Bruno Vaz de Oliveira

"Vassoura-de-bruxa: Caracterização de uma metanol oxidase extracelular e do secretoma de *Moniliophthora perniciosa*"

> CAMPINAS 2012

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

### INSTITUTO DE BIOLOGIA

| DE            | DE<br>PÓS-GRADUAÇÃO | A  | SEC  | ocri | AIGH | ~      |
|---------------|---------------------|----|------|------|------|--------|
| Dás opupulais | PÓS-GRADUAÇÃO       | 1  | OEV  | ກະທ  | RIA  | 1      |
|               | 1 ONGWIDDAGAD       | Dr | 5.00 | DE   | 1008 | $\sim$ |

### Bruno Vaz de Oliveira

## "Vassoura-de-bruxa: Caracterização de uma metanol oxidase

extracelular e do secretoma de Moniliophthora perniciosa"

Este exemplar corresponde à recação finada tese defendida pelo(a) candidato (a) BRUNE VAZ DE OLIVERA e aprovada pela Comicsão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira Co-Orientadora: Dra. Johana Rincones Pérez

> CAMPINAS, 2012

> > i

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

| OL4v | Oliveira, Bruno Vaz de, 1985-<br>Vassoura-de-bruxa: caracterização de um metanol<br>oxidase extracelular e do secretoma de <i>Moniliophthora</i><br><i>perniciosa /</i> Bruno Vaz de Oliveira. – Campinas, SP:<br>[s.n.], 2012.   |
|------|---|
|      | Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.<br>Coorientador: Johana Rincones Pérez.<br>Tese (doutorado) – Universidade Estadual de<br>Campinas, Instituto de Biologia.  |
|      | 1. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia). 2.<br><i>Moniliophthora perniciosa</i> . 3. Metanol oxidase. 4.<br>Secretoma. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães,<br>1964 II. Rincones Pérez, Johana. III. Universidade<br>Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título. |

### Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Witche's broom disease: characterization of an extracellular methanol oxidase and of the secretome of Moniliophthora perniciosa Palavras-chave em Inglês: Witche's broom disease Moniliophthora perniciosa Methanol oxidase Secretome Área de concentração: Genética de Microorganismos Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular Banca examinadora: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador] Fábio Papes Anderson Ferreira da Cunha Nilce Maria Martinez Rossi **Gisele Monteiro** Data da defesa: 30-08-2012 Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 30 de agosto de 2012

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira (Orientador)

Prof. Dr. Fábio Papes

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Mon. Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

Profa. Dra. Nilce M. Martinez Rossi

Profa. Dra. Gisele Monteiro

Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

#### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Vassoura-de-bruxa: Caracterização de uma metanol oxidase extracelular e do secretoma de *Moniliophthora perniciosa*"

( ) 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. 2011/03, do Instituto de Biologia (IB/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.

az de Oliveira

Orientador: Gonçalo Amarante Guisparães Pereira

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

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente: ( ) Deferido ( ) Indeferido Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI Presidente da Comissão Interna de Biossegurança Instituto de Biologia - UNICAMP

Carimbo e assinatura

iv

Dedico essa tese aos meus pais Sebastião e Cida, e à minha irmã Vanessa.

#### Agradecimentos

Aos meus queridos pais, Cida e Sebastião, por cuidarem de mim durante toda a vida com todo amor e dedicação, por me ensinarem a ser uma pessoa honesta e a respeitar aos outros, por me incentivaram a sempre seguir em frente. Espero algum dia poder retribuir pelo menos em parte tudo o que vocês fizeram e fazem por mim!

À minha irmã Vanessa, pela amizade e pelo companheirismo de uma vida inteira.

Aos meus avós Miguela (in memoriam), Geralda e José, por sempre enxergarem em mim e em todos os outros netos a compensação de uma vida de trabalho árduo.

A todos os meus familiares, em especial à tia Norma e ao tio Brás, e às minhas primas Lara e Jordana.

Ao Gonçalo, pela grande oportunidade de trabalhar por tantos anos no LGE, por propiciar um ambiente de trabalho excelente no laboratório e pela confiança em mim depositada.

