered into 1,534 unigenes. Although a few contigs may represent nonoverlapping portions of the same gene, the number of clusters analyzed here could represent up to 13% of the total genes of this fungus, estimated to be 12,000 genes by gene density analysis of the genome (data

not shown). Clustered sequences were annotated manually and have been submitted to the GenBank dbEST database under accession numbers EY219053 through EY223257. A supplementary table is provided with the annotation of 766 clusters with putative functions (Supplementary Data C). In addition, BLASTn alignments between the expressed cDNA unigenes and the 1,131 DNA fragments with valid hybridization signals from the DNA microarray found 137 genes in common, from which 20 were differentially expressed in the microarray analysis.

Additionally, 340 clusters with no hits with the public databases were identified as possible new genes, based on their sequence similarity to predicted genes in the draft genome (i.e., genome regions that show the presence of introns) or due to the presence of putative open reading frames (Fig. 3).

Twelve highly redundant transcripts were found in the non-normalized cDNA libraries (E-Sap-CP; E-Sap-Glu, and E-Bio-CM), represented by more than 40 EST. These transcripts may represent highly expressed genes. Three of these transcripts code for mitochondrial ribosomal RNA (large subunit), two code for ribosomal proteins, one codes for a putative agglutinin (similar to *Phaeosphaeria nodorum; E* value = 4E-38, contig298), one codes for a hydrophobin (COH1 of *Coprinopsis cinereae*; *E* value = 3E-23, contig180), and one codes for a protein of the cytochrome P450 monoxygenase family (*Pleurotus lapidus*; *E* value = 1E-34, contig129). The remaining four transcripts produced no significant alignments against any database, including the *M. perniciosa* genome draft. Nevertheless, two (contig137 and contig183) were tested and validated by real-time reverse-transcriptase (RT)-PCR and amplified different total RNA populations of *M. perniciosa*.

EST analysis of the saprotrophic mycelia.

Glucose has been traditionally used as the main carbon source in axenic cultures for fungal growth. However, growth in glucose constitutes an artificial situation for fungal phytopathogens, because only very low amounts of free glucose are typically found in their natural environments. Therefore, a media in which the carbon source consisted of an exudate from cacao-pod extract was developed (discussed below) and this media was found to promote more vigorous growth of the saprotrophic mycelia (Fig. 4A). In view of these observations, we assumed that the cacao-extract media resembled a more

A-Sap-CM vs. A-Sap-Gly Α 1,00E-10 1,00E-09 1.00E-08 1.00E-07 1.00E-06 P-value 1.00E-05 1,00E-04 1,00E-03 1.00E-02 1.00E-01 1.00E+00 -2 2 3 -3 -1 0 1 Log Fold Change в A-Bio-CM vs. A-Sap-Gly 1,00E-10 1.00E-09 1.00E-08 1,00E-07 1.00E-06 P-value 1.00E-05 1,00E-04 1,00E-03 1.00E-02 1.00E-01 1.00E+00 -2 1 2 3 -3 0 -1 Log Fold Change

Fig. 1. Volcano plot demonstrating differences in hybridization signals between **A**, saprotrophic mycelia in glycerol (A-Sap-Gly) versus saprotrophic mycelia in cacao extract (A-Sap-CM) and **B**, saprotrophic mycelia in glycerol (A-Sap-Gly) versus biotrophic-like mycelia in cacao extract (A-Bio-CM). Discriminators (*P* value < 0.05 and log2 fold change) are indicated by horizontal and vertical lines, respectively.



Continued on following page

Fig. 2. Gene expression profile for the differential gene expression between the biotrophic-like and the saprotrophic mycelia of *Moniliophthora perniciosa*, established by DNA microarray hybridization. Sap: sample A-Sap-CM; Cont: sample A-Sap-Gly; Bio: sample A-Bio-CM. A, All genes with differential gene expression (fold change >2.0) are shown and clustered into five expression groups. B, A total of 63 genes in group 2, showing repression in the saprotrophic mycelium and induction in the biotrophic-like mycelium. C, Group 4 clustered 76 genes showing induction in the saprotrophic mycelium and repression in the biotrophic-like mycelium. D, Expression pattern of the other three groups (group 1: induced in both, group 3: strongly repressed in Sap, and group 5: repressed in both), clustering the remaining 51 genes.

Fig. 2. Continued from previous page

с	Sap Cont. Bio	Read	Product & CDD
7.00 6.00 5.00 4.00 3.00		CP02-S3-000-089-A11-UC.F CP02-S2-041-315-D11-EM.F CP02-S2-000-061-B08-UC.F CP02-S2-032-309-F10-UE.F	Fatty acid synthase complex protein Fatty acid synthase complex protein Cysteine aminopetidase / Bleomycin hydrolase Cytochrome P450
2.00		CP02-S3-000-100-C12-UC.F	Cysteine aminopetidase / Bleomycin hydrolase
-1.00		CP02-S3-033-146-G03-EM.F CP02-S2-037-178-C09-EM.F	Cyclin-dependent protein kinase
-2.00		CP02-S2-006-089-C02-UC.R	Aspartate carbamoyltransferase / Pyrimidine biosynthesis protein
-4.00		CP02-S2-032-330-H05-UE.F	Fungal specific transcription factor
-6.00		CP02-S2-000-123-F08-CL.G	Acetyl-CoA acetyltransferase Endo-heta-D-1 4-olucanase
-7.00		CP02-S2-032-488-D02-UC.F	Beta-olucosidase
		CP02-S2-000-197-H05-UE.F	Glycerol-1-phosphatase
		CP02-S2-000-221-G07-UC.F	Monooxygenase / Salicylate hydroylase
		CP02-S2-000-174-C09-UE.F CP02-S2-021-245-A11-UC R	Pectate Lyase
		CP02-S2-025-284-E02-UC.F	Polyprenyl synthase
		CP02-S3-033-436-F12-UE.F	Glutamate carboxypeptidase II - Transferrin receptor family protein
		CP02-S3-036-548-D03-UC.G	Leucine Rich Protein
		CP02-S2-028-247-A01-UE.F CP02-S2-038-272-B02-FM F	2-isopropyimalate synthase Pentatriconentide repeat protein
		CP02-S2-000-115-E11-UE.R	Cytochrome P450
		CP02-S2-038-247-C05-EM.G	Major Facilitator Superfamily protein / Carboxylic acid transporter
		CP02-S2-032-349-D07-UE.F	Acyl-CoA dehydrogenase
		CP02-S2-038-232-G03-EM.F CP02-S2-024-294-G09-UC F	Malate dehydrogenase Sugar transporter
		CP02-S2-024-294-G05-0C.F	Aspartate transaminase
		CP02-S2-032-300-B07-UE.F	Phosphomethylpyrimidine kinase
		CP02-S2-040-365-G06-EM.F	Mig1/CreA-like protein / Zinc finger protein
		CP02-S2-040-346-G08-EM.F	ABC multidaya transporter
		CP02-S3-033-410-G04-0C.G	ABC multidrug transporter
		CP02-S3-038-508-C12-UE.F	Isocitrate dehydrogenase
		CP02-S3-036-485-A02-UE.F	Cellulase
		CP02-S2-000-125-F03-UE.F CP02-S2-028-245-B07-UE R	RDS1 / Adenine repressible gene Retrotransposon
		CP02-S2-000-076-D07-UC.F	Phosphatase methylesterase / PME-1
		CP02-S2-032-330-E03-UE.F	Prolyl aminopeptidase
ן כ		CP02-S2-032-473-E04-UC.F	Short chain dehydrogenase Mediates samples subust MED14
7.00 . Group 3 = 2		CP02-S3-039-546-B05-0E.F CP02-S2-040-353-B08-FM F	EF-Hand Calmodulin protein / Apoptosis-linked gene 2 -like
6.00		CP02-S2-000-178-F01-UC.F	ABC multidrug transporter
4.00		CP02-S2-000-151-A10-UE.F	3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase
2.00		CP02-S2-000-147-H12-UE.F	Copper amine oxidase / Lysyl oxidase
1.00		CP02-S2-000-100-P01-0E.R	Serine threenine kinase
1.00		CP02-S2-033-359-H08-UE.F	Beta-1,3-glucan binding protein / 1,3-beta-glucosidase
3.00		CP02-S3-036-132-A06-FC.G	SNARE protein SED5 / Syntaxin 5
5.00 / /		CP02-S2-032-309-A01-UE.F	Zinc finger protein C2H2 type
7.00 1 /		CP02-S2-040-359-H05-EM.F CP02-S3-036-548-C03-UC.G	Malate dehvdrogenase
		CP02-S2-000-080-H07-UC.G	Short chain dehydrogenase
7.00 Group 1 = 17		CP02-S2-028-244-A04-UE.F	Major Facilitator Superfamily protein / Carboxylic acid transporter
6.00		CP02-S3-000-040-C10-UC.F CP02-S3-033-164-C01-EM F	GMC oxidoreductase Two-component response regulator / Signal receiver component
4.00		CP02-S2-032-116-F02-FC.G	Copia-Like Retrotransposon
2.00		CP02-S3-033-461-D03-UC.F	Glucose-6-phosphate isomerase
1.00		CP02-S2-040-351-D04-EM.F	Major Facilitator Superfamily protein / Multidrug resitance protein
2.00		CP02-S2-000-104-E10-UE.R CP02-S2-000-176-H01-UE F	Sugar transporter / Monosachande transporter
-3.00		CP02-S2-000-165-B08-CL.F	Acetyl-CoA acetyltransferase
5.00		CP02-S2-000-112-D12-UE.F	Tyrosinase
7.00 1		CP02-S2-000-126-A06-UE.F	Sugar transporter
		CP02-S2-024-295-C05-UC.F	TB2/DP1 HVA22 family protein
7.00 Group 5 = 30		CP02-S2-028-275-H09-UE.F	Tyrosinase
5.00		CP02-S2-000-122-B12-UE.R	Major Facilitator Superfamily protein / Siderophore iron transporte
4.00		CP02-S3-000-109-C04-UC.G	Glycine dehydrogenase
2.00		CP02-S2-025-298-C08-UC.F	Malate dehydrogenase
100		CP02-S3-033-456-D04-UC F	GMP synthase
2.00		CP02-S2-000-109-F04-UE.R	Copia-Like Retrotransposon
-3.00		CP02-S2-028-282-E11-UE.F	Aromatic amino acid transporter / GABA permease
-5.00		CP02-S2-033-350-F03-UE.F	Amino acid transporter GMC ovidoreductase
-7.00		CP02-S2-000-101-A02-UE.F	Cytochrome P450
		A. AR AR AAA. IAI LIAA APU	and the second sec

natural situation and analyzed the possible differences in gene expression between the two conditions in non-normalized libraries of the saprotrophic mycelium and in a subtracted cDNA library. The cluster distribution among the three cDNA libraries from the saprotrophic mycelium E-Sap-CP, E-Sap-Glu, and E-Sap(C-G) is shown in Figure 4B. The non-normalized libraries E-Sap-CP and E-Sap-Glu shared 99 clusters, indicating many



similarities between these two growth conditions that may be specific to the dikaryotic physiological stage. In contrast, the subtractive library shared only 24 of its clusters with the E-Sap-CP library and 18 with the E-Sap-Glu library. This indicates an enrichment of transcripts that are not abundant in the other two libraries.

The functional classification of the EST in the non-normalized cDNA libraries (E-Sap-CP and E-Sap-Glu) based on their sequence similarity to genes of known function (proteins) is shown in Figure 4C, according to the Functional Catalogue (FunCat) classification system for biological processes. Notable differences were observed in the category "3.1. Cell Growth" (21% in cacao-pod extract versus 10% in glucose), suggesting a molecular basis for the growth rate differences observed in culture media (Fig. 4A).

The functional classification of the transcripts enriched in the E-Sap(C-G) library is shown in Table 1. The most redundant transcripts were classified in the category "2.2. Electron transport and membrane-associated energy conservation," which accounted for 35% of the reads identified for this library. The majority of these reads encoded genes such as 5-aminolevulinate synthase, involved in heme biosynthesis; NAD-dependent formate dehydrogenase (FDH), involved in NADH regeneration; and several cytochromes. A significant segment of these reads (22%) were classified into the "5.1. Ribosome biogenesis" category, which includes the large subunit of the rRNA encoded by the mitochondrial genome. Also, several reads (6%) were annotated in category "11.2. Detoxification," represented by several O-methylsterigmatocystin oxidoreductase, and a cytochrome P450 putatively associated with aflatoxin biosynthesis in pathogenic fungi (Prieto and Woloshuk 1997). Ten reads were found in category "2.1. Tricarboxylic acid cycle" and were putatively identified as enzymes in the malate shunt (malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase), which are involved in NADH regeneration.

EST analysis of the biotrophic-like mycelium.

After the construction and analysis of the cDNA libraries from the saprotrophic phase, we succeeded in growing biotrophic-like mycelia in axenic cultures (Meinhardt et al. 2006). We then prepared an additional non-normalized library from cDNA of the biotrophic-like mycelium grown in vitro. Ideally, to compare it with the other libraries from the saprotrophic mycelia, the growth conditions used for the biotrophic-like cultures should be the same (i.e., growth in glucose or cacaopod extract). However, the biotrophic-like mycelium cannot be maintained under these growth conditions, which would trigger the immediate conversion to the saprotrophic phase (Meinhardt et al. 2006). Therefore, the biotrophic-like phase used for cDNA library construction was grown in the presence of cacao-meristem extract and glycerol, which was similar to that used for microarray analysis. Furthermore, we had to take into consideration the fact that this library was prepared from isolate BP10, different from the isolate used to prepare the saprotrophic libraries.

Although we are aware of the differences in isolates and growth conditions mentioned above, we compared the EST

data as a basis to look for differences between the two mycelial types. The most relevant differences were then independently confirmed or denied by real-time RT-PCR comparing the A-Sap-CM and E-Bio-CM samples, both prepared from the same isolate and grown in the same media.

The functional categorization of the annotated clusters from the E-Bio-CM library is shown in Figure 5. In comparison with the saprotrophic stage libraries (Fig. 4C), we observed some interesting patterns concerning the frequency of EST in the different categories. For instance, similarly to the saprotrophic mycelium grown in glucose, there was a lower percentage of transcripts involved in "3.1. Cell growth" and a higher percentage of transcripts putatively involved in "5.1. Ribosome biogenesis." In contrast to the saprotrophic stage libraries, there is a lower percentage of "1.3. Carbohydrate metabolism" and a higher proportion of "10. Signal transduction," "6.2. Proteolytic degradation," "1.4. Lipid metabolism," and "5.3. aminoacyl-tRNA synthetases."

Differences in metabolic pathways among the two types of mycelia and different growth conditions were analyzed based on the functional annotation of the individual clusters. We observed that the saprotrophic libraries were more abundant in transcripts associated with glycolysis, the malate shunt, and oxidative phosphorylation. In contrast, the biotrophic-like mycelium had more transcripts involved in the pentose-phosphate shunt, tRNA synthesis, amino acid permeases, and the gammaamino butyric acid (GABA) shunt.

Real-time RT-PCR analysis

of differential gene expression of selected genes.

To independently validate the results, real-time RT-PCR analysis was performed for 35 transcripts that showed differential gene expression in either the EST or the microarray analyses, and their relative expression level was measured in each RNA sample. The sample A-Sap-Gly (BP10 saprotrophic mycelium grown in glycerol) was used as the reference sample for the calculations, with the objective of maintaining consistency with the microarray analysis (Fig. 6).

Three additional transcripts were selected and evaluated with regards to the stability of their gene expression among the different RNA samples, in an attempt to select at least one appropriate internal control. After analysis by the geNorm applet (Vandesompele et al. 2002), we observed a low variation for β actin and the 60S rRNA among the different samples (between 1 and 1.3), and the relative expression of these transcripts varied accordingly with regards to the sample (data not shown). Thus, β -actin and 60S rRNA were selected as appropriate internal standards. A normalization factor for each sample was calculated from the geometric average of their expression level in each sample, as suggested by the authors.

The results of the real-time RT-PCR analysis were separated based on whether they were selected from the DNA microarray or the EST analyses. The fold change results (A-Bio-CM/A-Sap-CM) of the microarray analysis for 19 transcripts were directly compared with the real-time RT-PCR fold-change (A-Bio-CM/A-Sap-CM) to validate the microarray hybridization (Fig. 6). The real-time RT-PCR results validated 16 of these

Fig. 3. Flow diagram of the expressed sequence tag (EST) analysis of *Moniliophthora perniciosa*. In all, 7,406 ESTs were trimmed, clusterized, and manually annotated, resulting in 1,534 valid clusters or unigenes. BLASTx alignments with public databases allowed the identification of 766 of these clusters, 95% of which had a first hit with a fungal species, mostly corresponding to the basidiomycetes *Coprinopsis cinerea* (46%) and *Phanerochaete chrysosporium* (33%). In all, 1,002 of the clusters (65%) showed hits with the draft genome, from which 269 were considered potential new genes due to the lack of homologous sequences in the public databases and to the presence of introns or putative open reading frames (ORFs). An additional 71 clusters that failed to show sequence similarity with the draft genome or the public databases were also considered putative new genes based on the presence of putative ORFs. Thus, in total, 340 clusters were identified as potential new genes based on this analysis.

transcripts (84%), although the values obtained by real-time RT-PCR were usually much higher than the microarray (Fig. 6). Previous reports have shown that the majority of array results were qualitatively accurate but that significant quantitative dif-

ferences have been detected based on real-time RT-PCR based data (Chuaqui et al. 2002; Gao et al. 2004; Helmann et al. 2001; Qi et al. 2006; Rajeevan et al. 2001; Stintzi 2003; Wurmbach et al. 2001).



Fig. 4. Expressed sequence tag (EST) analysis of the saprotrophic libraries E-Sap-CP, E-Sap-Glu, and E-Sap(C-G). **A**, Growth rate differences of the saprotrophic mycelium in cacao-pod extract (upper plate) or glucose (lower plate) minimal media. **B**, Distribution of clusters among the three cDNA libraries. Numbers in parentheses represent the number of singlets resulting from each library; numbers in shaded areas indicate contigs composed of ESTs from multiple libraries. **C**, Functional classification of ESTs that showed significant sequence similarity to proteins in the public databases (*E* value < 1E-05) and distributed by cDNA library. This classification was based on the FunCat system. The total number of reads classified per library were 568 for CP02 saprotrophic mycelium grown in cacao-pod extract (E-Sap-CP) and 405 for CP02 saprotrophic mycelium grown in glucose (E-Sap-Glu).

EST analysis does not provide relative expression data for the transcripts sequenced. Therefore, transcripts of interest for the disease process were selected based on their putative annotation and their expression patterns in the different cDNA samples were established by real-time RT-PCR for comparison purposes (Fig. 7).

Based on their presence in the different cDNA libraries, we expected increased expression in the biotrophic-like mycelium of the GABA transporter (GABA T), copper transporter (CUT), stomatin (STOM), tRNA ligase (TRNAL), prohibitin (PROH), ceratoplatanin (CERAT), pathogenicity protein 1 (PP1), glyoxal oxidase (GOX1), and a transcript with no hits in the public database that clustered 515 reads of the E-Bio-CM library (NHBIO). From these, most were validated, with the exception of PP1, TRNAL, and NHBIO.

On the other hand, selected genes expected to be more expressed in the saprotrophic mycelium were a transcript with no hits in the public database that clustered 248 reads of the E-Sap-Glu and E-Sap-CP libraries (NHSAP), a cytochrome C oxidase (COX), manganese sodium dismutase, NAD⁺-dependent FDH, glycerol aquaporin (GLYP), and the KP4 and thaumatin (THAU) antifungal toxins. Most were confirmed, except THAU, which showed equivalent expression in both conditions (Fig. 7).

DISCUSSION

In the present study, we employed complementary methodologies to identify genes and analyze gene expression of *M. perniciosa* at different physiological stages and in response to extracts of its host, *T. cacao*, the plant species with which the fungus interacts to cause WBD.

Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic stages of *M. perniciosa* was first identified by DNA microarray employing 2,304 putative genes obtained from the analysis of the draft genome, from which 1,131 gave consistent hybridization signals and resulted in 189 differentially expressed genes between the two mycelial types (A-Bio-CM/A-Sap-CM). In addition to the DNA microarray analysis, EST analysis was performed in order to acquire new data from the different physiological stages, to evaluate the saprotrophic mycelial response to host extracts, and to identify new genes that could be included in future DNA microarray analyses. In all, 1,534 unigenes were obtained from this experiment. BLASTn alignments between the EST and the DNA fragments used in the microarray revealed that only 137 of the total number of unigenes sequenced (9%) were represented in the microarrays analysis (from 1,131 spots with consistent hybridization signals). Given that the DNA fragments used in the microarrays were selected based on their sequence similarity to known genes, this result could reflect the percentage of EST with no homology to sequences in the public databases (768 clusters, 50%). In total, we estimate that the DNA microarray and EST analyses presented here were based on 2,528 unigenes, which represent approximately 21% of the estimated 12,000 total genes for this phytopathogen.

Given the fact that the EST analyses between the biotrophiclike and saprotrophic stages were performed with different isolates and growth conditions, we selected 16 transcripts of interest based on their putative function or high redundancy in



BP10 biotrophic-like mycelium in cacao extract

	E-Bio-CM
1.1. Amino acid metabolism	0.73%
1.2. Nucleotide metabolism	0.97%
1.3. Carbohydrate metabolism	3.41%
1.4. Lipid, fatty acid, and isoprenoid metabolism	3.65%
1.5. Other metabolism	2.19%
2.1. Tricarboxylic-acid pathway	0.49%
2.2. Electron transport	5.11%
2.3. Other metabolism of energy reserves	0.24%
3.1. Cell growth	8.52%
3.2. Cell division	0.73%
3.3. Cell death and aging	0.24%
3.4. DNA synthesis and processing	1.70%
4. Transcription and RNA synthesis	1.70%
5.1. Ribosome biogenesis	12.90%
5.2. Translation	0.97%
5.3. Aminoacyl-tRNA synthetases	1.46%
6.1. Post-translational modification/targeting	0.97%
6.2. Proteolytic degradation	7.79%
7. Transport facilitators	3.41%
8. Cellular transport	2.19%
9. Control of cellular organization	2.92%
10. Signal transduction	2.92%
11.1. Stress response	0.49%
11.2. Detoxification	1.70%
12. Cell wall degradation	1.46%
13. Other	1.22%
14. Unclassified	29.93%

Fig. 5. Expressed sequence tag analysis of the biotrophic-like mycelium library (E-Bio-CM). Functional classification of 411 clusters that showed significant sequence similarity to proteins in the public databases (*E* value < 1E-05). The classification was based on the FunCat system.

the different libraries. Their differential gene expression between the biotrophic-like and the saprotrophic mycelia of isolate BP10 grown in glycerol and cacao-meristem extract was then established by real-time RT-PCR (Fig. 7). This assay confirmed the expected expression of 12 of the 16 transcripts, thus suggesting that, although we used different isolates and growth conditions for the construction of the cDNA libraries, most of the differences detected between the two mycelial types were stage specific and may be further discussed. Furthermore, this analysis provided information for two transcripts of high re-

Table 1. FunCat main functional categories represented in the subtractive cDNA library^a

FunCat main category ^b	No. of clusters	No. of reads	Reads (%)
1. Metabolism			
1.1. Amino acid metabolism	4	4	0.5
1.2. Nucleotide metabolism	1	1	0.1
1.3. Carbohydrate metabolism	11	51	5.8
1.4. Lipid, fatty acid, and isoprenoid metabolism	4	7	0.8
1.5. Other metabolism	5	8	0.9
2. Energy			
2.1. Tricarboxylic-acid pathway	3	11	1.3
2.2. Electron transport and membrane-associated energy conservation	26	305	34.7
2.3. Other metabolism of energy reserves	0	0	0.0
3. Cell cycle and DNA synthesis			
3.1. Cell growth	1	1	0.1
3.2. Cell division	0	0	0.0
3.3. Cell death and aging	2	7	0.8
3.4.DNA synthesis and processing	0	0	0.0
4. Transcription and RNA Synthesis	1	7	0.8
5. Protein synthesis			
5.1. Ribosome biogenesis	19	189	21.5
5.2. Translation	1	1	0.1
5.3. Aminoacyl-tRNA synthetases	0	0	0.0
6. Protein fate			
6.1. Post-translational modification	4	10	1.1
6.2. Proteolytic degradation	9	32	3.6
7. Transport facilitators	2	2	0.2
8. Cellular transport	2	6	0.7
9. Control of cellular organization	4	6	0.7
10. Signal transduction	3	7	0.8
11. Cell defense			
11.1. Stress response	3	4	0.5
11.2. Detoxification	5	51	5.8
12. Cell wall degradation	1	1	0.1
13. Other	1	1	0.1
14. Unclassified	61	166	18.9

^a Driver: CP02 saprotrophic mycelium grown in cacao-pod extract; Tester: CP02 saprotrophic mycelium grown in glucose.

^b Ruepp et al. (2004).