À Jô, por ter me recebido no LGE, por toda a paciência em me ensinar a trabalhar com biologia molecular e pela amizade.

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

À Adriana Paes-Leme, por ter aberto as portas de seu laboratório pra mim e por toda ajuda.

Ao time da administração do LGE, Eliane, Sílvia, Mari, Welbe, Bruno e Igor, pela ajuda constante na resolução de burocracias, dos problemas cotidianos no laboratório e por sempre tornarem a nossa vida mais fácil.

À Dona Ernê, por todas as risadas que me proporcionou todos esses anos, e que está prestes a se aposentar. Muitas felicidades nessa nova etapa de sua vida.

Ao Marcelo Bassalo, por ter ajudado no desenvolvimento do projeto. Boa sorte em sua carreira!

Aos meus amigos do LGE, da rep, da biologia, de Uberaba, meu muito obrigado. Não citarei nomes para não correr o risco de esquecer ninguém e cometer uma injustiça.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP, em especial à Lourdes, pela ajuda constante.

À FAPESP (processo: 07/51030-6) e à CAPES (5542-09-0) pelo apoio financeiro.

A Deus, por uma vida plena de felicidade e oportunidades.

### Índice

| Resumo1  |
|--|
| Abstract2  |
| 1. Introdução3   |
| 2. Hipótese de trabalho12  |
| 3. Objetivos13   |
| CAPÍTULO I: Production of Calcium Oxalate Crystals by the Basidiomycete <i>Moniliophthora perniciosa</i> , the Causal Agent of Witches' Broom Disease of Cacao |
| CAPÍTULO II: Análise da expressão das catalases de <i>Moniliophthora perniciosa</i> e seu possível papel na defesa antioxidante                                |
| CAPÍTULO III: A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by <i>Moniliophthora perniciosa</i> in Witches' broom disease in cacao           |
| CAPÍTULO IV: Secretoma de <i>M. perniciosa</i> 77  |
| Conclusões gerais  |
| Perspectivas   |
| Apêndice 1: Desenvolvimento de um protocolo de transformação para Moniliophthora roreri87  |
| Apêndice 2: Artigos publicados101  |
| Apêndice 3: Artigo submetido103  |

#### Resumo

O fungo basidiomiceto Moniliophthora perniciosa é o agente causador da vassoura-de-bruxa do cacaueiro, doença que se tornou um dos principais problemas fitopatológicos do Brasil. O fungo possui duas fases de vida, biotrófica e necrotrófica, as quais estão associadas aos sintomas de vassoura-verde e vassoura-seca, respectivamente, durante a progressão da doença. Em vista dos grandes prejuízos econômicos causados pela vassoura-de-bruxa, foi iniciado o Projeto Genoma Vassoura-de-Bruxa, cujo objetivo é a decodificação genética do fungo com o intuito de identificar genes candidatos que possam estar relacionados ao estabelecimento e à progressão da doença para serem caracterizados. M. perniciosa é capaz de utilizar metanol como fonte única de carbono. Na maioria dos organismos estudados, a enzima metanol oxidase (MOX) é a responsável pelo metabolismo de metanol através do metabolismo peroxissomal, à qual também está associada uma catalase (CAT). Em plantas, uma das principais fontes de metanol é a pectina presente na estrutura da parede celular vegetal. Algumas espécies de fungos fitopatogênicos tem a capacidade de secretar oxalato como produto da enzima oxaloacetato acetilhidrolase (OAH), o qual é capaz de guelar íons cálcio da estrutura das pectinas, deixando-as vulneráveis ao ataque de enzimas que degradam a parede celular vegetal. Dentre essas enzimas, encontra-se a pectina metilesterase (PME), a qual é capaz de desmetilar as pectinas, liberando metanol. Como M. perniciosa possui em seu genoma seguências com similaridade a mox, cat, pme e oah, formulamos uma hipótese, segundo a gual M. perniciosa seria capaz de degradar o metanol proveniente das pectinas, através de um metabolismo peroxissomal, durante sua interação com o cacau na vassoura-de-bruxa. De fato, *M. perniciosa* é capaz de secretar oxalato, formando cristais de oxalato de cálcio. Nossos resultados sugerem fortemente que M. perniciosa utiliza o metanol proveniente das pectinas durante a vassoura-de-bruxa; no entanto, esse processo se daria através de um metabolismo extracelular, visto que M. perniciosa produz uma MOX e CAT extracelulares, e não através do metabolismo peroxissomal como inicialmente proposto. Além disso, M. perniciosa possui outras catalases, as quais se apresentam diferencialmente expressas nas diferentes fases do ciclo de vida do fungo e em diferentes estágios da progressão da vassoura-de-bruxa. Por fim, apresentamos uma análise preliminar do secretoma de *M. perniciosa*.

#### Abstract

The hemibiotrophic basidiomycete fungus Moniliophthora perniciosa is the causal agent of Witches' broom disease (WBD) in cacao. M. perniciosa is classified as a hemibiotrophic pathogen and presents two morphologically distinct life phases, biotrophic and necrotrophic, that are correlated with the green broom and dry broom symptoms, respectively, during the progression of WBD. The introduction of WBD in Bahia, the main Brazilian cacao-producing state, reduced the cacao production drastically and Brazil has become a net importer of cacao in order to supply the national chocolate industry. Due to the extreme losses in cacao production, the Witches' Broom Genome Project was initiated to decode the M. perniciosa genome and, based on the data acquired, select genes that could be relevant during the progression of WBD for characterization. M. perniciosa is able to grow in methanol as the sole carbon source. In methylotrophic yeasts and other methanol-degrading organisms, a methanol oxidase (MOX) is the key enzyme in methanol metabolism and it is also related to a catalase (CAT); both MOX and CAT characterize a peroxisomal metabolism. In plants, one of the main sources of methanol is the pectin present in the plant cell walls. Many phytopathogenic fungal species produce oxalate, a product of the enzyme oxaloacetate acetyl hydrolase (OAH), which removes calcium ions bound to pectin to produce calcium oxalate crystals, thus exposing the host cell walls to plant cell wall-degrading enzymes (PCWD) of fungal origin. One of the main PCWDs is pectin methylesterase (PME), an enzyme that removes the methyl ester radicals from esterified pectin, releasing methanol. As M. perniciosa possesses mox, cat, oah and pme on its genome, we hypothesized that M. perniciosa would utilize a peroxisomal metabolism to metabolize the methanol released from the pectin demethylation in WBD. Indeed, M. perniciosa secretes oxalate, thus producing calcium oxalate crystals. Our data strongly suggest that *M. perniciosa* able to utilize the methanol released from pectin demethylation; however, this metabolism is probably extracellular due to the presence of secreted MOX and CAT. Moreover, M. perniciosa possesses other cats, which are differentially expressed in vitro and in planta. Finally, we present a preliminary analysis of *M. perniciosa* secretome.

#### 1. Introdução geral

O cacau, *Theobroma cacao*, é uma planta frutífera arbórea de médio porte originária da Bacia Amazônica [1]. É largamente cultivada nos trópicos úmidos e suas sementes representam uma importante *commodity* de países tropicais exportadores de matéria-prima para a fabricação de chocolate. No início dos anos 90, a produção cacaueira no Brasil se apresentava como umas das atividades agrícolas mais bem sucedidas do país, com uma produção anual de cerca de 320 mil toneladas de sementes de cacau. No entanto, no ano de 1989, foram registrados os primeiros relatos do aparecimento da vassoura-de-bruxa na região produtora da Bahia, doença causada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa* [2]. Desde então, a doença se alastrou, acarretando inúmeros problemas socioeconômicos nas regiões produtoras, devido à drástica redução na produção cacaueira. Com 153 mil toneladas produzidas na safra 2009/2010, o Brasil atualmente figura como um importador dessa matéria-prima para o suprimento da indústria de chocolate, o que encarece os custos da produção (http://www.ceplac.gov.br/paginas/jornaldocacau/jornaldocacau01.pdf).