Fig. 6. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) validation of microarray results. Asterisks indicate conflicting results between DNA microarray and real-time RT-PCR. Fold-change values >100 are indicated over the corresponding columns.

dundancy that showed no sequence similarity to the public databases or to the *M. perniciosa* genome (designated as NHSAP and NHBIO) and both were confirmed as true genes of unknown function (Fig. 7). However, the expression level detected by real-time PCR for NHBIO did not agree with the

large number of reads it clustered from the E-Bio-CM library (515 representing approximately 25% of the total reads for this library), suggesting that these reads were probably preferentially cloned by some artifact of the cDNA library construction technique.



Fig. 7. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction results for 16 genes selected from the expressed sequence tag analysis, comparing their differential gene expression in two test samples: E-Bio-CM and A-Sap-CM normalized by A-Sap-Gly. Fold-change values >200 are indicated over the corresponding columns.

Putative gene	Code	5' Primer	3' Primer	MP (°C)
Lipase	LIP	GTCATTCTCTCGGTGGCG	GATTGACGATACGGAAAAGG	83.9
Alcohol oxidase	ALOX	CAGCCGTGTCTACGAAGGTA	CAGGATCTGTGGAGTACCGA	84.5
Laccase	LACCA	CAATCAACCTGTTGGAAACT	GGTCAGTCAGAGAGAACACC	82.5
Dipeptidyl peptidase	DPP	GACAGCAGAGGCACAGGATA	CACTCCAGCATCTGCCTCA	81.5
MFS transporter	MFS	GTCTGGTTCCTTCCTGAGG	CAGCGTTTATCGGAGGCGT	82.2
Pathogenicity-related protein 1	PR-1	GTCTGGAAATCCTCAAAGG	TTGACCGACAATGTTTCCA	81.5
Ras-like protein	RAS	CAACAAGTGCGACTTGGAGT	CAAGAGTGCTGAAAGCTTCG	82.5
Signal receiver domain kinase	SRDK	GAATCCAGTGGTTCAGAATCT	TGGAATTAGAGTGTGAATGGG	81.9
Arom polypeptide	AROM	ATCACCGATACAAACATCGC	CGCCACTCTTTGACATCTCT	80.2
Tyrosinase	TYR	GTTCATAACGCCGTCGGA	ACCTTTGCCCAGATACGG	82.2
Reverse-transcriptase integrase	INT	TCCAGAAAGCAGACCGCCA	GTCGACATGGAAAGGTGTTG	82.2
HMPP kinase	HMPP	CTGTTCTTATAAAAGGTGGTC	TCTCCCAACGTCGAGAATC	79.2
Cytochrome C oxidase	CYTcP	CGCTGCTGGAACATACGATA	AGTCGCCGTAGCTTATCCAG	79.7
RICIN-lectine repeat	RICIN	TTTCCAGCGTATGAGTCGAT	AGAGACCCGAGTTGTTCCAG	79.8
Chitin synthase V	CHISV	TATCGGTCGAATGAAACGAA	CATGCTGAGTCGGACAAATC	77.8
Phosphomevalonate kinase	PMEVK	TAAGACAGGGCTGGGATCTT	GCAATGGACATACTGAGAAAG	80.8
UDP-glucose epimerase	UGEP	AACGTCTCCGCTACCATCTC	CGGACTATCCGCTTGTAACC	79.5
Mediator complex subunit	SP1	ACAGGGTCATATCGTCGGTT	CGATGCCGTGACATCTCTAT	80.5
Monooxigenase	MONOX	CCAAACATGGCTCGGATA	AATTCCTCGTTCGTTGAACC	79.8
GABA transporter	GABAT	CCGCTGGAGGCCTCTATTAT	AATATACGCGGCCGTATTGA	79
Glyoxal oxidase 1	GOX1	CGCCCTACTCCCTCTGGTAT	TATTGGCCGAGCCAGAGTAT	81
Pathogenesis protein 1	PP1	CATGGTTCGCCTATTCCTTG	AGGTACCACGTCAGCGTCTT	84
Copper transporter	CUT	AGCGAGCTCAAATTGCGTAT	GACGTGCGCATCAATATCAT	79
Asp tRNA ligase	TRNAL	CTCACATGGAAGCCGAAGTT	GGGTTGTCGAGGAGAATGTC	79.6
Prohibitin	PROH	TTAACATCACCTGCCGTGTC	GGAAGGTAGGACCCTCTCGT	81.3
Stomatin	STOM	TTCAGGTGCAACCATTGAAG	TTGGAGAAGGGAACCGTAGA	79.9
Thaumatin-like	THAU	CTGGCCAGCTCTATTTACGG	AGAACGTTACCGTGGACCAT	82
KP4 toxin	KP4	TACAAGGACGACCAACAACG	CGGGCAAAGTTGGGATACTA	79.6
NAD ⁺ -dependent formate dehydrogenase	FDH	GCTCGTTATGCTGCTGGTG	TCGTATTTACCGAGGCCAAC	78.3
Mn superoxide dismutase	MnSOD	TATGTCAACGCTCTCAACGC	ATGACCACCACCGTTGAACT	83.7
Cytochrome C oxidase	COX	GTCAATGACCGCCAGTAGGT	GCATGGTGAGCATAAGTGATAAA	73.6
Ceratoplatanin	CERAT	GTTTCAACTCACCGGCTTGT	ATTTCCAGCGTGGTCGATAG	79
Glycerol permease	GLYP	AATACCGGAGTCGTGATCCA	GAGATACCAGCGGAAATCCA	80
Unknown biotrophic	NHBIO	TGCATAAGGATGCATTTCCTC	CTAAGCTGAGCGTCTCTCTGG	80.4
Unknown saprotrophic	NHSAP	TGTATCAAACATCGAATCGCA	GCCCTATTATTGGGAACCTTCT	77.3
Glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase*	GPDH*	GGATCTGTCGGTGCTCACTA	AACGTACATGGGTGCATCAG	81.2
β-Actin*	ACT1*	CCCTTCTATCGTCGGTCGT	AGGATACCACGCTTGGATTG	81.6
60S rRNA*	60S*	CAACTCTCTTTGAAGCGTTGC	CGAGGAACATGACGCAATTA	79.6

^a All primer sequences are in the 5'-3' direction. MP of the amplicon is expressed in degrees Celsius. Asterisk (*) indicates transcripts used for normalization.

Based on the functional annotation of differentially expressed genes identified from these analyses, we observed consistent differences between the biotrophic-like and the saprotrophic mycelia, or in response to host extracts, among functional groups of genes related to the following processes: carbon nutrition, nitrogen nutrition, putative phytopathogenicity-related genes, mitochondrial metabolism, transposable elements, and antifungal toxins.

Differences in carbon nutrition observed between the two mycelial types.

The functional categorization of the differentially expressed genes revealed a high metabolic activity of the biotrophic mycelium, represented by a higher percentage of transcripts putatively involved in protein and lipid biosynthesis and degradation coupled to a lower percentage of transcripts putatively involved in cell growth. These results suggest that the biotrophic-like mycelium has an intense metabolic rate that is not used for growth but is probably used for its survival during the molecular cross-talk that occurs during the initial stages of the host– pathogen interaction (Ferreira et al. 2006, 2007).

During the biotrophic stage of the disease cycle in the plant, the fungus occupies the apoplastic space without forming haustoria. The apoplast is poor in soluble nutrients and the biotrophic *M. perniciosa* probably degrades pectin, cellulose, and proteins found in the middle lamella. Although we did not obtain our data from the fungus growing inside the plant (true biotrophic), the genes identified in the in vitro-grown biotrophic-like mycelium were analyzed with the concept that efficient pathogen nutrition is a prerequisite for successful fungal colonization of the host plant (Divon and Fluhr 2007). Consistent with this hypothesis, microarray hybridization and EST analyses revealed the activation of genes involved in plant cell wall degradation in the biotrophic-like mycelium, such as cutinases, cellulases, endoglucanases, glucuronyl hydrolases, β-glucosidases, laccases (LACCA, Table 2), proteases (DPP, Table 2), and lipases (LIP, Table 2) (Figs. 2B and 6), which may aid in plant penetration and are considered virulence factors in several fungal species (Bidochka et al. 1999; Deising et al. 1995; Gotesson et al. 2002; Phalip et al. 2005).

Furthermore, degradation of these compounds may also provide carbon sources for this fungal life stage. For instance, several genes putatively involved in pectin degradation were found upregulated in the biotrophic-like mycelium, such as a gene coding for oxaloacetate acetylhydrolase (*oah*), found in the E-Bio-CM library, which catalyzes the synthesis of oxalate from oxaloacetate (Lenz et al. 1976). Indeed, the presence of calcium oxalate crystals was detected in in vitro cultures of *M. perniciosa*, being produced by the saprotrophic hyphae (Do Rio et al. 2008). Oxalate is secreted by some phytopathogenic fungi and complexes the calcium ions that bind pectin polymers, thus allowing access to pectin by pectin methylesterase; this enzyme then catalyzes the formation of pectate with the liberation of methanol (Dongowski and Bock 1981; Mabrouk et al. 1979).

Interestingly, the biotrophic-like mycelium also overexpresses an alcohol oxidase (Figs. 2B and 6). Alcohol oxidase is a peroxisomal enzyme (VanderKlei et al. 1991) that could be used in the oxidation of methanol derived from pectin degradation (Nakagawa et al. 2000, 2005). This theory would be partly supported by the fact that the saprotrophic stage of *M. perniciosa* is able to grow on methanol or citric pectin as the sole carbon sources in minimal media plates (data not shown). As stated before, another possible carbon source for the biotrophic stage of this fungus is glycerol (Meinhardt et al. 2006). In agreement with this observation, a putative channel-like protein that mediates passive diffusion of glycerol in the presence of ethanol, similar to Fps1p of Saccharomyces cerevisiae (Luyten et al. 1994, 1995), was found upregulated in the A-Bio-CM sample (Fig. 2B).

On the other hand, the genes related to carbon metabolism that were found to be repressed in the biotrophic-like mycelium and induced in the saprotrophic mycelium included some hexose transporters, enzymes of the Krebs cycle, the malate shunt, and enzymes of the pentose-phosphate shunt (Fig. 2C). Key enzymes of glycolysis were found to be repressed in both phases of the mycelia grown in cacao-meristem extract and glycerol but more strongly repressed in the biotrophic-like mycelium (Fig. 2A, group 5). The repression in the biotrophiclike mycelium of genes involved in glucose utilization and the upregulation of genes putatively involved in the metabolism of alternative carbon sources, such as pectin and lipids, could characterize a condition of carbon-catabolite repression (CCR) (Divon and Fluhr 2007), similar to the diauxic shift of S. cerevisiae, in which major changes in gene expression are observed depending on whether the fungus is growing on high concentrations of glucose (fermentative metabolism of glucose to ethanol) or after the glucose supply has been exhausted (aerobic respiration of ethanol) (Derisi et al. 1997). In the case of M. perniciosa, we have observed a rapid switch from the biotrophic-like to the saprotrophic phase when the biotrophic-like mycelium is grown in sugar-supplied culture media (Meinhardt et al. 2006). Thus, the apparent CCR detected in the biotrophic-like mycelia could be repressing a sugar-mediated signaling pathway that may ultimately lead to the phase switch; and, thus, this mechanism would be related to pathogenicity (Divon and Fluhr 2007).

Differences in nitrogen nutrition observed between the two mycelial types.

Although the culture media used to maintain the biotrophiclike phase of *M. perniciosa* contained 0.5% yeast extract, we observed some clues suggesting that this mycelium has adapted to live in a cellular environment characterized by low nitrogen availability. i) A putative pentafunctional enzyme AROM from aromatic compounds production pathway (shikimate pathway) was induced in the biotrophic-like stage and repressed in the saprotrophic mycelium (Fig. 2B). AROM expression could supply aromatic amino acids (Trp, Tyr, and Phe) to starving biotrophic hyphae (Herrmann 1995a,b). ii) A higher number of amino acid permeases was detected in the E-Bio-CM library than in E-Sap-CP. Increased expression of amino acid transporters has been linked to the pathogenicity of the biotrophic fungus Uromyces fabae due to its upregulation in haustoria (Hahn and Mendgen 1997; Hahn et al. 1997; Struck et al. 2002). iii) Enzymes of the GABA shunt were also detected in the E-Bio-CM library and absent from the saprotrophic stage libraries. Furthermore, a putative GABA transporter of M. perniciosa was confirmed to be induced in the biotrophic-like mycelium by real-time RT-PCR (Fig. 7). GABA is a nonprotein amino acid considered an important source of nitrogen and carbon for the fungal pathogen Cladosporium fulvum during its biotrophic interaction with tomato (Solomon and Oliver 2002).

Taken together, these data suggest that the biotrophic-like mycelium is signaling nitrogen-catabolite repression (NCR) that implies the regulation of permeases and catabolic enzymes needed for the utilization of secondary nitrogen sources, such as GABA, when preferential nitrogen sources (ammonia and glutamine) are absent (Divon and Fluhr 2007; Marzluf 1997).

Presence of putative pathogenicity genes in the biotrophic-like mycelium.

The EST and DNA microarray analysis identified the presence or upregulation, respectively, of several transcripts with sequence similarity to pathogenicity or virulence genes of other phytopathogens in the biotrophic-like phase: i) a putative glucuronyl hydrolase, involved in the complete degradation of glucoaminoglycans of the plant cell wall (Eastwood et al. 2001); ii) a putative glyoxal oxidase 1 (GOX), involved in the oxidation of short-chain aldehydes (<C4) and proven to be essential for the filamentous growth and pathogenicity of Ustilago maydis (Leuthner et al. 2005); iii) a putative class V chitin synthase (CHISV) (Fig. 2B) that, when deleted in U. maydis, impaired early fungal plant infection (Weber et al. 2006); iv) a gene similar to Marasmius edodes agglutinin (RICIN) (Fig. 2B), which is a lectin containing a ricin B chain $(QXW)_3$ (Grahn et al. 2007) that could bind to the plant's carbohydrate moieties, thus aiding the Moniliophthora perniciosa parasitic mycelium to colonize the apoplast; and v) a putative CERAT, which is a small phytotoxic protein secreted by the ascomycete Ceratocystis fimbriata f. sp. platani, the causal agent of canker stain disease (Pazzagli et al. 1999).

Further evidence for the induction of these putative pathogenicity genes in the biotrophic-like mycelium comes from the real-time RT-PCR analysis of the GOX (Fig. 7), CERAT (Fig. 7), class V chitin synthase (CHISV in Fig. 6), and the agglutinin homolog (RICIN in Fig. 6).

The induction of these putative pathogenicity genes could be related to the apparent NCR in the biotrophic-like mycelium of *M. perniciosa*, which would be consistent with a series of reports correlating nitrogen starvation to the expression of pathogenicity factors in several fungal species studied by global gene expression, single gene expression, or knockout mutant analyses (Coleman et al. 1997; Csank and Haynes 2000; Donofrio et al. 2006; Lau and Hamer 1996; Marzluf 1997; Pieterse et al. 1994; Solomon and Oliver 2001; Solomon et al. 2005; Soundararajan et al. 2004).

Moreover, the signaling pathways involved in nitrogen starvation have been shown to regulate the disease cycle in some fungal species, specially in the hemibiotrophic fungi Colletotrichum lindemuthianum, in which the switch from biotrophy to necrotrophy is controlled by the AREA-like regulator Clnr1 (Divon and Fluhr 2007; Dufresne et al. 2000). Therefore, the apparent NCR observed in the biotrophic-like mycelium could also be important in controlling the M. perniciosa life cycle. In addition, AROM expression could also contribute to fungal pathogenicity. For instance, Trp and Phe are precursors of the plant growth-promoting hormones indole 3-acetic acid (IAA) and salicylic acid (SA), respectively, and both of these compounds could be important for WBD progression (Kilaru et al. 2007). Tyr could also be important because it is a precursor of the free-radical scavenger and pathogenicity-related compound melanin (Jacobson 2000).

In view of these results, we propose that, during the biotrophic phase, the fungus causes the disease symptoms, probably by expressing pathogenicity genes controlled by a condition of nutrient starvation. After a variable period, the affected plant tissues turn necrotic and the cells break open, thus releasing soluble nutrients into the apoplastic space. Taken together, the apparent CCR and NCR suggest that availability of appropriate nitrogen and carbon nutrient sources in the apoplastic space of the cacao plant could determine the length of the biotrophic, symptom-causing stage of the fungus. If so, manipulation of nitrogen and fermentable sugar availability inside the apoplast could possibly be used in the field to induce an early switch to saprotrophic *M. perniciosa*, and thus modify the disease interaction.

Mitochondrial metabolism and growth rate.

We looked for clues to understand why the biotrophic mycelium showed such poor growth when compared with the saprotrophic mycelia. We found that a gene with sequence similarity to *ngr1* of *S. cerevisiae* was induced in the biotrophic-like mycelium by DNA microarray analysis (Fig. 2B). The protein encoded by this gene is known to negatively regulate growth of yeast by binding to the 3' untranslated region of the mitochondrial porin mRNA and thus accelerates mitochondrial degradation (Akada et al. 1997; Gardner et al. 2005). Because mitochondrial impairment would result in less production of ATP, the presence of this transcript could help explain the slow growth shown by the biotrophic mycelium.

Furthermore, the EST analysis revealed the presence of more transcripts putatively involved in NADH regeneration (indicated by the presence of the NAD⁺-dependent FDH and the enzymes of the malate shunt in the subtracted library) and higher synthesis of cytochromes (substantiated by the presence of the 5-aminolevulinate synthase and several cytochrome genes) in the saprotrophic mycelium induced with host extracts (E-Sap-CP and E-Sub[C-G]). Real-time RT-PCR analysis confirmed the induction of the putative NAD⁺-dependent FDH and COX in the saprotrophic mycelium in the presence of cacao extract (Fig. 7).

These results indicate a possible induction of the cytochromemediated electron transport chain in the saprotrophic mycelium when grown in the presence of cacao-pod extract, which coincides with the presence of ribosomal proteins encoded by the mitochondrial genome. Because greater amounts of ATP may be produced in the saprotrophic mycelium grown in cacao-pod extract by means of mitochondrial oxidative phosphorylation, the resulting higher energy availability would be reflected in the higher growth rate of the mycelium observed in the cacao-extract media and confirmed by the analysis of the non-normalized libraries.

Moreover, the identification of these processes in the cDNA libraries suggests a possible link with the saprotrophic development of the fungus in the plant. For instance, electron leakage from the cytochrome-mediated electron transport chain could supply ROS (Liu et al. 2002) needed for the enzymatic degradation of the plant cell wall (Fernandes et al. 2005; Kapich et al. 1999). The induction in the saprotrophic mycelium of genes that encode for the mitochondrial antioxidant enzymes manganese superoxide dismutase and cytochrome C peroxidase (CYTcP) (Giles et al. 2005) (Fig. 7), suggests that M. perniciosa is able to cope with ROS derived from the cytochrome-mediated respiratory pathway in this developmental stage. In addition, we observed the induction of a tyrosinase (Fig. 6, TYR), which is an enzyme that catalyzes the production of anti-oxidative melanin (Halaouli et al. 2006), and could also participate in this mechanism.

Differential expression of transposable elements.

Genes involved in transposition and retrotransposition were also induced in the biotrophic-like mycelium, but other integrases were found upregulated in the saprotrophic mycelium. These results suggest that the activation of different types of transposable elements may be regulated during the fungus's life cycle. This observation is interesting, given that we have proposed previously that one of the mechanisms used by this homothallic fungus to generate its chromosome-length polymorphisms is through the activation of transposable elements, and this high genetic variability could be correlated to the adaptive success this species has shown in overcoming cacao resistance in several South American cacao-producing regions (Bartley 1986; Rincones et al. 2003, 2006).

Identification of transcripts

with putative antifungal properties.

Further analysis of the annotated sequences revealed two putative transcripts with antifungal properties: a thaumatin-like protein (Frendo et al. 1992) and a KP4 toxin (Gage et al. 2002). The thaumatin-like protein was annotated only for the E-Sap-CP library, but real-time RT-PCR analysis of this transcript indicates that it is induced in both the biotrophic-like and saprotrophic mycelia grown in cacao-meristem extract and glycerol (Fig. 7).

On the other hand, the KP4 toxin appeared only in both saprotrophic libraries, and the real-time analysis confirmed that it is more induced in this stage than in the biotrophic-like mycelium (Fig. 7). The annotation of a putative KP4 toxin in the cDNA libraries of the saprotrophic mycelium of M. perniciosa is of interest for the biology of this fungus. Killer proteins are produced by fungal viruses that do not exist outside their host or cause a lytic infection. These virally encoded toxins allow their host to kill competing fungal strains, even from the same species (Palfree and Bussey 1979; Schmitt and Breinig 2002, 2006; Weiler et al. 2002). Therefore, expression of these toxins during the saprotrophic stage of the fungus could aid in preventing the colonization of the infected tissue by competing saprotrophic fungi and, if expressed during the biotrophic phase, could also help maintain homozygocity in this homothallic fungal pathogen by preventing the colonization of multiple strains of *M. perniciosa*.

Concluding remarks.

In conclusion, our DNA microarrays and EST analyses successfully identified numerous genes and metabolic pathways that show differential gene expression between the biotrophiclike and saprotrophic mycelia of M. perniciosa. This is the first global transcriptome analysis between the two life stages of a hemibiotrophic plant pathogen and has aided in improving our understanding of the molecular mechanisms that appear to be involved in its parasitic development and colonization of cacao tissues. However, in light of the fact that the experimental system used here did not include plant-pathogen interactions, the genes and metabolic pathways identified here as upregulated in the biotrophic-like mycelium must be further confirmed with regard to their involvement in the pathogenicity process using techniques to study gene expression in planta and for the study of gene function, such as the development of knockout mutants and phenotype analysis. Our current efforts are directed at establishing these systems in order to further unravel the molecular mechanisms underlying WBD.

MATERIALS AND METHODS

Fungal strain and growth conditions.

Two fungal isolates of *M. perniciosa* were used: BP10 and CP02. These isolates are monosporic cultures obtained from two different basidiomes found on infected cacao tissue in the cacao-growing region of the Bahia State, Brazil. Isolate CP02 is the same used for the Witches' Broom Genome Project and belongs to karyotype group 1, one of the two genotypes found in the cocoa-producing region of Bahia (Rincones et al. 2006). Isolate BP10 belongs to karyotype group 2, the other genotype found in this region, and was characterized by faster growth and greater ease of basidiome production under laboratory conditions. Cultures of these isolates were maintained on plates of malt yeast extract agar (BD Biosciences-Difco, Detroit) at 27°C and can be obtained from our laboratory.

Isolate CP02 was used to construct the subtracted cDNA library (E-Sap[C-G]; enriched with transcripts upregulated in the saprotrophic mycelia grown in cacao extract) and two of the three non-normalized cDNA libraries, E-Sap-Glu and E-Sap-CP. In order to obtain RNA from the saprotrophic phase of isolate CP02, 10 culture bottles containing glucose-defined media (0.6% potassium nitrate, 0.05% potassium chloride,

0.05% magnesium sulfate, 0.15% monobasic potassium phosphate, traces of iron sulfate and zinc sulfate, and 1% Dextrose, pH 6.8) were inoculated with 20 to 30 small agar blocks (1 mm²) containing saprotrophic hyphae of this isolate. The cultures were incubated at 27°C and agitated at 200 rpm for 7 days. After this period, the media was removed and new media was added. In half of the cultures we added new glucose minimal media, and in the other half we added cacao-pod extract media (the same as the media above, but instead of dextrose it contained 1% lyophilized finely ground cacao-pod tissues); this cacao powder was kept inside a dialysis membrane (size cutoff at 12 kDa), so that only exudates from the cacao tissue permeated into the media. In order to obtain most of the shortduration transcripts (Newman et al. 1994), the cultures were grown in the new media for five different growth periods: 24 h, 48 h, 72 h, 6 days, and 8 days.

Isolate BP10 was used to construct the cDNA library corresponding to biotrophic-like mycelium induced by cacao meristem extracts and was also used for the three conditions assayed in the microarray analyses: i) A-Bio-CM, ii) A-Sap-CM, and iii) A-Sap-Gly.

Biotrophic-like cultures of isolate BP10 of M. perniciosa were obtained in vitro as described by Meinhardt and associates (2006). Briefly, spores from strain BP10 were plated on solid media (3% agar, 2% glycerol, caffeine at 5 mg liter⁻¹, and indole-3-acetic acid [Auxin] at 10 mg liter⁻¹) and incubated in the dark at 28°C until small white colonies appeared. Small agar blocks containing the colonies were transferred to liquid media (0.5% yeast extract, 5% glycerol, 0.25% K₂HPO₄, and 0.1% MPR trace elements solution [Mandels et al. 1962]) and incubated at 27°C in the dark with 120 rpm agitation. Colonies were allowed to grow for 14 days and, afterward, the mycelia were induced by the addition of 1% extract of young cacao meristems (3 g of frozen cacao meristems homogenized in 50 ml of the same liquid media and filter sterilized). Colonies were allowed to grow for an additional 14 days prior to RNA extraction. This biotrophic-like mycelium exhibited very slow growth; thus, a long growth period (total of 28 days) was necessary in order to obtain appropriate amounts of mycelia for RNA extraction. However, the absence of clamp connections was verified daily. This slow growth also hampered RNA extraction at different time intervals for this type of mycelium. The saprotrophic cultures of this same isolate induced with cacao meristem extract (A-Sap-CM) were obtained exactly as described for the biotrophic-like cultures, but the saprotrophic mycelium was used instead of germinated spores. The A-Sap-Gly cultures (saprotrophic mycelium grown in glycerol) were also obtained in the same way, but omitting the addition of cacao meristem extracts.

RNA isolation.

Cultures of each type were processed for RNA extraction using the RNeasy plant mini kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.). Qualitative and quantitative analyses of the RNA samples were performed through denaturing formaldehyde/agarose gel electrophoresis and optical density, as described previously (Sambrook and Russell 2001). In the case of the saprotrophic mycelia of isolate CP02 used for the construction of cDNA libraries, equivalent amounts of total RNA obtained after each growth period (24 h, 48 h, 72 h, 6 days, and 8 days) were mixed. In total, five RNA populations were obtained: i) E-Sap-Glu, ii) E-Sap-CP, iii) E-Bio-CM for EST and A-Bio-CM for microarray analyses, iv) A-Sap-CM, and v) A-Sap-Gly.

DNA microarrays assemblage.

The database of the Witches' Broom Genome Project was mined using the software Gene Projects (software registered under protocol INPI 005–09/01/2004). Clones were designated according to the nomenclature system of the *M. perniciosa* Genome project, in which the strain, library name, library number, and plate number are considered. Description of shotgun reads nomenclature is shown in Supplementary Data D. In all, 2,304 clones were selected, showing significant sequence similarity (BLASTx, *e* value \leq 1E-05) to genes that code for known proteins of other fungal species. A fragment of a gene showing significant sequence similarity to a polyubiquitin of several fungal species was selected as a positive control. PCRamplified inserts of the selected clones were purified, adjusted to a concentration of 300 ng μ l⁻¹, and spotted in triplicates onto aminosilane-treated glass slides (GAPS II; Corning Life Science, Lowell, MA, U.S.A.) using the Flexys Robot Arrayer (Perkin-Elmer Life Sciences, Waltham, MA, U.S.A.).

Amplification and labeling

of the RNA and microarray hybridization.

The mRNA of the three conditions (A-Sap-Gly, A-Sap-CM, and A-Bio-CM) was amplified from total RNA using the cRNA technique described by Gomes and associates (2003). The amplified cRNA from each population was labeled with cvanine-3 CTP and cvanine-5 CTP (Perkin-Elmer Life Sciences), according to standard procedures. The marked cRNA was purified with AutoSeq G-50 columns (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, VA, U.S.A.) following the manufacturer's protocol and quantified through spectrophotometry. Labeled samples were hybridized and washed according to standard procedures. Hybridizations included the following, with corresponding dye swaps for each comparison and one technical replicate: i) A-Bio-CM(Cy3) versus A-Sap-Gly(Cy5), ii) A-Bio-CM(Cy5) versus A-Sap-Gly(Cy3), iii) A-Sap-CM(Cy3) versus A-Sap-Gly(Cy5), and iv) A-Sap-CM(Cy5) versus A-Sap-Gly(Cy3). In each case, 4 µg of labeled sample was used per hybridization. The chips were hybridized with their labeled targets in the HybStation (Perkin-Elmer Life Sciences) for 1 h at 55°C, 1 h at 50°C, and 19 h at 42°C. Washes were performed at 37°C with mild agitation as follows: 15 min in wash no. 1 (2× SSC [1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate]), one time; 15 min in wash no. 2 (0.1× SSC and 0.1% sodium dodecyl sulfate), two times; and 15 min in wash no. 3 $(0.1 \times SSC)$, two times. Slides were immediately dried by centrifugation at 1,000 rpm for 2 min and scanned with a confocal laser scanner (ScanArray Express; Perkin-Elmer Life Sciences). Preliminary data analysis was performed using the ScanArray Express software package (Perkin-Elmer Life Sciences). After dye-swap correction, nonlinear intensity-dependent dye bias was normalized within slides using the Lowess method (Yang et al. 2002). Normalization between technical replicates was done using empirical Bayesian statistics described with LIMMA (Smyth and Speed 2003). Fold changes were calculated by comparing the treatment channel (A-Sap-CM or A-Bio-CM) with the control channel (A-Sap-Gly). P values were generated by performing moderated t statistic (Lonnstedt and Speed 2002) on the comparison of normalized data points in the experimental versus the control channels. We selected genes showing significant P value (<0.05) and with fold changes \geq 2.0. Differentially expressed genes were classified as induced (+) or repressed (-).

A clusterization analysis of the differentially expressed genes was performed using the fold change between samples A-Sap-CM versus A-Sap-Gly and A-Bio-CM versus A-Sap-Gly, with the reference value of the A-Sap-Gly sample considered 0 (Paux et al. 2005). Data clusterization was performed using the tools available at the EPClust website. The hierarchical clusterization method was applied using correlation measured based distance and complete linkage. In order to visualize the clusters, we used the color matrix Green-Black-Red (10 exponential). Differentially expressed genes were subjected to BLASTx analysis and were manually annotated according to the Gene Ontology classification.

Construction of cDNA libraries.

Because limited amounts of RNA were obtained using the RNeasy protocol, the cDNA populations for library construction were created using the BD SMART cDNA synthesis system (BD Biosciences-Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.), which allows the creation of cDNA from small amounts of total RNA through the use of long-distance PCR (LD-PCR). We used 1 µg of total RNA to generate each of the cDNA populations. The E-Sap-Glu, E-Sap-CP, and E-Bio-CM full-length libraries were constructed following the protocol of the BD Creator SMART cDNA Library Construction kit (BD Biosciences) and directionally cloned into the pDNR-LIB plasmid, according to the manufacturer's instructions. The plasmids were then transformed into One-Shot Escherichia coli DH10B strain (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, U.S.A.) by electroporation. Individual white bacterial colonies derived from all three libraries were transferred to 96-well microtiter dishes and grown in freezing medium (0.5% NaCl Luria-Bertani medium with 10% glycerol) prior to plasmid extraction or storage at -80°C. EST clones were designated using the nomenclature system created for the M. perniciosa Genome Project in which the strain, library name, library number, and plate number are considered.

In addition, a subtracted cDNA library was created, enriched for transcripts differentially expressed in the cacao-induced saprotrophic mycelium with regard to the glucose-grown saprotrophic mycelium of isolate CP02. For this subtracted library, we generated two cDNA populations: cacao-induced (tester) and glucose (driver) using the Super SMART cDNA synthesis kit (BD Biosciences) and used in the subsequent steps of the suppressive subtractive hybridization procedure, according to the instructions of the BD Clontech PCR-Select Subtraction kit (BD Biosciences). The products of the secondary PCR were inserted into the pGEM TEasy plasmid vector (Promega Corporation, Madison, WI, U.S.A.) according to the manufacturer's instruction and transformed into One-shot E. coli DH10B strain (Invitrogen Corporation) by electroporation. This subtracted library was denominated E-Sap(C-G). The efficiency of the subtraction process was independently confirmed via cDNA macroarray dot-blot differential screening (data not shown), as suggested by the manufacturer's protocol and other authors (Cramer and Lawrence 2004).

EST sequencing and analysis.

Plasmid DNA was extracted according to Engebrecht and associates (1998) and DNA sequence analysis was carried out using the DYEnamic ET Dye Terminator kit (Amersham Biosciences) in a MegaBACE 1000 capillary sequencer (Amersham Biosciences). Chromatograms were submitted to the M. perniciosa database and subjected to automatic base calling and quality control using PHRED (Ewing et al. 1998); vector and polylinker sequences were masked using Cross-Match. All reads were searched for similarities against the NCBI nonredundant database using the BLASTx algorithm and against the M. perniciosa genomic database using the BLASTn algorithm of BLAST, version 2.1 (Altschul et al. 1997). Only reads that complied with one or more of the following criteria were further selected for trimming and clusterization: i) more than 200 bp with >20 quality grade attributed by PHRED (Ewing et al. 1998); ii) significant similarity with proteins in the NCBI nonredundant database (BLASTx with *E* value \leq 1E-05), and iii) significant similarity with nucleotide sequences in the M. per*niciosa* genomic database (BLASTn with E value \leq 1E-10). The selected reads were further trimmed according to Telles and Silva (2001) and clusterized using CAP3 (Huang and Madan 1999). Short clusters (≤100 bp) and clusterization artifacts were removed (Telles et al. 2001). Remaining clusters were subjected to similarity searches against the NCBI nonredundant database using the BLASTx algorithm and against the M. perniciosa genomic database using the BLASTn algorithm (Altschul et al. 1997). Results from the similarity searches for each cluster were made available on-line with links to the annotation page created for the M. perniciosa Genome Project. Clusters were annotated manually and classified according to the Functional Catalogue FunCat (Ruepp et al. 2004). Because all four libraries were clusterized together, an electronic Northern algorithm was used to visualize the distribution per library of the reads that form each cluster. This program is an in silico transcription profiling algorithm that counts the number of sequenced EST of a given gene within the whole EST population (normalized counts). This type of approach has been used before for other organisms (Audic and Claveric 1997; Clegg et al. 2002; Ohlrogge and Benning 2000; Ribichich et al. 2005).

Real-time PCR.

Real-time PCR analysis was performed for 38 selected genes (Table 2) using the standard curve method (Larionov et al. 2005). The different genes were assayed in the three different RNA samples used for DNA microarray analyses, and the sample A-Sap-Gly was used as the normalizing condition. In all, 16 of these transcripts were selected based on the EST analysis, 19 were selected from the microarray analysis, and the remaining 3 were tested with regard to their stability between samples in order to use them as endogenous references: putative glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPDH), putative β -actin (ACT), and putative 60S rRNA (60S) (Table 2).

Total RNA (1 µg, treated with RO1 DNAseI according to the manufacturer's instructions; Invitrogen Corporation) was reverse transcribed using ImPromII (Promega Corporation) following the manufacturer's protocol using 4 mM MgCl₂ in a total volume of 20 µl. All PCR primers (MWG Biotech, Inc., Huntsville, AL, U.S.A.) were designed using the GeneScript online Real-Time Primer Design tool and sequence data from the Witches' Broom Genome Project (Table 2). The primer temperature was set at 59 to 61°C and the amplicon size to 100 to 105 bp. The three sets of primers were used as possible internal controls span exon-exon boundaries, and thus were used to check the presence of genomic DNA in the different samples. Quantitative PCR was performed using SYBRGreen for the detection of fluorescence during amplification and assays were performed on an ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (SDS) coupled to the ABI PRISM 7500 SDS software (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.), using standard settings. A 16-µl RT-PCR reaction consisted of 8 µl of SYBRGreen Master Mix (Applied Biosciences), 300 nM each primer, and 25 ng of single-stranded cDNA. The thermal cycling conditions for SYBRGreen RT-PCR were 50°C for 2 min, then 94°C for 10 min, followed by 40 cycles of 94°C for 15 s and 60°C for 1 min. If the primer annealing temperature was lower than 60°C, an additional annealing step was added to the cycle for 30 s, prior to polymerization. A dissociation analysis was conducted after all amplifications to inspect for the formation of primer dimers and extraneous unintentional amplicons, such as the ones arising from amplification of genomic DNA. Melting temperatures of the fragments were determined according to the manufacturer's protocol (Table 2). No-template reactions were included as negative controls in every plate, and the standard curve of every primer pair was included in each experiment. Standard curves for each primer

ng μl^{-1} in six 10-fold dilution steps and used for regression analyses. The variance of the duplicate measurements was <1%. Sequence Detection Software (Applied Biosystems) results were imported into Microsoft Excel for further analysis. Raw expression levels were calculated from the average of the duplicate cycle threshold values using the standard curve obtained for each primer pair (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System User Bulletin No. 2). A normalization factor was obtained from the raw expression levels of the three normalization transcripts for each sample using the geNORM applet for Microsoft Excel (Vandesompele et al. 2002). For each gene, the fold change of expression level was obtained by dividing the normalized expression level of the same gene in the test conditions (A-Bio-CM and A-Sap-CM) by the normalized expression level of the gene in the control condition (A-Sap-Gly). The normalized expression level of each gene was obtained by dividing the average expression level of the gene by the normalization factor calculated by the geNorm algorithm.

pair were generated by serial dilutions of sample cDNA at 40

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Brazilian financing agencies FAPESP (Process Nos. 2002/09280-1 and 2005/60432-5), CNPq (Process No. 471609/2003-0), Cargill, and SEAGRI. We also thank A. Pomela and the *Fazenda Almirante Cacao* for providing *M. perniciosa* isolates and spores used in this study.

LITERATURE CITED

- Aime, M. C., and 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.
- Akada, R., Yamamoto, J., and Yamashita, I. 1997. Screening and identification of yeast sequences that cause growth inhibition when overexpressed. Mol. Gen. Genet. 254:267-274.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
- Audic, S., and Claveric, J. M. 1997. The significance of digital gene expression profiles. Genome Res. 7:986-995.
- Bartley, B. G. D. 1986. Cacao, *Theobroma cacao*. Pages 25-42 in: Breeding for Durable Resistance in Perennial Crops. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Bidochka, M. J., Burke, S., and Ng, L. 1999. Extracellular hydrolytic enzymes in the fungal genus *Verticillium*: Adaptations for pathogenesis. Can. J. Microbiol. 45:856-864.
- Brazilian Ministry of Agriculture. 2005. Brazilian Agriculture in Figures: Agriculture—Production, Acreage, Yield, Imports, Exports, States Main Producers. 1991-2004: Permanent Crops/cocoa. Published online.
- Ceita, G. D. O., Macedo, J. N. A., Santos, T. B., Alemanno, L., Gesteira, A. D., Micheli, F., Mariano, A. C., Gramacho, K. P., Silva, D. D. C., Meinhardt, L., Mazzafera, P., Pereira, G. A. G., and Cascardo, J. C. D. M. 2007. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora pemiciosa*. Plant Sci. 173:106-117.
- Chuaqui, R. F., Bonner, R. F., Best, C. J. M., Gillespie, J. W., Flaig, M. J., Hewitt, S. M., Phillips, J. L., Krizman, D. B., Tangrea, M. A., Ahram, M., Linehan, W. M., Knezevic, V., and Emmert-Buck, M. R. 2002. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. Nat. Genet. 32:509-514.
- Clegg, N., Eroglu, B., Ferguson, C., Arnold, H., Moorman, A., and Nelson, P. S. 2002. Digital expression profiles of the prostate androgen-response program. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 80:13-23.
- Coleman, M., Henricot, B., Arnau, J., and Oliver, R. P. 1997. Starvationinduced genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are also induced during growth *in planta*. Mol. Plant-Microbe Interact. 10:1106-1109.
- Cramer, R. A., and Lawrence, C. B. 2004. Identification of Alternaria brassicicola genes expressed in planta during pathogenesis of Arabidopsis thaliana. Fungal Genet. Biol. 41:115-128.
- Csank, C., and Haynes, K. 2000. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett. 189:115-120.

- Deising, H., Rauscher, M., Haug, M., and Heiler, S. 1995. Differentiation and cell-wall degrading enzymes in the obligately biotrophic rust fungus *Uromyces viciae fabae*. Can. J. Bot. Rev. Can. Bot. 73:S624-S631.
- Derisi, J. L., Iyer, V. R., and Brown, P. O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science 278:680-686.
- Divon, H. H., and Fluhr, R. 2007. Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett. 266:65-74.
- Dongowski, G. and Bock, W. 1981. Characterization of the cleaving mechanism of pectinesterase of Aspergillus niger. Nahrung 25:K5-K7.
- Donofrio, N. M., Oh, Y., Lundy, R., Pan, H., Brown, D. E., Jeong, J. S., Coughlan, S., Mitchell, T. K., and Dean, R. A. 2006. Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Fungal Genet. Biol. 43:605-617.
- Do Rio, M. C. S., De Oliveira, B. V., Thomazella, D. P. T., Da Silva, J. A. F., and Pereira, G. A. G. 2008 Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the Witches' Broom Disease of cacao. Curr. Microbiol. 56:363-370.
- Dufresne, M., Perfect, S., Pellier, A. L., Bailey, J. A., and Langin, I. 2000. A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. Plant Cell 12:1579-1589.
- Eastwood, D. C., Kingsnorth, C. S., Jones, H., and Burton, K. S. 2001. Genes with increased transcript levels following harvest of the sporophores of *Agaricus bisporus* have multiple physiological roles. Mycol. Res. 105:1223-1230.
- Engebrecht, J., Brent, R., and Kaderbhai, M. A. 1998. Unit 1.6. minipreps of plasmid DNA. Pages 1.6.1-1.6.3. in: Current Protocols in Molecular Biology. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, (eds.), John Wiley and Sons, New York.
- Evans, H. C. 1978. Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosa*) in Ecuador. I. The fungus. Ann. Appl. Biol. 89:186-192.
- Evans, H. C. 1980. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' broom disease of cocoa. Trans. Br. Mycol. Soc. 74:515-526.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., and Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. Genome Res. 8:175-185.
- Fernandes, L., Loguercio-Leite, C., Esposito, E., and Reis, M. M. 2005. In vitro wood decay of *Eucalyptus grandis* by the basidiomycete fungus *Phellinus flavomarginatus*. Int. Biodeterior. Biodegrad. 55:187-193.
- Ferreira, R. B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C. N., Chen, Z. J., Batista, L. M., Duarte, J., Borges, A., and Teixeira, A. R. 2006. Fungal pathogens: The battle for plant infection. Crit. Rev. Plant Sci. 25:505-524.
- Ferreira, R. B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C. N., Chen, Z., Batista, L. M., Duarte, J., Borges, A., and Teixeira, A. R. 2007. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. Mol. Plant Pathol. 8:677-700.
- Frendo, P., Didierjean, L., Passelegue, E., and Burkard, G. 1992. Abiotic stresses induce a thaumatin-like protein in maize, cDNA isolation and sequence analysis. Plant Sci. 85:61-69.
- Gage, M. J., Rane, S. G., Hockerman, G. H., and Smith, T. J. 2002. The virally encoded fungal toxin KP4 specifically blocks L-type voltagegated calcium channels. Mol. Pharmacol. 61:936-944.
- Gao, H. C., Wang, Y., Liu, X. D., Yan, T. F., Wu, L. Y., Alm, E., Arkin, A., Thompson, D. K., and Zhou, J. Z. 2004. Global transcriptome analysis of the heat shock response of *Shewanella oneidensis*. J. Bacteriol. 186:7796-7803.
- Gardner, J. M., McBryde, C., Vystavelova, A., Lopes, M. D., and Jiranek, V. 2005. Identification of genes affecting glucose catabolism in nitrogen-limited fermentation. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Yeast Res. 5:791-800.
- Giles, S. S., Perfect, J. R., and Cox, G. M. 2005. Cytochrome c peroxidase contributes to the antioxidant defense of *Cryptococcus neoformans*. Fungal Genet. Biol. 42:20-29.
- Gotesson, A., Marshall, J. S., Jones, D. A., and Hardham, A. R. 2002. Characterization and evolutionary analysis of a large polygalacturonase gene family in the oomycete plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. Mol. Plant-Microbe Interact. 15:907-921.
- Grahn, E., Askarieh, G., Holmner, A., Tateno, H., Winter, H. C., Goldstein, I. J., and Krengell, U. 2007. Crystal structure of the *Marasmius oreades* mushroom lectin in complex with a Xenotransplantation epitope. J. Mol. Biol. 369:710-721.
- Gratao, P. L., Polle, A., Lea, P. J., and Azevedo, R. A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Funct. Plant Biol. 32:481-494.
- Griffith, G. W., Nicholson, J. N., Nenninger, A., Birch, R. N., and Hedger, J. N. 2003. Witches' brooms and frosty pods: Two major pathogens of cacao. N. Z. J. Bot. 41:423-435.

- Hahn, M., and Mendgen, K. 1997. Characterization of *in planta* induced rust genes isolated from a haustorium-specific cDNA library. Mol. Plant-Microbe Interact. 10:427-437.
- Hahn, M., Neef, U., Struck, C., Gottfert, M., and Mendgen, K. 1997. A putative amino acid transporter is specifically expressed in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. Mol. Plant-Microbe Interact. 10:438-445.
- Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J. C., Hamdi, M., and Lomascolo, A. 2006. Fungal tyrosinases: New prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. J. Appl. Microbiol. 100:219-232.
- Helmann, J. D., Wu, M. F. W., Kobel, P. A., Gamo, F. J., Wilson, M., Morshedi, M. M., Navre, M., and Paddon, C. 2001. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. J. Bacteriol. 183:7318-7328.
- Herrmann, K. M. 1995a. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. Plant Physiol. 107:7-12.
- Herrmann, K. M. 1995b. The shikimate pathway—early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. Plant Cell 7:907-919.
- Huang, X. and Madan, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res. 9:868-877.
- Jacobson, E. S. 2000. Pathogenic roles for fungal melanins. Clin. Microbiol. Rev. 13:708-717.
- Kapich, A. N., Jensen, K. A., and Hammel, K. E. 1999. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett. 461:115-119.
- Kilaru, A., Bailey, B. A., and Hasenstein, K. H. 2007. Moniliophthora perniciosa produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett. 274:238-244.
- Larionov, A., Krause, A., and Miller, W. 2005. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. BMC Bioinf. 6:62.
- Lau, G., and Hamer, J. E. 1996. Regulatory genes controlling MPG1 expression and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Plant Cell 8:771-781.
- Lawrence, J. S., Campelo, A. M. F. L., and Figuereido, J. M. 1991. Enfermidades do cacaueiro II—Doenças fúngicas que ocorrem nas folhas, ramos e tronco. Agrotropica 3:1-14.
- Lenz, H., Wunderwald, P., and Eggerer, H. 1976. Partial purification and some properties of oxalacetase from *Aspergillus niger*. Eur. J. Biochem. 65:225-236.
- Leuthner, B., Aichinger, C., Oehmen, E., Koopmann, E., Muller, O., Muller, P., Kahmann, R., Bolker, M., and Schreier, P. H. 2005. A H₂O₂-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. Mol. Genet. Genomics 272:639-650.
- Liu, Y. B., Fiskum, G., and Schubert, D. 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. J. Neurochem. 80:780-787.
- Lonnstedt, I., and Speed, T. 2002. Replicated microarray data. Stat. Sin. 12:31-46.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, F., Prior, B. A., Ramos, J., Thevelein, J. M., and Hohmann, S. 1994. The Fps1 gene-product functions as a glycerol facilitator in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Folia Microbiol. 39:534-536.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W. F., Prior, B. A., Ramos, J., Thevelein, J. M., and Hohmann, S. 1995. Fps1, A yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J. 14:1360-1371.
- Mabrouk, S. S., Abdel-Fattah, A. F., and Ismail, A. M. 1979. Preparation and properties of pectic enzymes produced by *Trichoderma lignorum*. Zentralbl. Bakteriol. Naturwiss. 134:282-286.
- Mandels, M., Reese, E. T., and Parrish, F. W. 1962. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. J. Bacteriol. 83:400.
- Marzluf, G. A. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:17-32.
- Meinhardt, L. W., Bellato, C. D., Rincones, J., Azevedo, R. A., Cascardo, J. C. M., and Pereira, G. A. G. 2006. In vitro production of biotrophiclike cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. Curr. Microbiol. 52:191-196.
- Nakagawa, T., Miyaji, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N., and Tomizuka, N. 2000. A methylotrophic pathway participates in pectin utilization by *Candida boidinii*. Appl. Environ. Microbiol. 66:4253-4257.
- Nakagawa, T., Yamada, K., Fujimura, S., Ito, T., Miyaji, T., and Tomizuka, N. 2005. Pectin utilization by the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. Microbiol.-SGM 151:2047-2052.
- Newman, T., de Bruijin, F. J., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., McIntosh, L., Ohlrogge, J., Raikhel, N., and Thomashow, M. 1994. Genes Galore: A summary of methods for accessing results from largescale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. Plant Physiol. 106:1241-1255.
- Ohlrogge, J., and Benning, C. 2000. Unraveling plant metabolism by EST analysis. Curr. Opin. Plant Biol. 3:224-228.
- Palfree, R. G. E., and Bussey, H. 1979. Yeast killer toxin—purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 93:487-493.
- Paux, E., Carocha, V., Marques, C., de Sousa, A. M., Borralho, N., Sivadon, P., and Grima-Pettenati, J. 2005. Transcript profiling of *Eucalyptus* xylem genes during tension wood formation. New Phytol. 167:89-100.
- Pazzagli, L., Cappugi, G., Manao, G., Camici, G., Santini, A., and Scala, A. 1999. Purification, characterization, and amino acid sequence of ceratoplatanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp *platani*. J. Biol. Chem. 274:24959-24964.
- Penman, D., Britton, G., Hardwick, K., Collin, H. A., and Isaac, S. 2000. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. Mycol. Res. 104:671-675.
- Pereira, J. L., Ram, A., Figuereido, J. M., and de Almeida, L. C. 1989. La primera aparición de la "escoba de bruja" en la principal área productora de cacao del Brasil. Turrialba 39:459-461.
- Pereira, J. L., de Almeida, L. C., and Santos, S. M. 1996. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: Attempts at eradication and containment. Crop Prot. 15:743-752.
- Phalip, V., Delalande, F., Carapito, C., Goubet, F., Hatsch, D., Leize-Wagner, E., Dupree, P., Van Dorsselaer, A., and Jeltsch, J. M. 2005. Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. Curr. Genet. 48:366-379.
- Pieterse, C. M. J., Derksen, A. M. C. E., Folders, J., and Govers, F. 1994. Expression of the *Phytophthora infestans ipib* and *ipio* genes in planta and in vitro. Mol. Gen. Genet. 244:269-277.
- Prieto, R., and Woloshuk, C. P. 1997. ord1, an oxidoreductase gene responsible for conversion of O-methylsterigmatocystin to aflatoxin in *Aspergillus flavus*. Appl. Environ. Microbiol. 63:1661-1666.
- Purdy, L. H., and Schmidt, R. A. 1996. Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology and management. Annu. Rev. Phytopathol. 34:573-594.
- Qi, W. H., Chil, K., and Trail, F. 2006. Microarray analysis of transcript accumulation during perithecium development in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). Mol. Genet. Genomics 276:87-100.
- Rajeevan, M. S., Vernon, S. D., Taysavang, N., and Unger, E. R. 2001. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. J. Mol. Diagn. 3:26-31.
- Ribichich, K. F., Salem-Izacc, S. M., Georg, R. C., Vencio, R. Z., Navarro, L. D., and Gomes, S. L. 2005. Gene discovery and expression profile analysis through sequencing of expressed sequence tags from different developmental stages of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. Eukaryot. Cell 4:455-464.
- Rincones, J., Meinhardt, L. W., Vidal, B. C., and Pereira, G. A. 2003. Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. Mycol. Res. 107:452-458.
- Rincones, J., Mazotti, G. D., Griffith, G. W., Pomela, A., Figueira, A., Leal, G. A., Queiroz, M. V., Pereira, J. F., Azevedo, R. A., Pereira, G. A. G., and Meinhardt, L. W. 2006. Genetic variability and chromosomelength polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis perniciosa* from various plant hosts in South America. Mycol. Res. 110:821-832.
- Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., Tetko, I., Guldener, U., Mannhaupt, G., Munsterkotter, M., and Mewes, H. W. 2004. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. Nucleic Acids Res. 32:5539-5545.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Scarpari, L. M., Meinhardt, L. W., Mazzafera, P., Pomella, A. W., Schiavinato, M. A., Cascardo, J. C., and Pereira, G. A. 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.
- Schmitt, M. J. and Breinig, F. 2002. The viral killer system in yeast: From

molecular biology to application. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Rev. 26:257-276.