#### 1.1. Biologia do fungo Moniliophthora perniciosa

O agente causal da vassoura-de-bruxa é um fungo basidiomiceto que, inicialmente, foi classificado no gênero *Marasmius* [3] e reclassificado por Singer [4] para *Crinipellis perniciosa*. Recentemente, a partir de estudos morfológicos e moleculares [5], o biótipo "C" (patogênico para o cacaueiro) foi incluído no gênero *Moniliophthora*, pertencente à família Tricholomataceae e à ordem Agaricales.

*M. perniciosa* apresenta um ciclo de vida hemibiotrófico, com duas fases distintas: a primeira, biotrófica e a segunda, necrotrófica [6]. O ciclo da doença começa quando esporos de *M. perniciosa* infectam os tecidos meristemáticos da planta, tais como gemas vegetativas, frutos e almofadas florais [7]. Os basidiósporos germinam sobre a cutícula e a base dos tricomas, emitindo tubos germinativos longos, sem a formação de apressórios e sem nenhuma orientação específica na superfície da planta hospedeira. Os tubos germinativos penetram o tecido vegetal através de lesões na superfície ou através dos estômatos [8], produzindo um micélio uninucleado e haplóide, com hifas monocarióticas grossas (5-20 μm), sendo ausentes os grampos de conexão [9-11]. Esta morfologia micelial coincide com a fase

biotrófica ou parasítica do ciclo de vida do fungo, que cresce intercelularmente e se alimenta dos tecidos vivos da planta.

A presença do fungo gera um desbalanço hormonal na planta, cujos tecidos infectados passam a apresentar hiperplasia e hipertrofia, fenômeno descrito como vassoura-verde [12]. Sabe-se hoje que a vassoura-verde apresenta concentrações mais elevadas de citocininas [13]; além disso, há evidências de que *M. perniciosa* seja capaz de sintetizar hormônios vegetais, causando um desbalanço nos níveis de auxina e ácido salicílico [14]. Adicionalmente, observam-se grandes quantidades de glicerol na vassoura-verde, alteração que pode ser de grande significância para o desenvolvimento da doença, pois esta fonte de carbono é praticamente ausente na vassoura-seca [15]. A partir dessa constatação, desenvolveu-se um protocolo de manutenção, *in vitro*, de um micélio monocariótico do fungo com as mesmas características morfológicas do fungo encontrado na fase biotrófica *in planta* (micélio *biotrophic-like*). O meio de cultura utilizado possui apenas glicerol como fonte de carbono [16].

Cerca de 5 a 9 semanas após o início da infecção, o micélio, devido a mecanismos e sinais desconhecidos, invade as células do tecido infectado, passando a alimentar-se dos tecidos mortos da planta (fase saprotrófica). Muito provavelmente essa invasão das células do tecido infectado é induzida devido à escassez de nutrientes no meio extracelular. Esta mudança de fase da doença também coincide com uma mudança na morfologia do fungo, que passa a apresentar hifas dicaritóticas um pouco mais finas (3–5 µm), sendo presentes os grampos de conexão, necessários para a manutenção da união entre dois núcleos diferentes [9-11]. Nessa fase o fungo causa necrose nos tecidos da planta, levando ao apodrecimento e morte desses tecidos (vassoura-seca).

A partir do micélio saprotrófico, em condições de umidade favoráveis, são formados os corpos de frutificação (basidiomas), os quais se desenvolvem sobre os tecidos infectados secos. Nestas estruturas encontram-se células especializadas, os basídios, nas quais ocorre a cariogamia e meiose, produzindo assim os basidiósporos, os quais são liberados no período noturno, visto que são sensíveis à luz ultravioleta [1]. Sua dispersão pode se dar pelo vento, água, e pelo transporte de tecidos contaminados. As condições climáticas da região produtora da Bahia favorecem a produção de esporos durante todo o ano. O ciclo da doença está representado na Figura 1.



Figura 1: Ciclo da vassoura-de-bruxa, evidenciando as fases de vassoura-verde, vassoura-seca e produção de basidiocarpos.