- Schmitt, M. J., and Breinig, F. 2006. Yeast viral killer toxins: Lethality and self-protection. Nat. Rev. Microbiol. 4:212-221.
- Silva, S. D. V. M., and Matsuoka, K. 1999. Histologia da Interação *Crinipellis perniciosa* em Cacaueiros Suscetível e Resistente à Vassoura-de-Bruxa. Fitopatol. Bras. 24:54-59.
- Smyth, G. K., and Speed, T. 2003. Normalization of cDNA microarray data. Methods 31:265-273.
- Solomon, P. S., and Oliver, R. P. 2001. The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*. Planta 213:241-249.
- Solomon, P. S., and Oliver, R. P. 2002. Evidence that γ-aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporum fulvum* infection of tomato. Planta 214:414-420.
- Solomon, P. S., Waters, O. D. C., Simmonds, J., Cooper, R. M., and Oliver, R. P. 2005. The Mak2 MAP kinase signal transduction pathway is required for pathogenicity in *Stagonospora nodorum*. Curr. Genet. 48:60-68.
- Soundararajan, S., Jedd, G., Li, X. L., Ramos-Pamplona, M., Chua, N. H., and Naqvi, N. I. 2004. Woronin body function in *Magnaporthe grisea* is essential for efficient pathogenesis and for survival during nitrogen starvation stress. Plant Cell 16:1564-1574.
- Stintzi, A. 2003. Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. J. Bacteriol. 185:2009-2016.
- Struck, C., Ernst, M., and Hahn, M. 2002. Characterization of a developmentally regulated amino acid transporter (AAT1p) of the rust fungus *Uromyces fabae*. Mol. Plant Pathol. 3:23-30.
- Telles, G. P., and Silva, F. R. 2001. Trimming and clustering sugarcane ESTs. Genet. Mol. Biol. 24:17-23.
- Telles, G. P., Braga, M. D. V., Dias, Z., Lin, T. L., Quitzau, J. A. A., da Silva, F. R., and Meidanis, J. 2001. Bioinformatics of the sugarcane EST project. Genet. Mol. Biol. 24:9-15.
- VanderKlei, I. J., Harder, W., and Veenhuis, M. 1991. Biosynthesis and assembly of alcohol oxidase, a peroxisomal matrix protein in methylotrophic yeasts—a review. Yeast 7:195-209.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 3:1-12.
- Weber, I., Assmann, D., Thines, E., and Steinberg, G. 2006. Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. Plant Cell 18:225-242.
- Weiler, F., Rehfeldt, K., Bautz, F., and Schmitt, M. J. 2002. The *Zygosac-charomyces bailii* antifungal virus toxin zygocin: Cloning and expression in a heterologous fungal host. Mol. Microbiol. 46:1095-1105.
- Wurmbach, E., Yuen, T., Ebersole, B. J., and Sealfon, S. C. 2001. Gonadotropin-releasing hormone receptor-coupled gene network organization. J. Biol. Chem. 276:47195-47201.
- Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D. M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T. P. 2002. Normalization for cDNA microarray data: A robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. Nucleic Acids Res. 30: e15.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCES

Brazilian Ministry of Agriculture website: www.agricultura.gov.br EMBL-EBI Expression Profiler website: ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST

Gene Ontology website: www.geneontology.org

geNorm applet: medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/

GenScript Real-Time PCR Primer Design tool:

- www.genscript.com/ssl-bin/app/primer
- Laboratório de Genômica e Expressão Witches' (LGE) Broom Genome Project: www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura

M. perniciosa Genome Project: www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura

Munich Information Center for Protein Sequences FunCat software: mips.gsf.de/projects/funcat

University of Washington Phil Green Laboratory website: www.phrap.org

Capítulo 2

Estudo da expressão dos genes do metabolismo do glicerol de Moniliophthora perniciosa cultivado in vitro e durante a interação patogênica com o cacaueiro.

Joan G. Barau, Johana Rincones, Gonçalo A. G. Pereira

(Autores do manuscrito em fase de preparação)

2.1 – Resumo

O metabolismo do Glicerol de M. perniciosa parece representar um papel importante no desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa em cacau. Além de uma potencial fonte de carbono, o Glicerol ou metabólitos de sua via de assimilação podem servir como sinalizadores para a manutenção da fase biotrófica in vivo, interagindo diretamente com o balanço energético e/ou redox da célula através do shuttle mitocondrial de Glicerol 3fosfato (G-3-P). Baseados nessas premissas, testar a hipótese de uma maior atividade do metabolismo do Glicerol de M. perniciosa durante a infecção através da análise de marcadores de expressão gênica é essencial para as próximas etapas do trabalho. Para tanto, foram caracterizados genes marcadores do processo de produção (MpGPD1, MpGPD2, MpGPD3, MpGPP1 e MpGPP2) e de assimilação de Glicerol (MpAQPn1, MpGUP1, MpSTL1, MpGLD1 e MpGLD2) sob condições controladas de cultivo in vitro. A análise da expressão desses genes durante a Vassoura-de-bruxa em cacau revelou um padrão de expressão gênica semelhante ao observado durante o consumo de Glicerol como fonte de carbono, sugerindo a utilização desse nutriente no início da infecção. Além disso, o componente mitocondrial do shuttle de G-3-P encontra-se muito induzido principalmente entre 20 e 30 dias após a infecção, sugerindo uma participação dessa via na adaptação progressiva ao stress de colonização dos tecidos do cacaueiro. A caracterização fina dos nutrientes disponíveis ao fungo no apoplasto de cacau e o estudo das alterações fisiológicas capazes de induzir uma condição de stress e aumento da atividade do shuttle G-3-P devem fornecer pistas importantes para melhor entender o modelo da Vassoura-de-bruxa em cacaueiro com ênfase no metabolismo de fontes de carbono durante a destacada fase biotrófica.

2.2 - Introdução

Um ponto-chave no desenvolvimento da doença Vassoura-de-bruxa em cacau é a fase biotrófica. É durante essa fase que as interações metabólicas cacau-*C. perniciosa* levam à morte do ramo infectado, permitindo ao fungo explorar de um modo saprofitico os recursos nutricionais do tecido vegetal morto. Esse modo de interação é comum a fungos fitopatógenos hemibiotróficos, e muito esforço científico têm sido empregado no sentido de entender como essa fase é mantida, como ocorre o *switch* morfogenético entre as fases biotrófica e necrotrófica e como o metabolismo biotrófico do fungo é capaz de induzir a morte do tecido vegetal infectado (Hahn & Mendgen, 2001).

Evidências recentes sugerem que a manutenção da fase biotrófica em *C. perniciosa* está relacionada com a utilização do glicerol como fonte de carbono. A obtenção de culturas estáveis *in vitro* mantidas no estágio morfogenético correspondente à fase biotrófica *in vivo* só é possível em meio de cultura extremamente pobre e que contenha glicerol como a única fonte de carbono (Meinhardt *et al.*, 2006). Também existem evidências de um papel importante do glicerol em outras interações planta-patógeno. O estudo de linhagens de fungo mutantes revelou que o glicerol presente nos tecidos da planta hospedeira não só é utilizado como nutriente como também representa um papel essencial ao crescimento normal e à reprodução no fungo fitopatógeno hemibiotrófico *Colletotrichum gloeosporioides* (Wei *et al.*, 2004). O estudo das alterações bioquímicas em plantas de cacau infectadas com o fungo *C. perniciosa* evidenciou um significativo acúmulo de glicerol durante a fase biotrófica (Scarpari *et al.*, 2005), sugerindo uma elevada produção de glicerol pelo ramo infectado e um papel importante desse nutriente também durante a fase biotrófica *in vivo*.

Apesar das evidências a favor da existência de um metabolismo de carbono baseado no glicerol durante a fase biotrófica de *C. perniciosa*, pouco se sabe sobre o

espectro nutricional disponível ao fungo no apoplasto de cacau. Recentemente, muita atenção tem sido dada à interface nutricional durante interações biotróficas plantapatógeno (revisado em Solomon *et al.*, 2003). Diversos estudos envolvendo a caracterização da percepção do ambiente nutricional em eucariotos têm sido realizados evidenciando a importância de transportadores nesse processo (revisado em Holsbeeks *et al.*, 2004). Coincidentemente, nos bancos de dados de *C. perniciosa* diversos ESTs com alta similaridade a facilitadores do transporte de glicerol foram encontrados (score: 172; *e-value*: 4e-42), reforçando a hipótese de uma provável utilização dessa fonte de carbono durante a fase biotrófica.

As vias primárias do metabolismo do glicerol (Figura 1) são bem conservadas em eucariotos e estão relacionadas a uma série de processos-chave do metabolismo celular, como a síntese de glicerolipídeos (Christiansen, 1978; Miquel *et al.*, 1998), manutenção do equilíbrio de óxido-redução (Ansell *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 1998; Rigoulet *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006), glicólise (van Dijken & Scheffers, 1986; Pahlman *et al.*, 2001) e *turnover* de fosfato inorgânico (van Aelst *et al.*, 1991; Luyten *et al.*, 1995).

O glicerol é um metabólito comum nas células vegetais, e existe normalmente em concentrações que variam de 1 à 2 µmol.g⁻¹ de tecido vivo (Gerber *et al.*, 1988). Embora o metabolismo do glicerol seja muito bem estudado em eucariotos através da levedura organismo-modelo *Saccharomyces cerevisiae*, muito pouco se sabe sobre as vias de produção do glicerol em plantas, além de existirem poucos trabalhos que descrevem seu metabolismo e função biológica. Aparentemente, a produção e o acúmulo de glicerol em plantas ocorre quando a respiração celular é severamente limitada por hipóxia (Gerber *et al.*, 1988). O estudo e caracterização de linhagens de *Arabidopsis thaliana* mutantes para genes das vias metabólicas básicas do glicerol, sugerem também uma interação dessas vias com as respostas de defesa a patógenos e à aquisição de resistência sistêmica

adquirida (SAR) em plantas (Nandi *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2003; Durrant & Dong, 2004; Kachroo *et al.*, 2005).

A origem do carbono convertido à glicerol em plantas é incerta. Em S. cerevisiae esse processo ocorre através de um desvio de três carbonos do fluxo glicolítico, na forma de dihidroxiacetona fosfato (DHAP), produto da reação catalisada pela enzima Aldolase e que pode subseqüentemente ser reduzido à glicerol-3-fosfato e defosforilado à glicerol. Acredita-se que a via de produção seja também conservada em plantas, no entanto, existem outras vias alternativas possíveis como a peroxidação de glicerolipídeos, liberando glicerol e ácidos-graxos (Scarpari et al., 2005) e a utilização do açúcar frutose catalisada següencialmente pela frutoguinase e frutose-1-fosfato aldolase, liberando gliceraldeído e DHAP (Pego & Smeekens, 2000). De modo interessante, durante a fase biotrófica da interação cacau-C. perniciosa os níveis de glicose e sacarose são muito maiores nas plantas infectadas, ao mesmo tempo que a concentração de frutose decresce à níveis não detectáveis (Scarpari et al., 2005). Esses resultados reforcam a possibilidade da produção de glicerol em cacau como resposta à infecção por C. perniciosa através de uma via alternativa paralela à via glicolítica e baseada no consumo da frutose. No entanto, a via de produção através da peroxidação de glicerolipídeos também é provável visto que uma das características mais marcantes das interações planta-patógeno é o rápido aumento do estresse oxidativo mediado por espécies reativas de oxigênio (notavelmente através da produção de peróxido de hidrogênio, H₂O₂) durante o processo de infecção.



Figura 1: Esquema hipotético do metabolismo básico do glicerol no fungo Moniliopthora perniciosa. Uma vez transportado para o citoplasma, o glicerol é prontamente fosforilado à glicerol-3-fosfato (G-3-P) pela enzima glicerol kinase (GUT1). G-3-P pode ser utilizado para a biossíntese de glicerolipídeos através de duas reações de acilação catalizadas pela G-3-P aciltranferase (GAT) e 1-acil-G-3-P aciltransferase (AGAT) produzindo respectivamente ácido lisofosfatídico (LPA) e ácido fosfatídico (PA). G-3-P participa do shuttle mitocondrial G-3-P que catalisa a interconversão cíclica de G-3-P à dihidroxiacetona fosfato (DHAP). A atividade do shuttle G-3-P fornece elétrons (e-) preferencialmente à ubiquinona (Q), e utilização pela Oxidase Alternativa (AOX). DHAP pode ser utilizado como fonte de carbono para a glicólise via gliceraldeído-3-fosfato pela enzima triosefosfato isomerase (TPI).

Como mencionado anteriormente, a maior parte do conhecimento disponível sobre o metabolismo do glicerol em eucariotos provém de estudos no fungo *S. cerevisiae*. Nessa levedura a produção e o metabolismo do glicerol estão intimamente ligados as respostas à estresse osmótico (Nevoight & Stahl, 1997), e à manutenção do equilíbrio de óxido-redução (redox; razão NAD+/NADH) do citoplasma (Rigoulet *et al.*, 2004). Sob hipóxia e altas concentrações de glicose, a única maneira de restaurar o equilíbrio redox em *S. cerevisiae* é através da produção de glicerol (van Djiken & Scheffers, 1986). Já sob condições aeróbicas, isso ocorre principalmente através da atividade da enzima NADH dehidrogenase externa (NDE) e através de um sistema de *shuttle* mitocondrial de glicerol-3-fosfato (G-3-P) formado por dois componentes enzimáticos, GUT2 e GPD (Figura 1).

Embora normalmente os dois sistemas operem em conjunto na manutenção do equilíbrio redox em *S. cerevisiae*, a enzima NDE parece exercer um papel central por ser mais expressa sob diversas condições (Rigoulet *et al.*, 2004). A contribuição relativa do sistema de *shuttle* G-3-P ainda é em parte desconhecida, no entanto existem evidências de que esse sistema tenha um papel fundamental sob taxas muito baixas ou até mesmo parada no crescimento, principalmente quando em condições de deprivação severa de nutrientes (Larsson *et al.*, 1998; Pahlman *et al.*, 2001).

De modo intrigante, durante a fase biotrófica o fungo *C. perniciosa* permanece em baixa densidade no apoplasto, apresentando taxas muito baixas de crescimento que só aumentam após o *switch* morfogenético para a fase saprofítica que se inicia concomitantemente com a morte do ramo infectado (Penman *et al.*, 2000). Além disso, recentemente têm crescido a hipótese de que condições nutricionais como, por exemplo, a falta de nitrogênio tenham um papel sinalizador na expressão de genes ligados a fitopatogenicidade (Donofrio *et al.*, 2006), reforçando a hipótese de que sob essas condições o *shuttle* G-3-P possa desempenhar um papel importante durante a fase

biotrófica. Em um estudo comparativo da expressão diferencial global de proteínas de *S. cerevisiae* sob condições de limitação de nutrientes, o componente do *shuttle* G-3-P GUT2 pôde ser evidenciado como uma das muitas proteínas significantemente mais expressas sob condições de limitação de carbono (Kolkman *et al.*, 2006).

Com base nas evidências acumuladas, acredita-se que a fase biotrófica em *C. perniciosa* esteja relacionada a um metabolismo de baixa energia, com base na utilização do glicerol como fonte de carbono e da respiração celular através de uma via alternativa à cadeia transportadora de elétrons principal. A cadeia transportadora de elétrons alternativa opera em *C. perniciosa* através de uma oxidase alternativa (AOX), cuja expressão é significantemente maior durante a fase biotrófica (Thomazella, 2010). Essa proteína é capaz de transferir elétrons diretamente da ubiquinona para o oxigênio, desviando o fluxo de elétrons dos complexos respiratórios III e IV (Figura 1), e sua atividade está correlacionada com a resposta preventiva ao estresse oxidativo (Maxwell *et al.*, 1999), fator comum às interações planta-patógeno (Lamb & Dixon, 1997). O seu funcionamento está diretamente ligado ao equilíbrio redox da célula e à baixa produção de ATP, visto que sua atividade não contribui para a geração do gradiente de prótons necessário para o funcionamento da ATP sintase (Velazquez *et al.*, 2001).

Existem evidências de que o *shuttle* G-3-P tenha um papel modulador da atividade da AOX em *A. thaliana* (Shen *et al.*, 2006), no entanto, a interação entre esses dois sistemas em fungos ainda não foi descrita. Além disso, no protozoário parasita animal *Trypanosoma brucei*, a única maneira de manter a respiração celular e o equilíbrio redox durante a forma parasítica (que habita a corrente sanguínea) é através do funcionamento do *shuttle* G-3-P diretamente acoplado ao funcionamento de uma oxidase alternativa (Guerra *et al.*, 2006). Embora o fungo modelo *S. cerevisiae* não tenha nenhum gene AOX homólogo identificado, a possibilidade de interação direta entre esses dois sistemas

conforme o previamente descrito em *A. thaliana* e *T. brucei* é possível também em *C. perniciosa*, representando uma hipótese plausível da importância do *shuttle* G-3-P no ciclo de vida patogênico do fungo.

Nesse contexto, a caracterização do metabolismo do glicerol, incluindo o papel do *shuttle* G-3-P envolvido, têm grande potencial de revelar aspectos novos da interação metabólica biotrófica planta-patógeno. Os mecanismos básicos de regulação do metabolismo do glicerol no modelo *S. cerevisiae* envolvem um controle essencialmente transcricional, o que valida a estratégia inicial de monitoraração através da análise da expressão dos genes-chave envolvidos. Além disso, a análise permitirá um melhor entendimento do panorama do metabolismo básico de carbono durante essa fase, fornecendo dados importantes para a elaboração e teste de novas hipóteses.

2.3 – Materiais e Métodos

Isolados de *M. perniciosa*, variedades de *T. cacao* e meios de cultura.

Foram utilizados dois isolados de *M. perniciosa* provenientes de Ilhéus, BA: o isolado CP02, cujo genoma foi seqüenciado e o isolado BP10, suceptível à transformação por *Agrobacterium tumefasciens* AGL2. *M. perniciosa* foi crescido em meio sintético (0,6% KNO3, 0,052% KCl, 0,052% MgSO4, 0,152% KH2PO4, traços de FeSO4 e ZnSO4) com adição da fonte de carbono desejada. Culturas em meio líquido foram mantidas em incubadoras a 27 °C e agitação a 250 rpm por um período de sete dias. Esporos foram obtidos conforme o protocolo desenvolvido pelo aluno Paulo José Teixeira como parte do seu projeto de Iniciação Científica FAPESP (2007/50262-0). Sementes provenientes de frutos meio-irmãos da variedade de cacau-comum Catongo foram plantadas em sacos plásticos para mudas (1 kg) contendo uma mistura de 50% de terra vegetal e 50% de

vermiculita e cultivadas em casa de vegetação sob fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (com suplementação do período de dia por iluminação artificial \approx 4.000 Lum./m²), regime de irrigação de cerca de 5 mm diários, umidade em torno de 60-80% e temperatura de 27-28°C durante o dia e 20-22°C durante a noite.

Infecção de plântulas de cacau e acompanhamento dos sintomas da Vassoura-debruxa

Para a padronização do acompanhamento dos sintomas 300 plântulas de cacau com cerca de 60 dias após a germinação (queda do cotilédone) tiveram o seu meristema apical podado logo abaixo do último lançamento para indução de lançamentos laterais. Cerca de 15 dias após a poda, um lançamento com um par de folhas entre 0,3 e 0,7 cm foi inoculado três vezes com 5 µL de uma solução contendo 10⁶ esporos em intervalos de 2 horas. Após o último inoculo as plantas foram envolvidas e mantidas por 24 horas em uma câmara plástica de alta umidade. Controles foram submetidos ao mesmo tratamento sem os esporos. Os sintomas foram acompanhados a cada 5 dias após a infecção, através de fotografia individual de cada planta e coleta do ramo infectado através de corte e rápido congelamento em Nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em biofreezer -85°C até a extração de RNA.

Manipulação de ácidos nucléicos

A extração de RNA de micélio de *M. perniciosa* cultivado *in vitro* seguiu o protocolo descrito para a extração de RNA de *Saccharomyces cerevisia* utilizando fenol ácido quente publicado em Sambrook e colaboradores, 2001. A extração de RNA de plantas foi realizada conforme o protocolo estabelecido para extração de RNA de cacau com tampão CTAB/β-mercaptoetanol (100mM Tris-HCl, pH 8.0; 30mM EDTA; 300mM LiCl; 2M NaCl; 2% CTAB; 2% PVP; 0,05% Espermidina e 10% β-mercaptoetanol) e precipitação com

Cloreto de Lítio. Amostras de RNA foram quantificadas em micro-espectrofotômetro (NanoVue, GE) e tiveram a sua integridade analisada em gel de agarose denaturante (5% Formaldeído) conforme Sambrook e colaboradores, 2001.

Caracterização da sequência completa dos genes de *M. perniciosa* envolvidos no metabolismo do glicerol e o desenho de oligos para real time PCR.

A busca por homólogos dos principais genes envolvidos no metabolismo do glicerol de *M. perniciosa* foi realizada através de tBLASTn utilizando-se com *query* proteínas relacionadas com seqüências depositadas no banco de dados NCBI. Os eventuais contigs identificados foram então analisados quanto à presença e estrutura dos genes utilizando três preditores gênicos: Augustus (Stanke and Morgenstern, 2005), Genome Threader (Gremme *et al.*, 2005) e Eukaryotic GeneMark.hmm (Lomsadze *et al.*, 2005). Os resultados obtidos foram comparados entre si e com o banco de dados NCBI e somente predições comuns aos três programas foram utilizadas para o desenho de oligos. O desenho de oligos para real time PCR foi realizado conforme o descrito por Nolan e colaboradores, 2006.

Oligonucleotídeos utilizados durante o estudo

Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) realizadas no projeto foram sintetizados em escala 10 nMol e de-salinizados (Prodimol - IDT), listados organizados funcionalmente na Tabela 1.

TABELA 1: Oligonucleotídeos utilizados no projeto

Utilização	Oligo	Sequência 5'–3'
qRT-PCR para avaliar a expressão de transportadores de Glicerol	MpAQPn1 FWD	CACATTTGCGGCTGACTACT
	MpAQPn1 REV	CTTGTCTGTCACTGCGAGGA
	MpAQPn2 FWD	CGCTGGTATCTCTGGTGCA
	MpAQPn2 REV	CGAAGCAGTATCCAGGTACT
	MpGUP1 FWD	AGCTGTTTGGAACGATGTCC
	MpGUP1 REV	TCTCTTCCTCCCGGTATTCG
qRT-PCR para avaliar a expressão de genes envolvidos no metabolismo básico do Glicerol	MpGLK1 FWD	CGAGATGAGAGAGTCAACAGC
	MpGLK1 REV	GACCTCGGCTAATGTCTCTG
	MpGPD1 FWD	TTGGGCTTGAATCCAAGGTC
	MpGPD1 REV	CGAGACCAAACCGTTGAATC
	MpGPD2 FWD	GTACGAGAACGCGAGATCC
	MpGPD2 REV	CAACGAGGTTGTCGGGAAG
	MpGPD3 FWD	TCACTTCCGGTGCTACACT
	MpGPD3 REV	GTTATTCTCAAAGCCGAGCC
	MpGPP1 FWD	CGACTGGAATCGTAACTTCG
	MpGPP1 REV	AACTACCAAGCATCTGTGCG
	MpGPP2 FWD	AAGCTGAACGGTTTGAGACC
	MpGPP2 REV	GGTTCCAGTTCTTCCATTGC
	MpGPP3 FWD	GGGGCGAAGACTTATGCAT
	MpGPP3 REV	CCCGCTTTCAGATGTTTGTC
	MpGPP4 FWD	ATCCTTCCTGGTGTCAAGC
	MpGPP4 REV	TCATGCAACCATAAGCATAAGT

qRT-PCR para avaliar a expressão de genes envolvidos na rota alternativa de assimilação e produção de Glicerol	MpGLD1 FWD	GCAACCAGACCTAGTCGAG
	MpGLD1 REV	CAATCTCTTTCACCACCGGA
	MpGLD2 FWD	AGCTCCACCCGTCATGCC
	MpGLD2 REV	GGGAGTTGTCAGAGCCAAGA
	MpGLD3 FWD	AAGGCATCCATCTTACTGCG
	MpGLD3 REV	CCAAATCTGACGCAACAGCA
	MpGLD4 FWD	GGAGAACATTCAGCTGCTCTC
	MpGLD4 REV	GAGAATGAAATCCACAAACGCT
	MpGLD5 FWD	CGAAACTCGCAAATGGTGAC
	MpGLD5 REV	TGAATGAGGTAGAGATCGACG
	MpGLD6 FWD	GCCTCAACGAAGCTGACCA
	MpGLD6 REV	AAGGTCGACGGGCCAAGG
	MpGLD7 FWD	GGCAACAATTTGAAGGACAAG
	MpGLD7 REV	CATGCAATGAGGACTTGAGC
qRT-PCR para avaliar a expressão de controles endógenos para normalização da expressão gênica	MpTEF1 FWD	AGAAGATTGACCGTCGTACC
	MpTEF1 REV	ACTCAACACACATGGGCTTG
	MpL10 FWD	ATCATCATTTCCAAGAAGTGGG
	MpL10 REV	GCACCATCCTGCAACACC
	MpACT1 FWD	CAGTGTCAAGGTGCGAATCG
	MpACT1 REV	TCGTGACCCAAAGGTTCTGG
	MpTUB2 FWD	TGTCAACCTGGTTCCTTTCC
	MpTUB2 REV	GACAGCACGGTACTGTTGG

TABELA 1: Oligonucleotídeos utilizados no projeto (continuação)

Quantificação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

A síntese de cDNA foi realizada utilizando ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega) seguindo as instruções do fabricante a partir de 2 ug de RNA total por amostra e com 0,5 ug de oligo dT (20 pb) e 5mM MgCl₂ em volume final de 20 uL. As reações de Real Time qPCR foram realizadas no sistema STEP ONE PLUS (Applied Biosystems), utilizando SYBR Green (2X SYBR Green PCR Master Mix - Applied Biosystems), 0,1 uL de cDNA e 200nM de oligonucleotídeos. Para a coleta de dados cada ponto experimental foi replicado cerca de nove vezes além da manutenção de controles de amplificação específica utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de culturas puras de M. perniciosa. As amplificações foram avaliadas quanto à especificidade através da inclusão de curvas de denaturação ao final de cada corrida e, guando necessário, avaliadas em gel de agarose 2%. Foram realizadas curvas-padrão para determinar a eficiência de amplificação de cada alvo e a determinação do melhor controle endógeno para as condições analisadas foi feita utilizando-se do software GeNORM (http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/). A análise estatística da expressão relativa nos pontos de coleta foi realizada utilizando-se o software REST2009 (http://www.genequantification.de/rest-2009.html) que utiliza um modelo de quantificação relativa baseado em correção pela eficiência de cada reação (Pfaffl at al., 2001).

2.4 – Resultados e Discussão

Moniliopthora perniciosa produz e acumula Glicerol em resposta a stress osmótico.

A principal estratégia utilizada por microrganismos para evitar a desidratação por stress osmótico é a produção intracelular de altas quantidades de um soluto compatível com o metabolismo e a homeostase celular (Martínez-Montañés *et al.,* 2010). Fungos de

maneira geral utilizam o aumento intracelular de poli álcoois, notavelmente Glicerol, em resposta a desidratação ou aumento da salinidade do meio (Hohmann, 2002). De modo a obter uma condição de stress osmótico condizente com uma reprogramação do metabolismo de *M. perniciosa* para a produção de glicerol visando a avaliação, obtenção e validação de marcadores de expressão para essa condição metabólica, o crescimento de *M. perniciosa* em meio Malte 1,7% suplementado com diversas concentrações de Cloreto de Sódio foi avaliado (Figura 2).



Figura 2: Tolerância de *M. perniciosa* a stress osmótico induzido por concentrações de 1 a 3M de Cloreto de Sódio em meio Malte 1,7%.

Ao contrário de *S. cerevisiae* e de *Aspergillus nidulans* que toleram até mais de 2M de NaCl, *M. perniciosa* têm seu crescimento reduzido em 50% do normal e é completamente inibido por concentrações maiores que 1M (Figura 2). A quantificação do conteúdo de Glicerol em extrato de micélio induzido com 1M NaCl aumenta rapidamente em relação ao controle, mostrando uma resposta clássica de defesa contra stress osmótico e que o meio Malte 1,7% suplementado com NaCl é uma condição adequada para se avaliar o metabolismo de produção de Glicerol (Figura 3).



Figura 3: Quantificação das concentrações de Glicerol em micélio crescido sob condições normais (1,7% Malte) e sob stress osmótico (1,7% Malte + 1M NaCl).

Os genes do metabolismo do Glicerol de *M. perniciosa* respondem diferencialmente entre as condições de utilização e biossíntese desse metabólito *in vitro*.

Visando a avaliação, obtenção e validação de marcadores de expressão capazes de diferenciar os estados metabólicos de produção e utilização de Glicerol, a expressão dos genes do metabolismo clássico do Glicerol (homólogos da via clássica de *S. cerevisiae*) foi avaliada em *M. perniciosa* crescido em meio Malte suplementado com 1M NaCI (condição de stress osmótico e produção de Glicerol) e meio completo substituindo 1,7% Malte por 2% Glicerol como fonte de Carbono (condição de utilização de Glicerol) (Figura 4).



Figura 4: Análise da expressão dos genes do metabolismo clássico do Glicerol sob condição de produção (1M NaCl) e consumo (2% Glicerol como fonte de carbono) por PCR quantitativo em tempo real.

A expressão dos genes do metabolismo básico do Glicerol se comportou conforme o esperado baseado nos estudos anteriores em *S. cerevisiae* (Martínez-Montañés *et al.,* 2010). Durante a utilização de Glicerol como fonte de carbono, os transportadores MpAQPn1, MpGUP1 e MpSTL1 encontram-se mais expressos em relação à condição de produção de Glicerol. De modo semelhante MpGLK1, a Glicerol Kinase que realiza o primeiro passo de incorporação do Glicerol na via clássica encontra-se significantemente mais expressa (Figura 4). No sentido metabólico de síntese de Glicerol em resposta a stress osmótico, os genes que codificam as Glicerol 3-fosfatases MpGPP1 e MpGPP2, responsáveis pela de-fosforilação do Glicerol 3-fosfato à Glicerol mostraram-se bons marcadores diferencialmente expressos (Figura 4). De modo semelhante, a expressão das duas principais dehidrogenases citoplasmáticas NAD-dependentes, MpGPD1, MpGPD2 mostrou-se induzida durante a produção de Glicerol de modo semelhante ao descrito em *S. cerevisiae* (Martínez-Montañés *et al.,* 2010). De maneira condizente com uma função de adaptação ao stress através da manutenção do equilíbrio de oxidoredução do citoplasma, a expressão do gene da Glicerol 3-fosfato dehidrogenase mitocondrial FAD-dependente, MpGPD3, mostrou-se maior na condição de produção de Glicerol e stress osmótico (Figura 4).

A assimilação de Glicerol por *M. perniciosa* é realizada por uma via alternativa à de leveduras, característica de fungos filamentosos.

Além dos genes do metabolismo clássico do Glicerol, fungos filamentosos possuem rotas alternativas de assimilação de glicerol baseadas em aldo-ceto redutases NAD ou NADP dependentes (de Vries *et al.*, 2003). A presença dessa rota alternativa em *S. cerevisiae* também é possível através dos genes GCY (Glicerol dehidrogenase NAD-dependente) cuja enzima codificada pode converter o Glicerol diretamente à Dihidroxiacetona (DHA) que, por sua vez, é fosforilada pela Dihidroxiacetona kinase (DHAK), gerando Dihidroxiacetona fosfato (DHAP), um intermediário da via glicolítica e também um metabólito envolvido no *shuttle* de G3P (Nguyen and Nevoigt, 2009). Apesar de funcional e biologicamente significante em fungos filamentosos (Liepins *et al.*, 2006), essa via não parece exercer um papel importante em *S. cerevisiae* dada a importância da via clássica nesse organismo e a dificuldade de se obter um fenótipo no mutante nulo Δgcy (Yu *et al.*, 2010).

Uma busca no genoma de *M. perniciosa* utilizando a sequencia de Amino ácidos de duas Glicerol dehidrogenases (GLD1 e GLD2) de *Trichoderma reesei* revelou sete

possíveis homólogos, MpGLD1 a 7 e uma Manitol fosfato dehidrogenase, MpMPD (Tabela 2). Além disso, encontramos dois homólogos aos genes DAK1 e 2 (Dihidroxiacetona kinase) de *S. cerevisiae*, necessários para completar a via alternativa de produção e utilização de Glicerol em fungos filamentosos (Figura 5).

A análise da expressão dos genes possivelmente envolvidos na via alternativa de assimilação e produção de Glicerol nas mesmas condições testadas para a via clássica mostrou um padrão semelhante ao esperado em caso de uma via alternativa funcional caracterizada em outros fungos filamentosos (Figura 6).



Figura 6: Análise da expressão dos genes do metabolismo alternativo do Glicerol sob condição de produção (1M NaCl) e consumo (2% Glicerol como fonte de carbono) por PCR quantitativo em tempo real.

É possível distinguir duas Glicerol dehidrogenases que atuam como boas marcadoras de expressão durante a utilização de Glicerol como fonte de Carbono,

MpGLD1 e MpGLD2 (Figura 5). MpGLD3 a 7 mantém um nível basal de expressão tanto na condição de produção (1M NaCl) quanto na condição de utilização de Glicerol (2% Glicerol) e, portanto, não são boas marcadoras de expressão para a avaliação desse metabolismo durante a interação com cacau. MpDAK1 e MpDAK2 mostraram uma indução significativa durante a produção de Glicerol *in vitro* (Figura 6), de modo condizente com o papel da enzima codificada por esses genes na rota alternativa de produção de Glicerol a partir de Dihidroxiacetona (Figura 5) e, portanto, mostraram-se bons marcadores de expressão desse processo.

O padrão de expressão dos genes do metabolismo do glicerol de *M. perniciosa* sugere a utilização desse metabólito como fonte de carbono durante o desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa em cacau.

O conhecimento do padrão diferenciado da regulação dos genes do metabolismo de produção e consumo do Glicerol de *M. perniciosa* em culturas axênicas *in vitro* é um ponto de partida essencial para se avaliar a programação desse metabolismo durante a interação patogênica em plântulas de cacau e, portanto, responder se o Glicerol é potencialmente uma fonte de Carbono importante durante a Vassoura-de-bruxa. Para tanto, plântulas de cacau infectadas foram coletadas e tiveram o RNA total extraído para utilização na síntese de cDNA e avaliação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real com oligonucleotídeos específicos para os genes da via clássica (Figura 7) e da via alternativa (Figura 8).



Figura 7: Expressão relativa dos genes da via clássica do metabolismo do Glicerol durante a Vassoura-de-bruxa em diversos estágios da interação coletados em <u>Dias Após Infecção (DAI)</u>. Até 40 DAI – Vassoura-verde. Em torno de 60 DAI aparecem os primeiros sinais de necrose distal dos ramos infectados. Em 100 DAI ocorrem somente Vassouras-secas com necrose total do tecido infectado.



Figura 8: Expressão relativa dos genes da via alternativa do metabolismo do Glicerol durante a Vassoura-de-bruxa em diversos estágios da interação coletados em <u>Dias Após Infecção (DAI)</u>. Até 40 DAI – Vassoura-verde. Em torno de 60 DAI aparecem os primeiros sinais de necrose distal dos ramos infectados. Em 100 DAI ocorrem somente Vassouras-secas com necrose total do tecido infectado.

A indução dos marcadores de expressão, MpAQPn1, MpGUP1, MpSTL1, MpGLD1 e MpGLD2 no início da fase biotrófica sugerem a utilização do Glicerol como fonte de carbono durante os primeiros 20 dias de interação (Figura 7 e 8). Ao contrário do evidenciado *in vitro*, a indução dos transportadores MpGUP1 e MpSTL1 não se mostrou tão acentuada, e apresentou dois pequenos picos de indução, um no início da interação e outro ao final (Figura 7). MpGLD1 e MpGLD2 responderam de modo mais semelhante ao padrão de indução característico do metabolismo de assimilação do Glicerol *in vitro* (Figura 8), reforçando a hipótese da ocorrência desse metabolismo também *in vivo*. De modo interessante, MpMPD parece ter um papel progressivamente importante no final da interação, durante as fases de necrose e Vassoura-seca. A importância do metabolismo Manitol em fungos fitopatógeno é um assunto amplamente debatido na literatura especializada (revisado em Solomon *et al.*, 2007), e pode estar relacionado nesse caso ao armazenamento de carbono para a formação do basidiocarpo e esporulação que ocorrem ao final da interação.

Metabolismo do Glicerol durante a interação com cacau parece ser importante para a adaptação a stress.

Durante a fase biotrófica, o gene do metabolismo do Glicerol com a maior indução é MpGPD3, a Glicerol 3-fosfato dehidrogenase componente mitocondrial do *shuttle* de G-3-P. A expressão de MpGPD3 começa induzida desde o início da interação, atingindo um pico em torno de 30 DAI e diminuindo progressivamente com a transição da Vassouraverde para a Vassoura-seca (Figura 7). Esse padrão coincide com o esperado no caso de uma participação do *shuttle* mitocondrial de G-3-P na manutenção do equilíbrio de óxido redução do citoplasma e adaptação a stress (Maxwell *et al.*, 1999). Uma melhor caracterização das condições fisiológicas encontradas no apoplasto durante a fase biotrófica deve fornecer pistas importantes sobre o pael biológico desse mecanismo em *M. perniciosa*. Além disso, a obtenção de mutantes deficientes para o *shuttle* de G-3-P é uma estratégia válida e essencial para a caracterização funcional desse componente no metabolismo Glicerol.

2.5 – Referências Bibliográficas

Ansell R, Granath K, Hohmann S, Thevelein JM and Adler L. 1997. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. EMBO J. 16:2179-2187.

Christiansen K. 1978. Triacylglycerol synthesis in lipid particles from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Biochim. Biophys. Acta 530(1):78-90.

de Vries RP, Flitter SJ, van de Vondervoort PJ, Chaveroche MK, Fontaine T, Fillinger S, Ruijter GJ, d'Enfert C, Visser J. 2003. Glycerol dehydrogenase, encoded by gldB is essential for osmotolerance in Aspergillus nidulans. Mol Microbiol. 2003 Jul;49(1):131-41.

Donofrio NM, Oh Y, Lundy R, Pan H, Brown DE, Jeong JS, *et al.* 2006. Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Fungal Genet Biol. May 25th, [e-pub. ahead of print].

Durrant WE and Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. Ann. Rev. Phytopathol. 42:185-209.

Gerber DW, Byerrum RU, Gee R and Tolbert N. 1988. Glycerol concentrations in crop plants. Plant Sci. 56(1):31–38.

Guerra DG, Decottignies A, Bakker BM and Michels PA. 2006. The mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae and the glycosomal redox balance of insect stages of Trypanosoma brucei and Leishmania spp. Mol. Biochem. Parasitol. Jun 5th, [e-pub. ahead of print].

Hahn M. and Mendgen K. 2001. Signal exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. Plant Biol. 4(4):322-327.

Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. Microbiol Mol Biol Rev. 2002 Jun;66(2):300-72.

Holsbeeks L, Lagatie O, Van Nuland A, Van de Velde S and Thevelein JM. 2004. The eukaryotic plasma membrane as a nutrient-sensing device. Trends Biochem. Sci. 29(10):556-564.

Kachroo P, Venugopal SC, Navarre DA, Lapchyk L and Kachroo A. Role of salicylic acid and fatty acid desaturation pathways in ssi2-mediated signaling. Plant Physiol. 139(4):1717-1735.

Kang L, Li JX, Zhao TH, Xiao FM, Tang XY, Thilmony R *et al.* 2003. Interplay of the *Arabidopsis* nonhost resistance gene *NHO1* with bacterial virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(6):3519-3524.

Kolkman A, Daran-Lapujade P, Fullaondo A, Olsthoorn MM, Pronk JT, Slijper M, *et al.* 2006. Proteome analysis of yeast response to various nutrient limitations. Mol. Syst. Biol. May 16th [e-pub. Ahead of print].

Lamb C and Dixon RA. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Ann. Ver. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:251-275.

Larsson C, Påhlman IL, Ansell R, Rigoulet M, Adler A and Gustafsson L. 1998. The importance of the glycerol-3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14(4):347-357.

Liepins J, Kuorelahti S, Penttilä M, Richard P. 2006. Enzymes for the NADPH-dependent reduction of dihydroxyacetone and D-glyceraldehyde and L-glyceraldehyde in the mould Hypocrea jecorina. FEBS J. Sep;273(18):4229-35.

Lu L, Roberts GG, Oszust C and Hudson AP. 2005. The YJR127C/ZMS1 gene product is involved in glycerol-based respiratory growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 48(4):235-46.

Luyten K, Albertyn J, Skibbe WF, Prior BA, Ramos J, Thevelein JM, *et al.* 1995. *Fps1*, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. EMBO J. 14(7):1360-1371.

Martínez-Montañés F, Pascual-Ahuir A, Proft M. 2010. Toward a genomic view of the gene expression program regulated by osmostress in yeast. OMICS. 14(6):619-27.

Maxwell DP, Wang Y and McIntosh L. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(14):8271–8276.

Meinhardt LW, Bellato CM, Rincones J, Azevedo RA, Cascardo JC and Pereira GA. 2006. In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. Curr. Microbiol. 52(3):191-196.

Miquel M, Cassagne C and Browse J. 1998. A new class of *Arabidopsis* mutants with reduced hexadecatrienoic acid fatty acid levels. Plant Physiol. 117(3):923–930.

Nandi A, Welti R and Shah J. 2004. The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene *suppressor of fatty acid desaturase deficiency1* is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. Plant Cell 16(2):465–477.

Nevoigt E and Stahl U. 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 21(3):231-241.

Nguyen HT, Nevoigt E. 2009. Engineering of Saccharomyces cerevisiae for the production of dihydroxyacetone (DHA) from sugars: a proof of concept. Metab Eng. 2009 Nov;11(6):335-46.

Påhlman AC, Granath K, Ansell R, Hohmann S and Adler L. 2001. The yeast glycerol-3-phosphatases *Gpp1p* and *Gpp2p* are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic and oxidative stress. J. Biol. Chem. 276(5):3555-3563.

Pego JV and Smeekens SC. 2000. Plant fructokinases: a sweet family get-together. Plant Sci. 5(12):531-536.

Penman D, Britton G, Hardwick K, Collin HA and Isaac S. 2000. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. Mycol. Res. 104(6):671-675.

Rigoulet M, Aguilaniu H, Averet N, Bunoust O, Camougrand N, Grandier-Vazeille X *et al.* 2004. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cell. Biochem. 256 (1-2):73.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. 2001.

Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella AW, Schiavinato MA, Cascardo JC *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(413):865-877.

Scarpari LM. Caracterização bioquímica e molecular da doença Vassoura-de-bruxa do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) causada pelo fungo *Crinipellis perniciosa* [Dissertação]. UNICAMP, Tese do Instituto de Biologia (Doutorado em Genética e Biologia Molecular), 113 pág., 2006.

Shen W, Wei Y, Dauk M, Tan Y, Taylor DC, Selvaraj G. *et al.* 2006. Involvement of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase in modulating the NADH/NAD⁺ ratio provides evidence of a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in *Arabidopsis*. Plant Cell. 18(2):422-441.

Solomon PS, Tan KC and Oliver RP. 2003. The nutrient supply of pathogenic fungi: a fertile field for study. Mol. Plant Pathol. 4(3)203–210.

Solomon PS, Waters OD, Oliver RP. 2007. Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. Trends Microbiol. Jun;15(6):257-62.

Van Dijken JP and Scheffers WA. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. FEMS Microbiol. Rev. 32:199-224.

Velazquez I and Pardo JP. 2001. Kinetic characterization of the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. 389(1):7-14.

Wei Y, Shen W, Dauk M, Wang F, Selvaraj G and Zou J. 2004. Targeted gene disruption of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Colletotrichum gloeosporioides* reveals evidence that

glycerol is a significant transferred nutrient from host plant to fungal pathogen. J. Biol. Chem. 276(1):429-435.

Yu KO, Kim SW, Han SO. 2010. Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by Saccharomyces cerevisiae. Bioresour Technol. 101(11):4157-61.

Capítulo 3

Caracterização das alterações nas concentrações de poli álcoois e fontes de carbono no apoplasto de cacau infectado por *Moniliopthora perniciosa*.

Joan G. Barau, Gleidson S. Teixeira, Carolina S. do Rio, Johana Rincones e Gonçalo A. G. Pereira

3.1 – Resumo

Durante a fase biotrófica da Vassoura-de-bruxa, a chamada Vassoura-verde, o apoplasto de cacau é colonizado pelas hifas de *M. perniciosa* que apresentam um padrão de crescimento semelhante ao de fungos filamentosos endofíticos. Com foco no metabolismo de carbono e de modo a obter uma visão detalhada das alterações bioquímicas que ocorrem neste espaço durante a Vassoura-de-bruxa, a extração de apoplasto de cacau foi padronizada e medições das concentrações de açúcares solúveis e poli álcoois foram realizadas ao longo de toda a interação. A parte um aumento transiente das concentrações de Eritritol e Inositol, ocorre uma queda constante das concentrações de carboidratos nos primeiros 20 dias após a infecção, permanecendo estáveis em baixos níveis daí até o final da interação (morte da planta). Mostramos que o inicio da condição de baixos níveis estáveis de carbono coincide com a maturação da Vassoura-verde e da formação do calo de células desdiferenciadas na base do ramo infectado. Mostramos também que a diferenciação dessa estrutura corta a comunicação vascular entre as partes sadias da planta e o ramo infectado, e os aspectos fisiológicos da evolução dessa característica na interação de cacau com *M. perniciosa* foi discutida. Com base nos dados da flutuação dos níveis de fontes de carbono no apoplasto das plantas infectadas, na taxa de crescimento do fungo e dos níveis de expressão da proteína de necrose MpNEP2, foi proposto um modelo hipotético onde o stress nutricional por falta de carbono tem um papel importante na mudança no desenvolvimento da patogenicidade em cacau.

3.2 – Introdução

A Vassoura-de-bruxa em cacau, causada pelo fungo *Moniliopthora perniciosa*, representa um modelo fitopatológico com características únicas devido à natureza biológica incomum tanto do hospedeiro e do fungo fitopatógeno quanto às alterações morfológicas e bioquímicas resultantes da interação fitopatogênica. Talvez um dos aspectos mais peculiares do modelo da Vassoura-de-bruxa seja a longa fase biotrófica de interação. Embora o acompanhamento dos sintomas em longo prazo seja difícil na natureza, nossas observações sugerem que o desenvolvimento da Vassoura-verde leva em torno de 60 a 90 dias no campo, estimativa que está razoavelmente de acordo com o observado em plântulas onde a Vassoura-verde se estende até cerca de 50 a 60 dias após a infecção.

Durante esse período o fungo cresce nos espaços intercelulares da planta (Evans, 1980; Silva & Matsuoka, 1999, Orchard *et al.*, 1994), de modo semelhante ao observado em fungos endofíticos. De modo interessante, recentemente foram encontradas e caracterizadas linhagens de *M. perniciosa* não patogênicas em cacau, capazes de crescer como endófitos verdadeiros sem causar nenhum dos sintomas da Vassoura-de-bruxa (Lana *et al.*, 2011). Avaliações preliminares de possíveis alterações genéticas entre linhagens endofíticas e patogênicas de *M. perniciosa* não foram conclusivas e, ao menos à luz do marcador molecular utilizado, elas são indistinguíveis entre si (Lana *et al.*, 2011). Uma revisão de um modelo com comportamento semelhante de equilíbrio fino entre mutualismo endofítico ou patogenicidade entre o fungo filamentoso *Epichloë festucae* e a gramínea *Lolium perene* sugere que o desequilíbrio no sentido da patogenicidade está relacionado a pontos regulatórios-chave de sinalização sob stress e de controle da proliferação celular (Eaton *et al.*, 2008, 2010 and 2011).