#### 1.2. Projeto genoma da vassoura-de-bruxa: uma revisão dos principais resultados

Em vista dos grandes prejuízos econômicos causados pela vassoura-de-bruxa na região produtora da Bahia e da ineficácia das medidas tomadas para a contenção da doença (tais como a poda fitossanitária e o uso de clones de cacau resistentes ao fungo), no ano 2000 foi iniciado, no Laboratório de Genômica e Expressão, o Projeto Genoma Vassoura-de-Bruxa (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura). Sob a coordenação do Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, o projeto tem como objetivo principal a compreensão da biologia de *M. perniciosa* e de sua interação com o cacau durante do desenvolvimento da vassoura-de-bruxa, a partir tanto da análise do genoma do fungo, quanto de estudos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos.

Entre os anos de 2000 e 2007, foi gerado um *draft* genômico com cobertura de aproximadamente 1,9 vezes o tamanho do genoma do fungo, estimado em 37,5 Mb. A análise desse *draft*, publicada no fim de 2008 [17], revelou a presença de 14072 genes preditos, resultando em uma densidade gênica de 0.36  $\pm$  0.05 gene/Kbp, número que está de acordo com a densidade gênica comumente descrita para fungos filamentosos. [18].

A análise dos genes preditos indica que *M. perniciosa* possui uma enorme capacidade de detoxificação. Aproximadamente 1,15% dos genes preditos correspondem às enzimas da família das citocromo P450 monooxigenases, as quais estão relacionadas à oxidação e hidrólise de vários compostos [19]. Esse alto número de citocromo P450 monooxigenases é comumente encontrado em fungos hemibiotróficos e necrotróficos [20, 21], podendo estar relacionados à detoxificação do ambiente durante a infecção do hospedeiro; além disso, podem estar ligados à síntese de metabólitos secundários, como toxinas e hormônios. Adicionalmente, *M. perniciosa* possui várias enzimas relacionadas à degradação de peróxido de hidrogênio, como catalases, superóxido dismutases e peroxidases. Durante a interação planta-patógeno, é comum que as plantas produzam grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) no intuito de conter o avanço da infecção [22]; dessa forma, tais enzimas produzidas pelo fungo poderiam estar protegendo-o de ROS.

Como já citado anteriormente, a presença do fungo gera um desbalanço hormonal na planta infectada. Uma questão amplamente discutida se trata da origem deste desbalanço: a presença do fungo estaria modificando a produção hormonal da planta e/ou o fungo seria capaz de produzir hormônios vegetais? A análise do genoma indica que *M. perniciosa* pode ter a capacidade de sintetizar hormônios vegetais. Foi detectado um gene com similaridade ao gene que codifica a enzima bifuncional copalil difosfato sintase-ent-caureno sintase (CPS-KS), específica da via de síntese de giberelinas em fungos [23], assim como giberelina desnaturases e oxidases. Além disso, foi detectada a presença de uma substância com massa molecular semelhante à giberelina comercial GA3 em amostras de sobrenadante de cultura do fungo na fase *biotrophic-like* através da análise por cromatografia de camada fina acoplada à espectrometria de massas, indicando fortemente que o fungo produz giberelina durante seu ciclo de vida [24]. A presença de genes com similaridade a nitrilases, as quais catalisam a produção de ácido indol-acético, a auxina mais abundante na natureza, indica a possibilidade de o fungo também estar produzindo este hormônio, o qual já foi detectado em basidiocarpos do fungo [14]. A produção de giberelina e auxina pelo fungo poderia estar relacionada à produção de frutos partenocárpicos e à hiperplasia dos tecidos, ambos sintomas clássicos da vassoura-de-bruxa [25].

O fungo possui em seu genoma um arsenal de genes ligados à colonização e destruição do hospedeiro. Várias enzimas ligadas à degradação da parede celular vegetal estão presentes, tais como: celulases e endoglucanases, ligadas à degradação de celulose; peroxidases dependentes de manganês

e lacases, responsáveis pela degradação da lignina; e pectina metilesterase, poligalacturonases e pectato liases, ligadas e degradação das cadeias pécticas. Em fungos hemibiotróficos, como *F. graminearum* and *M. grisea*, é comum a presença de muitas enzimas capazes de degradar a parede vegetal; tais fungos infectam dicotiledôneas com alta concentração de pectina em sua composição celular [20]. Além disso, *M. perniciosa* apresenta duas classes de enzimas de necrose: as Cerato-plataninas e as proteínas indutoras de necrose (NEPs). Duas das três possíveis proteínas homólogas a NEPs [26] e uma das cinco possíveis proteínas homólogas a Cerato-plataninas [27] foram expressas em *E. coli* e as proteínas recombinantes produzidas demonstraram intensa capacidade de necrose típicos da fase de tabaco. Tais proteínas provavelmente estão relacionadas aos sintomas de necrose típicos da fase de vassoura-seca.