Um dos aspectos identificados relacionados a regulação do crescimento, patogenicidade e a mudança entre as fases monocariótica (predominante no micélio biotrófico) e dicariótica (predominante no micélio necrotrófico) é o papel das fontes de carbono (Meinhardt *et al.*, 2006; Rincones *et al.*, 2008). Recentemente mostramos através da expressão gênica que além de apresentar um papel na manutenção da fase biotrófica *in vitro*, o Glicerol parece ser uma fonte de carbono utilizada por *M. perniciosa* durante o início da infecção (Capítulo 2). No entanto, o perfil de expressão dos genes do metabolismo do Glicerol nas fases mais avançadas da Vassoura-verde não condiz com o perfil bioquímico de acúmulo de Glicerol encontrado por Scarpari e colaboradores, 2005. É possível que essa diferença esteja relacionada ao fato de que no trabalho mostrando o acúmulo progressivo de Glicerol em Vassouras-verdes as medições foram feitas baseadas no tecido infectado total e correlacionadas com a peroxidação de glicerolipídeos, ignorando o microambiente ocupado pelo fungo, o apoplasto, durante essa fase da interação (Scarpari *et al.*, 2005).

O apoplasto é um espaço fisiológico vegetal que compreende a matriz extracelular das plantas incluindo a parede celular, e está relacionado não só ao armazenamento e transporte de longa distância de água, sais minerais e biomoléculas através do xilema como também a manutenção da homeostase vegetal abrigando enzimas que participam de diversas reações bioquímicas essenciais às plantas (Sattelmacher e Horst, 2007). Em termos de composição, o fluido apoplástico comumente possui concentrações variáveis de diversos metabólitos incluindo açúcares, poli álcoois, ácidos orgânicos e aminoácidos. Como participa da homeostase vegetal, o apoplasto também sofre alterações bioquímicas durante a interação de plantas com patógenos (Joosten *et al.*, 1990; Beissman *et al.*, 1992; Tetlow e Farrar, 1993; Aked e Hall, 1993) e, portanto, a importância desse

compartimento durante a longa fase biotrófica da Vassoura-de-bruxa não pode ser ignorada.

Atualmente existem duas metodologias mais utilizadas para a extração de apoplasto em plantas: a infiltração/centrifugação e variantes (Lohaus *et al.*, 2001) e a extração por pressão em bomba de Scholander (Hartung *et al.*, 1988). Embora o método de infiltração e centrifugação seja mais simples, a extração com bomba de Scholander é melhor para a quantificação de metabólitos, pois não dilui as amostras na solução infiltrante. Pirovani e colaboradores, 2008 demonstraram a aplicabilidade da técnica de infiltração e centrifugação para a coleta de fluido apoplástico de cacau, no entanto, a técnica é restrita a coleta de apoplasto de folhas jovens já que folhas maduras apresentam uma camada de cera que impede a infiltração e a retirada do apoplasto.

Com base na importância do metabolismo de carbono e do Glicerol no ciclo de vida de *M. perniciosa* e na longa fase biotrófica de crescimento restrito ao apoplasto de cacau, uma avaliação qualitativa e quantitativa das alterações metabólicas envolvendo carboidratos e poli álcoois do apoplasto de cacau durante a Vassoura-verde faz-se necessária. A caracterização refinada das fontes de carbono presentes no apoplasto e a sua comparação com os dados prévios de expressão gênica e das alterações bioquímicas no extrato total de tecidos infectados deve fornecer pistas essenciais para uma melhor compreensão do processo de desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa em cacau e dos estímulos fisiológicos aos quais *M. perniciosa* está exposto durante a excepcionalmente longa fase biotrófica de interação com o cacaueiro.

4.3 – Materiais e Métodos

Isolados de *M. perniciosa*, variedades de *T. cacao* e meios de cultura.

Foi utilizado o isolado CP02 de *M. perniciosa* proveniente de Ilhéus - BA, cujo genoma foi seqüenciado. *M. perniciosa* foi crescido em meio sintético (0,6% KNO3, 0,052% KCl, 0,052% MgSO4, 0,152% KH2PO4, traços de FeSO4 e ZnSO4) com adição da fonte de carbono desejada ou meio Malte 1,7% líquido (sem ágar) ou sólido (17g/L extrato de malte, 5g/L extrato de levedura e 15g/L ágar). Culturas em meio líquido foram mantidas em incubadoras a 28°C e agitação a 250 rpm por um período de sete dias. Esporos foram obtidos conforme o protocolo desenvolvido pelo aluno Paulo José Teixeira como parte do seu projeto de Iniciação Científica FAPESP (2007/50262-0). Sementes provenientes de frutos meio-irmãos da variedade de cacau-comum Catongo foram plantadas em sacos plásticos para mudas (1 kg) contendo uma mistura de 50% de terra vegetal e 50% de vermiculita e cultivadas em casa de vegetação sob fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (com suplementação do período de dia por iluminação artificial ≈ 4.000 Lum./m²), regime de irrigação de cerca de 5 mm diários, umidade em torno de 60-80% e temperatura de 27-28°C durante o dia e 20-22°C durante a noite.

Infecção de plântulas de cacau e acompanhamento dos sintomas da Vassoura-debruxa

Para a padronização do acompanhamento dos sintomas 300 plântulas de cacau com cerca de 60 dias após a germinação (queda do cotilédone) tiveram o seu meristema apical podado logo abaixo do último lançamento para indução de lançamentos laterais. Cerca de 15 dias após a poda, um lançamento com um par de folhas entre 0,3 e 0,7 cm foi inoculado três vezes com 5 µL de uma solução contendo 10⁶ esporos em intervalos de 2 horas. Após o último inoculo as plantas foram envolvidas e mantidas por 24 horas em
uma câmara plástica de alta umidade. Controles foram submetidos ao mesmo tratamento sem os esporos. Os sintomas foram acompanhados a cada 5 dias após a infecção, através de fotografia individual de cada planta e coleta do ramo infectado através de corte, coleta de apoplasto e rápido congelamento em Nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em biofreezer -85°C até a extração de RNA ou análise do apoplasto.

Extração e validação do fluido apoplástico de cacau, quantificação de metabólitos e infiltração de plantas de cacau com soluções experimentais

A extração de apoplasto de cacau foi realizada utilizando-se uma bomba de Scholander portátil (PMS 1000 - PMS Instruments Co., Oregon - USA), o ramo mantido inteiro com sua base excisada lavada cuidadosamente com água destilada foi posicionado invertido dentro da câmara de pressão de acordo com as instruções do fabricante. Para a extração e coleta do fluido, aplicou-se uma pressão positiva de cerca de 5-10 BAR através da injeção de gás nitrogênio na câmara. O fluido gotejante resultante foi coletado com auxílio de micropipetas e armazenado à –20°C.

Visando a validação da obtenção de fluido exclusivamente extracelular (apoplasto), testes enzimáticos envolvendo dois marcadores citoplasmáticos foram realizados no fluido extraído através das duas estratégias. O extrato total de folhas cru e fervido por 15 minutos foram utilizados respectivamente como controle positivo e negativo de contaminação citoplasmática. Os testes utilizaram as enzimas PEP Carboxilase (EC 4.1.1.31) e NAD-Malato Dehidrogenase (EC 1.1.1.37) nas condições conforme o descrito em Winter e colaboradores, 1982. O extrato total foi obtido a partir de 3 g de material vegetal fresco macerado em tampão de extração (10mM Tris-HCl pH 8.0; 10mM EDTA pH 8.0; 0,6% PVP; 3mM MgCl₂; 1mM PMSF) e centrifugado por 3 vezes (15 minutos à 12000

73

rpm e 4°C), transferindo-se a fase solúvel superior para tubos novos após cada centrifugação.

Experimentos foram realizados utilizando-se o setup enzimático completo para Fosfoenolpiruvato Carboxilase (PEPC) em 980 uL [50mM Hepes-KOH, pH 8.0; 2mM KHCO₃; 5mM MgCl₂; 3u NAD-Malato Dehidrogenase (Sigma); 0.08mM NADH; 20 uL amostra (controle negativos - água e extrato fervido por 15 minutos; experimental 1 fluído extraído por infiltração/centrifugação; experimental 2 – fluido extraído com bomba de Scholander; controle positivo – extrato total de cacau) e 2mM Fosfoenolpiruvato (Sigma)] e NAD-Malato Dehidrogenase (NAD-MDH) em 980 uL [50mM Hepes-KOH, pH 8.0; 0.08mM NADH; 20 uL amostra e 1mM Oxaloacetato (Sigma). Cada experimento foi realizado em triplicata e as mudanças na absorbância (340 nm) foram acompanhadas em espectrofotômetro (Ultrospec 2000 – Pharmacia Biotech) e registradas por 30 minutos.

Análises preliminares do perfil de aminoácidos e de íons nas amostras foram realizadas como forma de validação adicional da natureza do fluido extraído. A distribuição individual dos aminoácidos presentes no fluido coletado e no extrato total de cacau foi determinada por HPLC através do método OPA-borato (Jarret *et al.*, 1986). O perfil iônico do fluido coletado e do extrato total de cacau foi analisado através da técnica de eletroforese capilar em aparelho analítico não comercial do laboratório de Instrumentação e Automação em Química Analítica da UNICAMP.

A determinação do perfil relativo de açúcares foi realizada em equipamento de cromatografia iônica modular Metrohm (<u>http://www.metrohm.com/</u>) composto de bomba isocrática, módulo de injeção e módulo de detecção por amperometria pulsada em célula com eletrodo de ouro (Bioscan Metrohm). A separação foi realizada com uma coluna MetroSep CARB1 (Metrohm) em 200 mM NaOH como eluente. Para as determinações,

74

apoplasto puro foi diluído 20 vezes em água milliQ e 20 uL foram injetados por corrida. As identidades de cada pico foram confirmadas através da injeção de padrões de alta pureza adquiridos (SIGMA). As identificações de picos desconhecidos foram realizadas experimentalmente baseadas nas propriedades polares de cada possível soluto teste considerando o tempo de retenção apresentado pelo pico desconhecido, e baseadas também em dados semelhantes publicados na literatura técnica disponível no site do fabricante da coluna. A quantificação foi realizada através da análise de curvas padrão contendo 6 pontos de diluição em triplicata com concentrações mínima e máxima variando em torno das intensidades de sinal obtidas no apoplasto de cacau.

Experimentos de infiltração de plantas de cacau sadias e infectadas com soluções aquosas experimentais contendo o marcador de cor Xileno Ciano (Sigma) ou soluções de carboidratos solúveis foram realizadas conforme o descrito por Lin e colaboradores, 2011 e acompanhadas visualmente ou por medida da absorbância do Xileno Ciano a 620nm em espectrofotômetro.

Manipulação de ácidos nucléicos

A extração de RNA de micélio de *M. perniciosa* cultivado *in vitro* seguiu o protocolo descrito para a extração de RNA de *Saccharomyces cerevisia* utilizando fenol ácido quente publicado em Sambrook e colaboradores, 2001. A extração de RNA de plantas foi realizada conforme o protocolo estabelecido para extração de RNA de cacau com tampão CTAB/β-mercaptoetanol (100mM Tris-HCI, pH 8.0; 30mM EDTA; 300mM LiCI; 2M NaCI; 2% CTAB; 2% PVP; 0,05% Espermidina e 10% β-mercaptoetanol) e precipitação com Cloreto de Lítio. Amostras de RNA foram quantificadas em micro-espectrofotômetro (NanoVue, GE) e tiveram a sua integridade analisada em gel de agarose denaturante (5% Formaldeído) conforme Sambrook e colaboradores, 2001.

Utilização	Oligo	Sequência 5'–3'
PCR quantitativo em tempo real MpNEP2	MpNEP2 FWD	AAGGCAAGACTGCTCTGGTCTA
	MpNEP2 REV	CTTCCTTTCCATCGTCCTTCTCGT
PCR quantitativo em tempo real MpTUB2	MpTUB2 FWD	TGTCAACCTGGTTCCTTTCC
	MpTUB2 REV	GACAGCACGGTACTGTTGG

Tabela 1: Lista de oligonucleotídeos

Quantificação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

A síntese de cDNA foi realizada utilizando ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega) seguindo as instruções do fabricante a partir de 2 ug de RNA total por amostra e com 0,5 ug de oligo dT (20 pb) e 5mM MgCl₂ em volume final de 20 uL. As reações de Real Time gPCR foram realizadas no sistema STEP ONE PLUS (Applied Biosystems), utilizando SYBR Green (2X SYBR Green PCR Master Mix - Applied Biosystems), 0,1 uL de cDNA e 200nM de oligonucleotídeos. Para a coleta de dados cada ponto experimental foi replicado cerca de nove vezes além da manutenção de controles de amplificação específica utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de culturas puras de M. perniciosa. As amplificações foram avaliadas quanto à especificidade através da inclusão de curvas de denaturação ao final de cada corrida e, guando necessário, avaliadas em gel de agarose 2%. Foram realizadas curvas-padrão para determinar a eficiência de amplificação de cada alvo e a determinação do melhor controle endógeno para as condições analisadas foi feita utilizando-se do software GeNORM (http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/). A análise estatística da expressão relativa nos pontos de coleta foi realizada utilizando-se o software REST2009 (http://www.genequantification.de/rest-2009.html) que utiliza um modelo de quantificação relativa baseado em correção pela eficiência de cada reação (Pfaffl *at al.*, 2001).

4.4 – Resultados e Discussão

M. perniciosa quebra o ciclo fisiológico do carbono no apoplasto de tecidos infectados de cacau

Com a análise do perfil de fontes de carbono no apoplasto, pudemos evidenciar um padrão oscilatório rítmico das concentrações ao longo do tempo nas plântulas sadias de cacau (Figura 1). Os picos de concentração das fontes de carbono Inositol, Eritritol, Glicerol, Manitol, Sorbitol e Sacarose (Figura 1, A-E) coincidem com os momentos de lançamento de novas folhas (tipicamente 3 ou 4 por lançamento em 0 DAI, 30 e 35 DAI e em torno de 60 DAI), e diminuem conforme a expansão e maturação dos novos tecidos, em um padrão na forma da letra "W". De modo inverso, as concentrações de Glicose e Frutose têm seu pico com a maturação das novas folhas e diminuindo de concentração no momento de ocorrência dos novos lançamentos foliares (Figura 1, F), em um padrão na forma da letra "M".

A ocorrência dos padrões W e M podem ser explicadas com base no ritmo de crescimento das plantas sadias. Durante o lançamento e imediatamente após (picos do padrão W), a maior riqueza de fontes de carbono proveniente dos tecidos "fonte" fotossintetizantes viabiliza o rápido crescimento e expansão de novas folhas ou tecidos "dreno". Essa rápida expansão e desenvolvimento consome as fontes de carbono até o momento da transição das folhas expandidas para tecido do tipo "fonte" (vales do padrão W) quando as novas folhas passam a realiza fotossíntese, acumulando Glicose e Frutose (picos do padrão M).



Figura 1: Variação das concentrações (mM) de poli álcoois e açúcares solúveis no apoplasto de cacau durante o desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa (em DAI, <u>D</u>ias <u>A</u>pós a <u>I</u>nfecção) medidas através de cromatografia iônica. Variação das concentrações de Inositol (A), Eritritol (B), Glicerol (C), Sorbitol e Manitol (D), Sacarose (E) e Glicose e Frutose (F).

M. perniciosa evoluiu de forma a infectar e proliferar nos tecidos do tipo "dreno". Essa estratégia confere duas grandes vantagens ao patógeno, pois ao infectar esse tipo de tecido além de uma maior disponibilidade de fontes de carbono existe espaço para acompanhar o rápido crescimento da planta, permitindo a colonização rápida do ramo em expansão. De um modo geral, a quantificação dos carboidratos e poli álcoois no apoplasto de cacau infectado mostrou uma forte desregulação do ciclo natural que ocorre em plantas sadias. Inositol e Eritritol (Figura 1 A e B) aumentam de concentração de modo transiente no início da infecção para cair acentuadamente a partir de 15 DAI.

Inositol (ou Mio Inositol) é um poli álcool cíclico de 6 carbonos e é importante no crescimento e desenvolvimento normal de plantas, exercendo papéis múltiplos como participação na via de sinalização do Fosfatidil Inositol, síntese de ácido fítico, da parede celular, transporte e acúmulo de auxina e produção de moléculas relacionadas a stress (Loewus e Murthy, 2000; Loweus, 1990). Eritritol, também um poli álcool, apesar de comum como metabólito em plantas, têm sua participação no metabolismo vegetal pouco elucidada. Kuroda e colaboradores, 2008 sugerem que eritritol é capaz de promover o crescimento acelerado em plantas e fungos, e Hartog e colaboradores, 2010 sugerem uma capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio. O aumento transiente de ambos poli álcoois pode estar relacionado respectivamente ao desbalanço hormonal causado pela provável produção de auxina por *M. perniciosa* (Kilaru *et al.*, 2007) e a uma indução de uma maior taxa de crescimento inicial dos lançamentos infectados (Figura 2).



Figura 2: Diferença de crescimento inicial (10 DAI, <u>Dias Após</u> <u>Infecção</u>) entre ramo sadio controle à esquerda e infectado à direita.

Os poli álcoois Glicerol, Manitol, Sorbitol e o açúcar Sacarose diminuem rapidamente de concentração após a infecção, atingindo níveis baixos e estáveis em torno e a partir de 25 DAI (Figura 1, C-E). Essa queda de concentração pode refletir de modo não mutualmente exclusivo tanto um consumo por parte do fungo, como o evidenciado no Capítulo 2 com base na expressão dos genes da via de assimilação do Glicerol, quanto por parte da rápida utilização dessas fontes de carbono pelo tecido vegetal em crescimento e expansão. Os açúcares solúveis Glicose e Frutose aumentam ligeiramente durante a infecção, no entanto a taxas mais baixas que o acúmulo que ocorre em plantas normais no mesmo período (Figura 1, F). Isso pode refletir uma ineficiência da conversão fotossintética ou incapacidade da transição dos tecidos infectados de um tipo "dreno" para um tipo "fonte".

De um modo geral, pode-se concluir que existe um ciclo rítmico de concentrações de fontes de carbono no apoplasto de cacau sadio e que esse ritmo é descaracterizado nas plantas infectadas por *M. perniciosa*. É possível constatar também um padrão

correspondente à diminuição das concentrações das fontes de carbono que ocorre em média ao redor de 25 a 30 DAI (Figura 1), o que pode significar um ponto de mudança metabólica por parte do fungo através de stress por diminuição das fontes de carbono disponíveis a partir desse período.

A queda da concentração de poli álcoois e açúcares solúveis no apoplasto coincide com o desenvolvimento do calo na base do ramo infectado

De um modo geral o desenvolvimento da Vassoura-verde ocorre primeiramente através do rápido lançamento de um número maior de folhas que o evidenciado em um lançamento normal e uma rápida hipertrofia do ramo infectado (Figura 3, A). Posteriormente, ocorrem brotamentos laterais sem a expansão de novas folhas (perda da dominância apical) concomitantemente com o aumento do inchaço generalizado do caule infectado (Figura 3, B). Por fim, a maturidade da Vassoura-verde ocorre com o ápice da hipertrofia do ramo, maior curvatura das folhas (epinastia) e o desenvolvimento de um calo pronunciado na base do ramo infectado, o local inicial de infecção (Figura 3, C).



Figura 3: Desenvolvimento da Vassoura-verde em plântulas de cacau. A) Primeiros sintomas de hipertrofia com cerca de 10-15 DAI. B) Crescimento do ramo infectado, aumento da hipertrofia e início dos brotamentos laterais (setas brancas) com cerca de 15 a 25 DAI. C) Vassoura-verde madura, 25 – 35 DAI, com sintomas de perda de dominância apical (setas brancas), intumescimento do calo na base do ramo (seta vermelha) e epinastia das folhas (seta azul).

O desenvolvimento do calo na base do ramo infectado torna-se visualmente evidente em torno de 25-30 DAI, e paralela a queda das concentrações das fontes de carbono no apoplasto dos tecidos infectados. De modo interessante, no caso da não transição do tecido infectado de um tipo "dreno" para um tipo "fonte" esperava-se um transporte preferencial de nutrientes das partes sadias da planta para as partes infectadas. No entanto, ao contrário de outras interações planta-patógeno (Berger *et al.,* 2007), isso parece não ocorrer na Vassoura-de-bruxa a partir do dia 25-30 DAI, quando a Vassoura-verde atinge a maturidade em termos de desenvolvimento dos sintomas.

O desenvolvimento do calo impede a comunicação vascular das partes sadias da planta com o ramo infectado

Cortes histológicos transversais dos caules de tecidos sadios e infectados sugerem que o aumento da circunferência (hipertrofia) nos tecidos infectados é fruto de um aumento da diferenciação do xilema (Figura 4, A-B e C-D). De modo intrigante, o calo na base da Vassoura-verde madura não apresenta esse padrão de diferenciação, mostrando-se como uma massa de células desorganizada e indiferenciada, com a estrutura do tecido vascular totalmente descaracterizada (Figura 4, E-F), sugerindo a perda da capacidade de transporte vascular através desse ponto.



Figura 4: Cortes transversais (barras vermelhas è esquerda) e microscopia do caule de plantas sadias controle (A e B), infectadas (C e D) e do calo (seta branca) na base das Vassoura-verde (E e F).

De modo a testar se o desenvolvimento do calo é suficiente para impedir o fluxo vascular das partes sadias da planta para o ramo infectado, extraímos e quantificamos o volume de apoplasto dos ramos infectados com 30 DAI (Vassoura-verde madura) a partir de um corte perpendicular do caule acima (na região infectada – Figura 5 B) e abaixo (na região sadia – Figura 5 A) do calo. Os resultados dos volumes obtidos, normalizados pelo peso do ramo infectado, sugerem um comprometimento do transporte vascular entre partes sadia e infectadas das plantas embora exista um fluxo residual verificado pela capacidade de se extrair apoplasto a partir de um corte abaixo do calo (Figura 5 A). No entanto, esse valor residual pode ser um artefato da técnica de extração sob pressão e no sentido inverso, e não refletir o transporte fisiológico real através da base do ramo.



Figura 5: Coleta de apoplasto de Vassouras-verdes maduras a partir de um corte transversão do caule abaixo (A) ou acima (B) do calo da base da Vassoura (seta vermelha). O volume de apoplasto coletado em microlitros, normalizado pelo peso dos ramos infectados, reflete o grau de condução vascular através do calo.

Para testar a perda da capacidade de transporte sob condições fisiológicas, utilizamos a técnica descrita por Lin e colaboradores em 2011 para infiltrar uma solução de 5mg/mL de Xileno Cianol em água através do pecíolo da folha sadia imediatamente abaixo do calo na base do ramo infectado de Vassouras-verdes maduras (30 DAI). Através dessa técnica é possível monitorar o transporte vascular sob condições fisiológicas pela migração do corante azul através dos tecidos. Plantas sadias controle apresentaram um padrão de coloração azul visível nas folhas maduras e no meristema apical em 48 horas de infiltração (Figura 6, A e B) enquanto plantas infectadas não apresentaram migração do corante para nenhum tecido da Vassoura-verde. Extrações do apoplasto de ramos sadios e de Vassouras-verdes infiltrados com Xileno Cianol e a avaliação da presença do corante através da absorbância em 620nm em espectrofotômetro mostram a total ausência de transporte vascular das partes sadias para as infectadas (Figura 6, C).



Figura 6: Infiltração de ramos de cacau sadio e infectado a partir do pecíolo da folha madura imediatamente abaixo do ramo com solução de Xileno Cianol. Padrão de migração do corante em folhas maduras (A) e meristema apical (B) de plantas sadias controle. C) Absorbância em 620nm do fluido apoplástico extraído de controle e infectados após 48 horas de infiltração de Xileno Cianol.

Do ponto de vista do fungo, a evolução de um mecanismo de bloqueio do fluxo vascular na base do ramo infectado parece a princípio desvantajosa por impedir o transporte de nutrientes provenientes dos tecidos sadios da planta. Por outro lado, esse mesmo mecanismo pode servir para impedir a remobilização de nutrientes do ramo infectado prestes a morrer, aprisionando esses nutrientes para a proliferação da fase necrotrófica dicariótica e a formação dos basidiocarpos e esporos. De fato, resultados recentes sugerem que o processo de senescência ocorre nos ramos infectados de cacau como resultado da longa fase biotrófica e de seus sintomas. Durante a senescência, ocorre uma reprogramação do metabolismo da planta para remobilizar nutrientes para as

partes vivas, notavelmente promovendo o reaproveitamento de nitrogênio na forma de amino ácidos e amônia (Mattson e Schjoerring, 2003).

A expressão do gene de necrose MpNEP2 e a curva de crescimento de *M*, *perniciosa* nos tecidos infectados, sugere que a queda nas concentrações de fontes de carbono é um sinal importante no processo de patogenicidade

Nos experimentos com o modelo em plântulas, os primeiros sintomas de necrose ocorrem em torno de 50 a 60 DAI, após a queda das concentrações de fontes de carbono no apoplasto. De modo a testar uma eventual reprogramação metabólica do fungo comprometida com a necrose em resposta ao stress por queda das concentrações de carbono no apoplasto, avaliamos a expressão de um fator de patogenicidade, MpNEP2, durante a interação. MpNEP2 é um gene que codifica uma proteína de necrose e indução de etileno (Kuffner *et al.,* 2009) e é o primeiro fator de patogenicidade comprovado estudado a partir do genoma de *M. perniciosa* (Garcia *et al.,* 2007).

Durante a interação é possível evidenciar que a expressão de MpNEP2 é induzida progressivamente a partir de 30 DAI (Figura 7), sugerindo uma relação de consequência do stress nutricional experimentado pelo fungo com a queda das concentrações de fontes de carbono no apoplasto. De fato, estudos de fungos fitopatógenos mostram que a expressão de genes de patogenicidade é normalmente induzida sob deprivação de nutrientes (Brown *et al.,* 2008; Mathioni *et al.,* 2011).

87



Figura 7: Expressão relativa de MpNEP2 avaliada por PCR quantitativo em tempo real do RNA extraído ao longo do desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa em plântulas de cacau.

Suporte para a existência de um sinal de stress nutricional baseado em carbono em torno de 30 DAI também pode ser verificado através de uma curva de crescimento do fungo durante a interação. É possível extrapolar uma curva de crescimento de *M. perniciosa* a partir dos dados de expressão do controle endógeno Beta Tubulina 2 (MpTUB2), assumindo-se que ela não varia ao longo da interação e que diferenças na quantidade relativa de seu mRNA refletem diretamente um maior número de hifas. Com base no padrão de crescimento observado, é possível notar que existe um aumento exponencial do fungo durante o desenvolvimento dos sintomas que paralela a queda das concentrações de fontes de carbono no apoplasto em 30 DAI (Figura 8). O crescimento

então se torna lento para só ser retomado em torno de 50 DAI, com o aparecimento dos primeiros sintomas de necrose (Figura 8).



Figura 8: Expressão do controle endógeno MpTUB2 ao longo do desenvolvimento da Vassoura-debruxa em cacau.

De modo a testar o papel das fontes de carbono na sinalização da patogenicidade em *M. perniciosa* durante a interação com cacau, plantas infectadas com 40 DAI foram submetidas a infiltrações de soluções de carboidratos (Glicose, Frutose, Sacarose, Glicerol, Manitol e Inositol, 10 mM cada) ou controles contendo somente o veículo aquoso a partir de um pecíolo de uma folha localizada diretamente no ramo infectado.

O acompanhamento preliminar desses experimentos mostrou um atraso médio no aparecimento da necrose nas plantas infiltradas com carboidratos em cerca de 15 dias. É possível que a infiltração atrase a expressão dos genes de patogenicidade do fungo, impedindo a necrose precoce do ramo infectado, no entanto, a possibilidade da solução de carboidratos atrasar diretamente o processo de senescência da Vassoura-verde não pode ser descartada. De fato, as hipóteses não são mutualmente exclusivas e análises futuras da expressão de eventuais genes marcadores do processo de senescência e da expressão de MpNEP2 em Vassouras-verdes infiltradas e controles deverão permitir uma avaliação mais específica do papel das fontes de carbono nesses processos.

De um modo geral, o metabolismo de carbono parece ter um papel fundamental tanto na patogenicidade de *M. perniciosa* quanto no desenvolvimento da doença no cacaueiro. A futura identificação e estudo de reguladores do metabolismo de carbono em *M. perniciosa* devem fornecer um conjunto de alvos importantes para o estudo de mutantes e testes das hipóteses levantadas neste projeto. De modo similar, com o melhor entendimento das alterações fisiológicas durante o desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa, em especial do processo de senescência e também do metabolismo de nitrogênio, devem permitir a construção de um modelo de estratégias de manejo visando a manipulação da fisiologia do cacaueiro de modo a melhorar a produtividade e a tolerância à Vassoura-de-bruxa. Nesse sentido, acreditamos que a caracterização das alterações do metabolismo de carbono no apoplasto de cacau durante a Vassoura-de-bruxa realizada neste trabalho foi uma importante contribuição.

4.5 – Referências Bibliográficas

Beissmann, B. W. Engels, K. Kogel, K-H. Marticke and H. J. Reisener. 1992. Elicitor-active glycoproteins in apoplastic fluids of stemrust-infected wheat leaves. Physiological and Molecular Plant Pathology. Volume 40, Issue 2, February 1992, Pages 79-89

Berger S, Sinha AK, Roitsch T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. J Exp Bot. 58(15-16):4019-26.

Brown SH, Yarden O, Gollop N, Chen S, Zveibil A, Belausov E, Freeman S. 2008. Differential protein expression in Colletotrichum acutatum: changes associated with reactive oxygen species and nitrogen starvation implicated in pathogenicity on strawberry. Mol Plant Pathol. 9(2):171-90.

Carlos Priminho Pirovani, Heliana Argôlo Santos Carvalho, Regina Cele Reboucas Machado, Dayane Santos Gomes, Fátima Cerqueira Alvim, Alan William Vilela Pomella, Karina Peres Gramacho, Júlio Cézar de Mattos Cascardo, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Fabienne Micheli. 2008. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by Moniliophthora perniciosa, the causal agent of the witches' broom disease. ELECTROPHORESIS - Volume 29, Issue 11, pages 2391–2401.

Eaton CJ, Cox MP, Ambrose B, Becker M, Hesse U, Schardl CL, Scott B. 2010. Disruption of signaling in a fungal-grass symbiosis leads to pathogenesis. Plant Physiol. 2010 Aug;153(4):1780-94.

Eaton CJ, Cox MP, Scott B. 2011. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? Plant Sci. 180(2):190-5.

Eaton CJ, Jourdain I, Foster SJ, Hyams JS, Scott B. 2008. Functional analysis of a fungal endophyte stress-activated MAP kinase. Curr Genet. 53(3):163-74.

Evans HC. 1980. Pleomorphism of *Crinipellis perniciosa* causal agent of witches' broom disease of cacao. T. Brit. Mycol. Soc. 74(3):515-523.

Garcia, O., Macedo, J.A., Tiburcio, R., Zaparoli, G., Rincones, J., Bittencourt, L.M., Ceita, G.O., Micheli, F., Gesteira, A., Mariano, A.C., Schiavinato, M.A., Medrano, F.J., Meinhardt, L.W., Pereira, G.A., and Cascardo, J.C. (2007) Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete Moniliophthora perniciosa, the causal agent of witches' broom in Theobroma cacao, *Mycol. Res. 111*(4), 443-455.

Gertjan J.M. den Hartog, Agnes W. Boots, Aline Adam-Perrot, Fred Brouns, Inge W.C.M. Verkooijen, Antje R. Weseler, Guido R.M.M. Haenen, Aalt Bast. 2010. Erythritol is a sweet antioxidant. Nutrition. Vol. 26, Issue 4, Pages 449-458.

I. J. Tetlow and J. F. Farrar. 1993. Apoplastic Sugar Concentration and pH in Barley Leaves Infected with Brown Rust. J. Exp. Bot. 44 (5): 929-936.

J. Aked, J. L. Hall. 1993. Effect of Powdery Mildew Infection on Concentrations of Apoplastic Sugars in Pea Leaves. New Phytol. 123, 283-288.

Kuffner, I., Ottman, C., Oecking, C., and Nurnberger, T. (2009) Cytolytic toxins as triggers of plant immune response, *Plant Signaling Behav. 4*(10), 977-979.

Lana TG, Azevedo JL, Pomella AW, Monteiro RT, Silva CB, Araújo WL. Endophytic and pathogenic isolates of the cacao fungal pathogen Moniliophthora perniciosa(Tricholomataceae) are indistinguishable based on genetic and physiological analysis. Genet Mol Res. 10(1):326-34.

Mathioni SM, Beló A, Rizzo CJ, Dean RA, Donofrio NM. 2011. Transcriptome profiling of the rice blast fungus during invasive plant infection and in vitro stresses. BMC Genomics. 12:49.

Matthieu H.A.J. Joosten, leon j.m. hendrickx and pierre j.g.m. de wit. 1990. Carbohydrate composition of apoplastic fluids isolated from tomato leaves inoculated with virulent or avirulent races of Cladosporium fulvum (syn. Fulvia fulva) Neth. J. P1. Path. 96:103-112.

Meinhardt LW, Bellato CM, Rincones J, Azevedo RA, Cascardo JC and Pereira GA. 2006. In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. Curr. Microbiol. 52(3):191-196.

Rincones JP. Vassoura-de-bruxa: organização genômica, variabilidade de isolados e análise de identidade e expressão de genes ligados à patogenicidade do *fungo Crinipellis perniciosa* [Dissertação]. UNICAMP, Tese do Instituto de Biologia (Doutorado em Genética e Biologia Molecular), 150 pág., 2006.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. 2001.

Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella AW, Schiavinato MA, Cascardo JC *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(413):865-877.

Silva SDVM and Matsuoka K. 1999. Histologia de *Crinipellis Perniciosa* (Stahel) Singer em cacaueiro (*Theobroma Cacao* L.) suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa [Article in Portuguese]. Fitopatolol. Bras. [Sociedade Brasileira de Fitopatologia] 24(01):54-59.

Suzanne Aldington, Stephen C. Fry. 1992. Plant cell wall-lysing enzymes in the apoplast of tomato leaves infected with Fulvia fulva. Canadian Journal of Botany. 70:(3) 607-613.

Yu-Hsiang Lin, Meng-Han Lin, Peter M Gresshoff & Brett J Ferguson. 2011. An efficient petiolefeeding bioassay for introducing aqueous solutions into dicotyledonous plants. Nature Protocols Vol.6, 36–45.

Capítulo 4

Desenvolvimento de ferramentas básicas de inativação gênica e localização subcelular de proteínas no fitopatógeno *Moniliopthora perniciosa* para fins de genômica funcional.

Joan G. Barau, Vinicius M. A. carvalho, Ludimila D. Almeida, Johana Rincones e Gonçalo A. G. Pereira

4.1 – Resumo

Desde o início em 2001 do projeto genoma do fungo Moniliopthora perniciosa, causador da Vassoura-de-bruxa em cacau, uma série de trabalhos elucidando aspectos moleculares e fisiológicos permitiram a construção de um modelo global dessa fitopatologia. Atualmente, com a expansão dos dados de genoma e transcriptoma utilizando tecnologias de seguenciamento de DNA de terceira geração (Illumina e 454 Life Sciences) e um conseguente maior refinamento do modelo proposto da interação plantafungo, dezenas de genes-alvo com potencial participação em vias de patogenicidade e desenvolvimento de diversos aspectos da doença foram identificados. Nesse contexto, dentre as atuais ferramentas desenvolvidas ao longo dos últimos dez anos para análises de genômica funcional nesse modelo, a inativação ou nocaute de genes por gene targeting e o estudo da atividade de proteínas através de fusões com genes repórteres são ferramentas essenciais ao teste das hipóteses geradas como fruto da pesquisa genômica da Vassoura-de-bruxa. Transformantes de *M. perniciosa* carregando uma cópia do gene marcador de autofagia MpATG8 fusionado em sua extremidade carboxi-terminal ao marcador GFP, apresentaram um padrão de fluorescência difuso no citoplasma sob condições normais e a concentração nos autofagossomos sob condições de deprivação de nutrientes e autofagia, demonstrando a possibilidade da aplicação de fusões com repórteres fluorescentes para experimentos de localização subcelular de proteínas desse fitopatógeno. Considerando os dados disponíveis na literatura, uma estratégia baseada na seleção de recombinantes através da técnica split marker em conjunto com um silenciamento transiente do sistema de reparo NHEJ por RNAi foi traçada de modo a obter o nocaute do gene MpKu70 que codifica uma proteína essencial a essa via de reparo, cuja inativação está associada a geração de uma linhagem mais susceptível a recombinação homóloga e gene targeting. Usando a estratégia split marker não foi possível obter transformantes, no entanto, na transformação com o cassete de disrupção

completo foi possível obter 1,5% (2 entre 150) de recombinantes positivos conforme a seleção por PCR da inserção no locus Ku70. A estratégia de silenciamento transiente do mecanismo NHEJ visando facilitar a recombinação e a inserção no locus Ku70 mostrouse promissora, aumentando a taxa de sucesso de 1,5% para 34% (10 entre 29) em eventos de co-transformação com 10 µg de RNA senso e antisenso do mRNA do gene Ku70. Embora as inserções tenham sido verificadas por PCR e sequenciamento, não foi possível obter nenhuma linhagem homocariótica com o nocaute total do gene MpKu70 verificado através da expressão do alelo selvagem presente no heterocárion através de PCR quantitativo em tempo real. A validação dos alelos nocautes por *Southern Blotting* e a purificação de linhagens homocarióticas nocaute para o gene MpKu70 deve fornecer uma linhagem melhorada (NHEJ deficientes) com fenótipo de maior taxa de recombinação homóloga em relação a integração aleatória e portanto, mais susceptível a manipulação genética por *gene targeting*.

4.2 - Introdução

A iniciativa do projeto genoma do fungo causador da Vassoura-de-bruxa em cacau expandiu o leque de possibilidades envolvendo a pesquisa genética e biologia molecular nos trabalhos científicos nesse modelo fitopatológico. O *draft* do genoma de *Moniliopthora perniciosa*, sequenciado com tecnologia Sanger a uma cobertura de cerca de 4X (Mondego *et al.*, 2008), alavancou durante a sua produção uma série de trabalhos de caracterização molecular de diversos aspectos da interação fitopatogênica. De fato, a iniciativa e suas consequências mostraram-se de tal maneira positivas que o trabalho de sequenciamento avançou recentemente não só no sentido da obtenção de um genoma completo, mas também na avaliação do transcriptoma do fungo e do cacaueiro utilizando

novas tecnologias de terceira geração (2009/50119-9 Auxílio Pesquisa - Projeto Temático da Vassoura-de-bruxa).

Atualmente diversas vias metabólicas ou genes com papel importante na patogênese de *M. perniciosa* em cacau estão sendo estudados em seus aspectos genéticos (regulação da transcrição gênica), bioquímicos e fisiológicos (atividade das proteínas e resposta a inibidores), evolutivos (filogenias e transferência horizontal de genes) e estruturais (resolução de estruturas de proteínas-chave). Nesta segunda etapa de transição da investigação exploratória para os testes específicos do modelo da Vassoura-de-bruxa, a manipulação genética de *M. perniciosa* é uma instrumentação estratégica e essencial para o teste de hipóteses e a significativa melhoria do nível das publicações.

O trabalho pioneiro na transformação genética de *M. perniciosa* foi realizado por Lima e colaboradores em 2003, utilizando o plasmídeo pAN7-1 contendo o gene *hph* de *Escherichia coli* marcador de resistência ao antibiótico Higromicina controlado por promotor e terminador heterólogos de ascomicetos (*gpd* e *trpC* de *Aspergillus nidulans*). Posteriormente, Lopes e colaboradores em 2008 demonstraram um significativo aumento da eficiência de transformação ao utilizar uma construção semelhante, porém contendo um promotor heterólogo de basidiomicetos (*gpd* de *Agaricus bisporus*) e enzimas de restrição (REMI), inclusive demonstrando a possibilidade de obtenção de mutantes auxotróficos.

Em 2009, Caribé dos Santos e colaboradores utilizaram a mesma técnica para introduzir o marcador de fluorescência verde (GFP) em conjunto com a resistência a Higromicina, presentes no vetor pHSP70-SG, seguido de introdução de RNA dupla fita (transcrito GFP senso e antisenso) nos transformantes para obtenção do silenciamento gênico (*knockdown*) e consequente apagamento do GFP através de RNA de interferência

96

(RNAi). A demonstração da funcionalidade da via de RNAi para silenciamento de genes em *M. perniciosa* foi um importante avanço na análise genética desse fitopatógeno no entanto, a técnica descrita apresenta algumas desvantagens em relação a completa inativação gênica (*knockout*) para fins de genética reversa como a ausência de marcador de seleção positiva, silenciamento cruzado entre famílias gênicas ou genes compartilhando regiões conservadas, expressão residual e silenciamento transiente.

Considerando a possibilidade de utilização do marcador GFP e do subsequente silenciamento por RNAi (Caribé dos santos et al., 2009), a utilização de fusões de proteínas de interesse com marcadores de fluorescência é uma ferramenta importante na análise genética funcional de genes com potencial de fornecer informações guantitativas sobre a produção e localização subcelular de proteínas e a atividade de processo biológicos envolvendo o gene-alvo in vivo. De modo a testar a viabilidade desse tipo de análise por microscopia de fluorescência das hifas vivas de M. perniciosa, uma fusão carboxi-terminal do gene marcador de autofagia MpATG8 com o marcador fluorescente GFP foi idealizada de acordo com o descrito em estudos do processo de autofagia em Saccharomyces cerevisiae (Kim et al., 2001). MpATG8 é o correspondente homólogo de M. perniciosa ao gene AUT7 de S. cerevisiae que codifica uma proteína semelhante a Ubiquitina e que participa do processo de autofagia através do recrutamento da membrana de formação do autofagossomo (Nakatogawa et al., 2009). Em células normais, ATG8 encontra-se a níveis basais no citoplasma, no entanto, durante o processo de autofagia ATG8 concentra-se inicialmente em um ponto do citoplasma (PAS, Pre-Autophagossomal Structure) e posteriormente no interior do autofagossomo (Kim et al., 2001). O acompanhamento do processo de autofagia em transgênicos expressando fusões carboxi-terminais da proteína ATG8 com GFP através das diferentes localizações subcelulares deve fornecer uma plataforma importante para a prova de conceito de

aplicabilidade dessa ferramenta em *M. perniciosa* tendo em vista que o processo de autofagia parece estar relacionado a aspectos importantes do ciclo de vida e fitopatogenicidade nesse fungo (Pungartnik, *et al.*, 2009) e em outros fitopatógenos modelo (Nadal *et al.*, 2010).

A inativação gênica é outra importante ferramenta no estudo genético de fungos e que fornece pistas essenciais sobre o papel biológico dos genes-alvo (Krappmann, 2007). Em fungos ela é tradicionalmente obtida através da interrupção ou troca do gene-alvo por um fragmento de DNA exógeno carregando um marcador de seleção (Villalba *et al.,* 2008), seja através de mutagênese por inserção aleatória e isolamento via seleção fenotípica (*gene tagging*) ou mediada por recombinação homóloga sítio específica (*gene targeting*) através da utilização de sequências homólogas ao gene-alvo ligadas ao marcador de seleção.

Embora laboriosa, a primeira técnica se destaca por permitir a análise genética direta a partir de um fenótipo-alvo e foi pioneiramente demonstrada em *M. perniciosa* por Lopes e colaboradores em 2008 através do isolamento de um mutante deficiente na via Biosintética do aminoácido Metionina. No entanto, a inativação gênica por recombinação homóloga permite modificações precisas no genoma viabilizando análises de genética reversa (Kück *et al.*, 2010) mais adequadas ao modelo de estudo da Vassoura-de-bruxa tanto devido às características da biologia do fungo e das limitações técnicas resultantes, quanto pelo estado da arte dos dados de genoma, transcriptoma e genes possivelmente envolvidos na patogenicidade em cacau.

A inativação gênica por recombinação homóloga tipicamente é realizada através da transformação com uma construção contendo um cassete de expressão de um gene marcador flanqueado por sequências homólogas aos flancos 5' e 3' da região codante do gene-alvo a ser inativado. O tamanho das sequencias homólogas na construção têm uma influência direta no sucesso da recombinação e depende da eficiência relativa entre as duas vias de reparo de quebra de dupla fita de DNA em cada organismo (Krappman, 2007).

O reparo de quebra de dupla fita de DNA em Eucariotos se inicia com o reconhecimento de extremidades soltas de DNA dupla fita por proteínas específicas de duas vias diferentes, a via de reparo por reconhecimento de seguências homólogas e recombinação (HR; Homologous Recombination) ou por inserção aleatória via ligação de extremidades não homólogas (NHEJ; Non Homologous End Joining). Na HR, o reconhecimento das extremidades de DNA dupla fita soltas ocorre via um homodímero RAD52, identificado e estudado em Saccharomyces cerevisiae (Symington, 2002), fungo onde essa via ocorre em alta eficiência e é a principal forma de integração de DNA exógeno (Krappman, 2007). NHEJ por outro lado depende primariamente de um heterodímero proteico Ku70/Ku80 (Featherstone & Jackson 1999), e é um mecanismo mais estudado em fungos filamentosos, plantas e células humanas, onde a via é predominante (Critchlow & Jackson 1998; Daley et al. 2005; Hefferin & Tomkinson 2005). As evidências atuais sugerem que em cada organismo o reparo de quebra de dupla fita de DNA atua sob a forma de um equilíbrio competitivo entre HR e NHEJ e o destino de um fragmento de DNA exógeno na célula é determinado entre a integração homóloga ou aleatória de acordo com qual dos dois mecanismos, HR ou NHEJ, encontra-se predominante (Haber, 1999).

Nesse contexto, a obtenção de linhagens NHEJ deficientes é uma estratégia válida no trabalho de genômica funcional em fungos onde a manipulação genética tradicional é excepcionalmente trabalhosa e difícil. De fato, trabalhos recentes mostram um aumento significativo da eficiência da recombinação homóloga viabilizando o *gene targeting* em linhagens onde um ou ambos os genes Ku foram silenciados ou nocauteados (Krappman

99

2007). Apesar dos trabalhos até agora mostrarem que linhagens NHEJ deficientes apresentam um desenvolvimento normal, elas também carregam um fenótipo associado de maior susceptibilidade a agentes mutagênicos presumidamente devido a uma maior instabilidade do genoma, e ocorrência de eventuais letais sintéticos no uso dessas linhagens em futuros nocautes não pode ser descartada (Krappman 2007).

Além da obtenção de linhagens NHEJ deficientes, outra estratégia válida na otimização da obtenção de nocautes gênicos em fungos filamentosos é a seleção de recombinantes positivos através da técnica *split-marker* (Kuck & Hoff, 2010). Essa técnica, criada inicialmente para aperfeiçoar a manipulação genética em leveduras (Fairhead *et al.*, 1996), utiliza a co-transformação de dois fragmentos de DNA, cada um contendo uma porção de um cassete de expressão de um gene marcador com uma região de sobreposição central entre eles de modo que o marcador será expresso só nos transformantes que incorporarem os dois fragmentos no mesmo locus através de três recombinações (Figura 1).



Figura 1: Esquema exemplificando a estratégia *Split Marker* de seleção de linhagens nocaute através da reconstituição do marcador de seleção funcional no locus específico pela ocorrência de três recombinações homólogas.

Em consideração das alternativas técnicas disponíveis e da necessidade da obtenção de mutantes de *M. perniciosa* para fins de genômica funcional e teste das hipóteses envolvendo o papel de genes na fitopatogenicidade em cacau, foi delineada uma estratégia baseada na obtenção de um primeiro nocaute de um dos genes do mecanismo de reparo NHEJ visando: (1) a prova de conceito da viabilidade desse tipo de manipulação e (2) o desenvolvimento de uma linhagem melhorada susceptível a *gene targeting.* Para tanto, resolvemos combinar a metodologia *split-marker* para a seleção dos eventos desejados de recombinação com o silenciamento transiente do mecanismo de reparo NHEJ por RNAi no intuito de aumentar a probabilidade da ocorrência de RH mediando o subsequente nocaute de um dos genes do heterodímero Ku70/Ku80 e a reconstituição do marcador no locus.

4.3 – Materiais e Métodos

Isolado de *M. perniciosa*, meios de cultura e protocolo de transformação e seleção dos transformantes.

Para a transformação de *M. perniciosa* foi utilizado o isolado CP02, representativo da população patogênica em cacau no Sul da Bahia, cujo genoma foi sequenciado. Culturas foram mantidas a 28ºC no escuro em meio Malte 1,7% (17g/L extrato de Malte, 5g/L extrato de levedura e 15g/L ágar). O procedimento de transformação e seleção dos transformantes foi realizado conforme Lopes e colaboradores, 2008.

Oligonucleotídeos utilizados durante o projeto

Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) realizadas no projeto foram sintetizados em escala 10 nMol e de-salinizados (Prodimol - IDT), listados organizados funcionalmente na Tabela 1.

Tabela 1: Lista de oligonucleotídeos

Utilização	Oligo	Sequência 5'–3'
MpKu70 cDNA para transcrição <i>in vitro</i>	MpKu70cDNAT7 FWD	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCAACCCATTTCACCACTAGG
	MpKu70cDNAT7 REV	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGATGTTTGCTCCGTATCTCCGC
	MpKu70cDNA FWD	CCAACCCATTTCACCACTAGG
	MpKu70cDNA REV	TGTTTGCTCCGTATCTCCGC
PCR quantitativo em tempo real MpKu70	MpKu70RT FWD	TACCCGCTCGCTTGTGAATC
	MpKu70RT REV	GCCCAACTTCAAGCAAGTGC
Montagem do cassete de <i>gene targeting</i> (nocaute MpKu70)	1Kb 5' FWD	CCGAGACTGGTATTTCAGTC
	1Kb 5' REV	CTTGTGGTTGAAAGGAAGAG
	Higrom FWD	AACAACTCTTCCTTTCAACCACAAGGAAGAAGCTTTAAGAGGTCC
	Higrom REV	TGCCTCCGCTCGAAGTAGCG
	romicin FWD	CACGTTGCAAGACCTGCCTG
	romicin REV	CGCTCAACAAGTGCAGCTTTCAGACCGTTAATAACACATTGCGGACG
	1Kb 3' FWD	AACGGTCTGAAAGCTGCACTTG
	1Kb 3' REV	TCTGCCAGTGACCGTAATCG
Seleção nocautes	5' up gDNA FWD	GAGTGTTCGTGGAATGGTCC
Montagem do cassete de localização subcelular de MpATG8 (fusão GFP- MpATG8)	Ppubq FWD	TGATGTCAGGTTCATCCAAC
	Ppubq REV	CCTCGCCCTTGCTCACCATTCTGGAATATGGAGACGATG
	EGFP FWD	CCAGAATGGTGAGCAAGGGCGAGG
	EGFP REV	CATCCTTGAATTTGGACCTCATCTTGTACAGCTCGTCCATG
	MpATG8c FWD	ACAAGATGAGGTCCAAATTCAAGGATG
	MpATG8c REV	GGCAACTACAACAGCACTGCAATATTCATGAATCCGACGGTAGCT
	Tpubq FWD	GCAGTGCTGTTGTAGTTGCC
	Tpubq REV	CAGACTGCATCTTCTACGTC
	Tpubq-Higrom FWD	GAGCGGTCACGTTAGTCGACGTAG+CGGTGCCTTCTGTGCTTCCA
	romicin REV	CGCTCAACAAGTGCAGCTTTCAGACCGTTAATAACACATTGCGGACG

Montagem dos cassetes de gene targeting e localização subcelular.

As montagens dos cassetes de *gene targeting* e localização subcelular foram realizadas por fusão em PCR conforme Szewczyk e colaboradores, 2006 e Yu e colaboradores, 2004. Para a montagem do cassete de deleção do gene *MpKu70*, 1Kb das regiões genômicas 5' e 3' flanqueadoras do gene *MpKu70* foram amplificadas em PCR com oligonucleotídeos contendo caudas 5' complementares às regiões adjacentes desejadas na no marcador de seleção. O marcador de seleção consiste em um cassete de expressão do gene de resistência a Higromicina (*hph* de *E. coli*) controlado pelo promotor *gpd* (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) de *Agaricus bisporus* e terminador CaMV 35S, e foi amplificado em PCR a patir do vetor pBGgHg (Chen *et al.*, 2000) com oligonucleotídeos contendo caudas 5' complementares às regiões adjacentes desejadas nos flancos 5' e 3'. As reações de PCR dos fragmentos foram realizadas com enzima de alta fidelidade *Pfu DNA Polimerase* (Fermentas) conforme as especificações do fabricante para evitar a incorporação de mutações.

Os produtos de PCR, 1Kb 5', 1Kb 3' e *hph* foram purificados do gel de agarose 1% e utilizados (cerca de 10 ng cada) em uma reação de fusão sem oligonucleotídeos seguida de amplificação por PCR através da adição dos oligonucleotídeos direto usado previamente na amplificação do fragmento 1Kb 5' e reverso usado na amplificação do fragmento 1Kb 3' da seguinte maneira: 7 ciclos (94ºC/20 seg.; 60ºC/20 seg.; 72ºC/2 min.) de fusão sem oligonucleotídeos contendo concentrações indicadas pelo fabricante (Fermentas) de *Pfu DNA Polimerase*, tampão e dNTPs mais 10 ng cada dos fragmentos 1Kb 5', *hph* e 1Kb 3'. Em seguida a reação é mantida em 4ºC durante a adição de 1,25 u de *Pfu DNA Polimerase* e 5 pMol dos primers 1Kb 5' FWD e 1Kb 3' REV, seguidos de 30 ciclos de amplificação (94ºC/20 seg.; 60ºC/20 seg.; 72ºC/2 min.).

104

O produto da fusão/amplificação foi analisado em gel de agarose 1% e a banda correspondente a montagem específica foi excisada, purificada e clonada em *pGEM-T easy* (Promega) conforme o protocolo do fabricante, gerando o vetor de deleção pGEM-del-MpKu70 (Figura 2). Para a obtenção dos vetores para a técnica *split marker*, amplificações por PCR a partir de pGEM-del-MpKu70 usando os primers 1Kb 5' FWD, Higrom REV e romicin FWD, 1Kb 3' REV foram realizadas utilizando *Pfu DNA Polimerase* e os produtos purificados do gel de agarose 1% foram clonados em *pGEM-T easy*, gerando os vetores *split marker* pGEM-*sm*-Higrom e pGEM-*sm*-romicin. As montagens clonadas em pGEM-del-MpKu70, pGEM-*sm*-Higrom e pGEM-*sm*-romicin foram confirmadas quanto a presença de erros ou mutações por sequenciamento.

Para a montagem do cassete de localização subcelular, foi realizada uma fusão da região carboxi-terminal do gene MpATG8 (homólogo de *AUT7* de *S. cerevisiae*, que codifica uma proteína semelhante a ubiquitina que participa do processo de autofagia em eucariotos) com o gene da proteína fluorescente verde (GFP) sob controle do promotor e terminador do gene da Poliubiquitina de *M. perniciosa* (Figura 3). A montagem seguiu conforme o descrito para anteriormente para pGEM-del-MpKu70 porém dessa vez com a fusão de cinco fragmentos independentes para a clonagem e criação do vetor pGEM-GFP-ATG8: promotor Poliubiquitina (pPubq), gene MpATG8 e terminador Poliubiquitina (tPubq) a partir do DNA genômico de *M. perniciosa* e GFP e marcador de seleção (hph) a partir do vetor pBGgHg (Chen *et al.,* 2000).



Figura 2: Esquema do cassete de *gene targeting* utilizado para obtenção do nocaute MpKu70 clonado em pGEM-del-MpKu70. Oligos utilizados na montagem por fusão de PCR do cassete completo e dos cassetes para a estratégia *split marker* representados pelas setas escuras.



Figura 3: Esquema do cassete de fusão com repórter fluorescente para localização subcelular de MpATG8. Oligos utilizados na montagem por fusão de PCR do cassete completo clonado em pGEM-GFP-ATG8 representados pelas setas escuras.

Seleção preliminar dos transformantes possíveis nocautes para MpKu70, análise da expressão de MpKu70 e microscopia de fluorescência.

Para uma seleção inicial dos transformantes possivelmente carregando uma deleção do gene MpKu70, foi realizado uma extração de DNA de um pedaço de cerca de 3mm² da colônia transformante crescendo em meio Malte 1,7% sólido com 150µg/mL Higromicina conforme o descrito em Melo e colaboradores, 2006. O DNA de cada transformante foi utilizado como molde em uma reação de PCR com oligos 5' up gDNA FWD e Higrom REV visando a amplificação de cerca de 1800 pb da junção entre a região 5' do locus de integração homóloga do cassete de deleção e o gene *hph* contido no meio do cassete. O produto de amplificação foi visualizado em gel de agarose 1%, purificado, clonado em *pGEM-T easy* (Promega) e sequenciado para confirmação da deleção do alelo MpKu70.

Os transformantes positivos para o PCR de confirmação do nocaute do alelo MpKu70 tiveram a expressão do gene MpKu70 avaliada em relação ao nível de expressão do alelo selvagem em linhagens não transformadas por PCR quantitativo em tempo real. As reações de Real Time qPCR foram realizadas no sistema STEP ONE PLUS (Applied Biosystems), utilizando SYBR Green (2X SYBR Green PCR Master Mix – Applied Biosystems), 0,1 uL de cDNA e 200nM de oligonucleotídeos Ku70 RT FWD e Ku70 RT REV. Para a coleta de dados cada ponto experimental foi replicado três vezes As amplificações foram avaliadas quanto à especificidade através da inclusão de curvas de denaturação ao final de cada corrida. Foram realizadas curvas-padrão para determinar a eficiência de amplificação de cada alvo. A análise estatística da expressão relativa nos pontos de coleta foi realizada utilizando-se o software REST2010 (http://www.gene-quantification.de/rest-2010.html) que utiliza um modelo de quantificação relativa baseado em correção pela eficiência de cada reação (Pfaffl *et al.*, 2001).
Transformantes carregando a fusão carboxi-terminal GFP-MpATG8 foram transferidos para meio Malte 1,7% líquido (controle) ou água (autofagia) por duas horas. Em seguida lâminas com pedaços de micélio foram preparadas, analisadas quanto ao padrão de fluorescência em microscópio Olympus BX51 com fonte de excitação a 488nm (GFP) e registradas utilizando o software Image Pro 6.1 (Olympus).

4.4 – Resultados e Discussão

Obtenção de transformantes e PCR de seleção de nocautes

Utilizando a linhagem de *M. perniciosa* CP02 e o protocolo de transformação desenvolvido por Lima e colaboradores em 2003 e otimizado por Lopes e colaboradores em 2008, conseguimos obter em média cerca de 2 transformantes por micrograma de DNA plasmidial (pGEM-del-MpKu70). Apesar da alta reprodutibilidade nos eventos de transformação e da utilização da mesma linhagem, em média a eficiência obtida em nosso laboratório ainda é de 2 a 12 vezes mais baixa que o reportado no trabalho original (Lopes *et al.*, 2008), fato que pode ser atribuído a diferenças de atividade entre lotes de enzima protoplastizante ou divergência genética acumulada entre as linhagens devido a atividade de transposons ou alterações cromossômicas durante os inúmeros ciclos de repicagem e manutenção das culturas.

Foram realizadas cerca de 40 transformações consistindo de 20 eventos em paralelo entre a estratégia *split marker* (co-transformação pGEM-*sm*-Higrom e pGEM-*sm*-romicin) e a transformação com cassete completo (pGEM-del-MpKu70). Dos vinte eventos com cassete completo, foi possível isolar 150 transformantes com crescimento estável em meio contendo Higromicina, porém, nos 20 eventos onde a estratégia *split marker* foi empregada nenhum único transformante foi gerado (Tabela 2). Através do protocolo de

extração rápida de DNA (Melo *et al.,* 2006) e seleção de recombinantes locus-específico por PCR, foi possível identificar e validar por sequenciamento do produto de PCR clonado dois transformantes potenciais nocautes do gene MpKu70 (Figura 4), representando uma taxa de recombinação homóloga nativa baseada em sequencias flanqueadoras de 1000 pares de base de cerca de 1,5% (Tabela 2).

Transformações			
	Split Marker	Cassete completo	Cassete completo + MpKu70 RNAi
Estratégia	5μg pGEM- <i>sm</i> - Higrom 5μg pGEM- <i>sm</i> - romicin	10µg pGEM-del- MpKu70	10μg pGEM-del-MpKu70 10μg MpKu70 dsRNA
Eficiência	0%	1,5%	34%
Positivos / Total	Sem transformantes	2 / 150	10 / 34

Tabela2: Eficiência do gene targeting nas estratégias de transformação

A frequência de recombinação homóloga encontrada em *M. perniciosa* está de acordo com o reportado na literatura para o basidiomiceto *Schizophyllum commune*, de 0,3% a 1,4% (Ohm *et al.*, 2010). Essa baixa taxa de recombinação homóloga, aliada a baixa eficiência de transformação provavelmente inviabilizaram a estratégia *split marker* em linhagens selvagens de *M. perniciosa* (Tabela 2), pois a recombinação adicional que reconstitui o marcador de seleção torna o evento ainda mais improvável. A utilização de novas linhagens selvagens de *M. perniciosa* mais susceptíveis a transformação que a CP02 ou a otimização do protocolo de transformação podem viabilizar a utilização dessa estratégia. Além disso, em linhagens NHEJ deficientes como a Ku70 nocaute onde a recombinação homóloga ocorre em maior frequência podem viabilizar a utilização dessa estratégia na otimização da obtenção de nocautes subsequentes de genes de interesse.



Figura 4: Esquema da verificação da presença de alelos MpKu70 nocautes nos transformantes de *M. perniciosa*. Um PCR com oligos 5'up gDNA FWD e Higrom VER feito a partir de DNA genômico extraído de colônias transformantes só amplifica a banda correta de cerca de 1800 pares de base (representada pela região colorida em vermelho) no caso da presença do alelo MpKu70 nocaute. O produto de PCR foi clonado e sequenciado nas direções direta e reversa, revelando respectivamente a junção entre o locus genômico 5' acima do flanco de homologia (A) incluída no cassete de *gene targeting* e a ligação com o gene *hph*, marcador de resistência ao antibiótico Higromicina (B).

A estratégia de induzir um silenciamento transiente de MpKu70 através de RNAi mostrou-se eficiente em aumentar a frequência de transformantes carregando o genótipo do alelo MpKu70 nocaute (Tabela 2). Dado o aparente aumento da taxa de recombinação

homóloga, a utilização do RNAi pode viabilizar a técnica *split marker* em linhagens sem alterações no sistema NHEJ com a vantagem de que um silenciamento transiente de MpKu70 parece ser suficiente para permitir o *gene targeting* em maior frequência sem os riscos de eventuais fenótipos indesejados frutos de um duplo mutante Ku70/gene-alvo.

Expressão de MpKu70 nas linhagens prováveis nocautes

A análise da expressão de MpKu70 nas linhagens transformantes selecionadas prováveis nocautes mostrou uma grande amplitude de variação em relação ao selvagem (*wt*). Dentre os dois transformantes gerados com o cassete de *gene targeting* completo, intrigantemente T1.2 apresentou indução da expressão de MpKu70 enquanto T1.8 apresentou uma considerável repressão (Figura 5).



Figura 5: Análise da expressão de MpKu70 nas linhagens nocaute obtidas através da transformação com o cassete completo (T1.N) e da co-transformação com RNA dupla-fita de MpKu70 (T3.N) comparadas com a expressão de linhagem controle selvagem (WT).

Como a transformação é feita em protoplastos gerados a partir de micélio dicariótico, a obtenção de transformantes heterocarióticos carregando um núcleo transformado e um núcleo selvagem não é incomum. Nesse caso, na ocorrência de um nocaute MpKu70 heterocariótico e na ausência de expressão compensatória do alelo selvagem, uma redução de cerca de 50% da expressão no micélio selvagem deveria ser verificada. Considerando essa possibilidade, T1.8, T3.11, T3.12 e T3.13 apresentam em torno de metade da expressão do micélio controle (Figura 5) e, portanto, podem carregar o alelo MpKu70 nocaute no heterocarion.

Dos transformantes obtidos com ativação da via de RNAi de MpKu70, somente T3.11, T3.12 e T3.13 mostraram uma repressão de MpKu70 (Figura 5) que sugere que o silenciamento via RNAi parece ser transiente, no entanto, não se pode descartar a hipótese de que em T3.2 e T3.10 a via não tenha sido ativada por ineficácia da penetração do RNA dupla-fita nos eventos de co-transformação. Os níveis normais da expressão de MpKu70 em T3.2 e T3.10 e a indução verificada em T1.2 sugerem uma expressão compensatória do alelo MpKu70 selvagem presente no heterocárion ou a ocorrência de falsos-positivos na seleção de transformantes nocautes, hipóteses que somente poderão ser testadas através da genotipagem completa e verificação dos nocautes por *Southern blotting*.

A estratégia de obtenção de nocautes em *M. perniciosa* se mostrou promissora e o isolamento de linhagens monocarióticas deficientes no sistema de reparo NHEJ deve fornecer uma plataforma importante para a genômica funcional da Vassoura-de-bruxa. Para tanto, será necessário genotipar por *Southern blotting* das linhagens já obtidas em relação à confirmação definitiva da presença de alelos nocautes no heterocárion e ao número de cópias do alelo de resistência a Higromicina inserido no genoma de modo a

113

evitar fenótipos indesejados. No caso de não haverem linhagens com integração única por recombinação homóloga no locus MpKu70 para purificação de homocárions, novas transformações poderão ser realizadas de acordo com o descrito em Ohm e colaboradores em 2010, onde a utilização de um segundo marcador de resistência localizado fora do cassete de *gene targeting* permite a seleção de transformantes que, além do nocaute por recombinação homóloga, carregam integrações aleatórias em outros lugares do genoma.

Localização subcelular de MpATG8 e acompanhamento do processo de autofagia *in vivo*

A autofagia é um processo bastante conservado em eucariotos e sua primeira descrição data da década de 60, em células animais (Deter et al. 1967), mas foi apenas no início da década de 90, com a observação deste processo em *Saccharomyces cerevisiae* (Takeshige et al. 1992), e a subseqüente caracterização de mutantes para esta via (Tsukada et al. 1993), que passou-se a entender melhor suas bases moleculares. Um dos principais sinais para que seja desencadeada uma resposta autofágica é a ausência de nutrientes (Takeshige et al. 1992). Em termos de biologia celular, a autofagia é caracterizada pela formação de um compartimento de membrana dupla, o autofagossomo, responsável por sequestrar conteúdo citoplasmático e/ou organelas e encaminhar essas porções para vesículas degradativas (Nakatogawa et al. 2008). A formação do autofagossomo requer a interação de uma série de proteínas, codificadas por genes denominados ATG ("*autophagy related genes*").

O acompanhamento do processo de autofagia em células vivas pode ser realizado através dos padrões de localização subcelular de uma fusão GFP-ATG8 (Xie et al. 2008;

Sláviková et al. 2005). ATG8 está diretamente relacionado com a formação do autofagossomo, e a proteína Atg8p é direcionada do citoplasma de células em condições normais para uma estrutura pontual no citoplasma (PAS, *Pre-Autophagossomal Structure*) no início do processo de autofagia e posteriormente para o interior do autofagossomo (Kirisako et al.1999; Kim *et al.*, 2001). *M. perniciosa* possui uma única cópia do gene ATG8, MpATG8, com alta similaridade de proteína ao homólogo de levedura, o que torna apropriada a sua utilização como marcador de autofagia em uma fusão com GFP. Durante autofagia, Atg8p passa por um processamento em que um resíduo de arginina na extremidade amino-terminal é clivado por Atg4p durante o processo de autofagia (Kirisako et al. 2000), por isso, para fins da visualização dos três estados de MpATG8, foi idealizada uma construção de fusão carboxi-terminal do GFP com o gene MpATG8.

Foram obtidas 4 linhagens transformantes carregando o cassete de fusão com repórter fluorescente para localização subcelular de MpATG8 com crescimento rápido em meio contendo Higromicina. Todas as linhagens mostraram um padrão semelhante de fluorescência correspondente com a expressão de GFP, o que indica a expressão bemsucedida da proteína, mas não permite distinções entre linhagens mais ou menos eficientes devido ao efeito de posição da integração da construção no genoma ou ao número de cópias integradas em cada linhagem. Como a integração da construção pode levar a interrupção de genes acarretando em um fenótipo secundário indesejado, todas as linhagens foram analisadas em paralelo quanto ao padrão de fluorescência sob autofagia (Figura 6).



Figura 6: Análise por microscopia de fluorescência das hifas de linhagens transgênicas de *M. perniciosa* carregando a fusão carboxi-terminal GFP-MpATG8. A) Padrão de fluorescência difuso no citoplasma característico do padrão de distribuição de ATG8 sob condições fisiológicas. B) Micélio sob condições de deprivação de nutrientes (água) por cerca de uma hora: concentração de GFP-ATG8 em pontos do citoplasma (PAS) característicos do início do processo de autofagia. C) Concentração de GFP-ATG8 nos autofagossomos após duas horas de deprivação de nutrientes (água) característicos de autofagia.

Por fim, para fins de prova de princípio da aplicação da técnica de localização subcelular para fins de genômica funcional, essa construção se mostra adequada por permitir a clara diferenciação entre 3 estados de atividade do gene ATG8 - difuso no citoplasma, concentrado no PAS e localizado no autofagossomo – (Figura 6 A, B e C, respectivamente), o que nos permite testar a adaptabilidade da técnica para as características morfológicas e da biologia celular das hifas de *M. perniciosa*. Futuramente, a avalização do número de integrações do cassete de expressão da fusão GFP-MpATG8

por *Southern blotting* deve permitir a escolha da linhagem mais adequada para o estudo do processo de autofagia em *M. perniciosa*.

4.5 – Referências Bibliográficas

Abelson JN, Simon MI. Autophagy: Lower Eukaryotes and Non-Mammalian Systems - ME Vol. 451. Methods in Enzymology. 2008;451.

Bashi ZD, Khachatourians G, Hegedus DD. Isolation of fungal homokaryotic lines from heterokaryotic transformants by sonic disruption of mycelia. BioTechniques. 2010;48(1):41-6.

Caribé Dos Santos AC, Sena JAL, Santos SC, et al. dsRNA-induced gene silencing in Moniliophthora perniciosa, the causal agent of witches' broom disease of cacao. Fungal Genetics and Biology. 2009;46(11):825-36.

Chen X, Stone M, Schlagnhaufer C, Romaine CP. A fruiting body tissue method for efficient Agrobacterium-mediated transformation of Agaricus bisporus. Applied and environmental microbiology. 2000;66(10):4510-3.

Deter R L Baudhuin P and De Duve C. Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon, *J. Cell Biol.*, 35 (1967), pp. C11–C16

Jong JF de, Ohm R a, Bekker C de, Wösten H a B, Lugones LG. Inactivation of ku80 in the mushroom-forming fungus Schizophyllum commune increases the relative incidence of homologous recombination. FEMS microbiology letters. 2010;310(1):91-5.

Kim J, Huang WP, Klionsky DJ. Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. J Cell Biol. 2001 Jan 8;152(1):51-64.

Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, et al. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. J Cell Biol, 147 (1999), pp. 435–446.

Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Muzushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. J Cell Biol, 151 (2000), pp. 263–276.

Krappmann S. Gene targeting in filamentous fungi : the benefits of impaired repair. Molecular Microbiology. 2007;21:25-29.

Kück U, Hoff B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. Applied microbiology and biotechnology. 2010;86(1):51-62.

Lima JO, Santos JK dos, Pereira JF, et al. Development of a transformation system for Crinipellis perniciosa, the causal agent of witches' broom in cocoa plants. Current genetics. 2003;42(4):236-40.

Lopes FJF, Queiroz MVD, Lima JO, Silva VAO, Araújo EFD. Restriction enzyme improves the efficiency of genetic transformations in Moniliophthora perniciosa, the causal agent of witches' broom disease in Theobroma cacao. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2008;51(1):27-34.

Melo SCO, Pungartnik C, Cascardo JCM, Brendel M. Rapid and efficient protocol for DNA extraction and molecular identification of the basidiomycete Crinipellis perniciosa. Genetics and molecular research : GMR. 2006;5(4):851-5.

Mondego JM, Carazzolle MF, Costa GG, Formighieri EF, Parizzi LP, Rincones J, Cotomacci C, Carraro DM, Cunha AF, Carrer H, Vidal RO, Estrela RC, García O, Thomazella DP, de Oliveira BV, Pires AB, Rio MC, Araújo MR, de Moraes MH, Castro LA, Gramacho KP, Gonçalves MS, Neto JP, Neto AG, Barbosa LV, Guiltinan MJ, Bailey BA, Meinhardt LW, Cascardo JC, Pereira GA. A genome survey of Moniliophthora perniciosa gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. BMC Genomics. 2008 Nov 18;9:548.

Nadal M and Gold S E. The autophagy genes atg8 and atg1 affect morphogenesis and pathogenicity in Ustilago maydis.Mol. Plant Pathol. 11 (2010), pp. 463–478.

Nakayashiki H, Nguyen QB. RNA interference: roles in fungal biology. Current opinion in microbiology. 2008;11(6):494-502.

Ohm R a, Jong JF de, Berends E, et al. An efficient gene deletion procedure for the mushroomforming basidiomycete Schizophyllum commune. World journal of microbiology & biotechnology. 2010;26(10):1919-1923.

Pollack J K, Harris S D and Marten M R. Autophagy in filamentous fungi, *Fungal Genet Biol*, **46** (2009), pp. 1–8.

Pungartnik C, Melo SC, Basso TS, Macena WG, Cascardo JC, Brendel M. Reactive oxygen species and autophagy play a role in survival and differentiation of the phytopathogen Moniliophthora perniciosa. Fungal Genet Biol. 2009 Jun-Jul;46(6-7):461-72.

Ruiz-Díez B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. Journal of applied microbiology. 2002;92(2):189-95.

Sambrook J, Frtisch E, and Maniatis T. (1989) "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbour Lab Press, EUA.

Sláviková S, Shy G, Yao Y L, Giozman R, Levanony H, Pietrokovski S, Elazar Z and Galili G. The autophagy-associated ATG8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants. J. Exp. Bot., 56 (2005), pp. 2839–2849.

Szewczyk E, Nayak T, Oakley CE, et al. Fusion PCR and gene targeting in Aspergillus nidulans. Nature protocols. 2006;1(6):3111-20.

Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T and Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction, *J. Cell Biol.* 119 (1992), pp. 301–311.

Tsukada M and Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 333 (1993), pp. 169–174.

Villalba F, Collemare J, Landraud P, et al. Improved gene targeting in Magnaporthe grisea by inactivation of MgKU80 required for non-homologous end joining. Fungal genetics and biology : FG & B. 2008;45(1):68-75.

Xie Z, Nair U and Klionsky D J. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation, *Mol Biol Cell*, **19** (2008), pp. 3290–3298.

Yu J-H, Hamari Z, Han K-H, et al. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. Fungal genetics and biology. 2004;41(11):973-81.