*M. perniciosa* possui em seu genoma uma oxidase alternativa (AOX) tolerante a óxido nítrico (NO). O NO é uma molécula liberada por plantas como mecanismo de defesa contra patógenos, visto que ela é capaz de bloquear a cadeia respiratória [28]. Oxidases Alternativas são capazes de realizar o transporte de elétrons em situações em que a via principal encontra-se inibida, no entanto sem produção concomitante de ATP. A presença da AOX poderia explicar a ineficácia do uso de fungicidas à base de inibidores da cadeia respiratória principal específicos para fungos no controle da vassoura-de-bruxa [29].

Por fim, *M. perniciosa* é capaz de crescer em metanol como fonte única de carbono, fato que pode ser explicado pela presença de sequências com similaridade a metanol oxidases de leveduras metilotróficas; tais sequências são objeto de estudo da presente tese.

Entre o fim de 2007 e o início de 2011, o genoma de *M. perniciosa* foi expandido. Em 2007, uma colaboração entre nosso laboratório e o USDA (*United States Department of Agriculture*) resultou na expansão da cobertura do genoma de *M. perniciosa* para cerca de 8 vezes, através do sequenciamento no sequenciador 454 Life Sciences (Roche). Posteriormente, o genoma foi ampliado através do sequenciamento no Solexa Genome Analyzer (Illumina); atualmente, a cobertura do genoma do fungo está em cerca de 206 vezes (dados não publicados). A ampliação da cobertura do genoma permitiu a descoberta de vários novos genes, inclusive alguns relevantes para o desenvolvimento da presente tese de doutorado, a melhoria nos mecanismos de predição gênica, além de abrir caminhos para novos trabalhos visando o entendimento da interação entre o fungo e a planta durante a vassoura-de-bruxa, objetivo principal do projeto genoma.

Neste contexto de tentar entender a biologia do fungo durante a vassoura-de-bruxa, foi publicado em 2008 o primeiro trabalho comparando as diferenças no transcriptoma do fungo entre as fases *biotrophic-like* e necrotrófica, elucidando inúmeras diferenças em seu metabolismo [30]. Esse trabalho só foi possível com o desenvolvimento de um meio de cultura que mantivesse o fungo na fase *biotrophic-like in vitro* [16].

Durante a fase *biotrophic-like*, o fungo está sobre repressão catabólica de carbono e nitrogênio. Durante essa fase, o fungo expressa enzimas relacionadas ao metabolismo de pectinas, celulose e metanol (metanol oxidase); por outro lado, enzimas relacionadas ao ciclo de Krebs, glicólise, via das pentoses fosfato estão reprimidos. Quanto ao metabolismo de nitrogênio, no micélio *biotrophic-like* estão expressos genes ligados ao metabolismo de fontes de nitrogênio secundárias, como o GABA, além de várias aminoácido permeases; por outro lado, genes ligados ao metabolismo de fontes primárias de nitrogênio, como amônia e glutamina, estão reprimidos. Partindo do pressuposto que o micélio *biotrophiclike* possui as mesmas características que o micélio biotrófico *in planta*, tais resultados estão condizentes com a pouca disponibilidade de nutrientes que o micélio biotrófico tem a sua disposição, visto que ele ocupa o espaço apoplástico da planta caracterizado como relativamente pobre em nutrientes.

É também durante a fase *biotrophic-like* que o fungo expressa a maior parte de genes comumente relacionados a fatores de patogenicidade. Em vários fungos fitopatogênicos, a expressão de fatores de patogenicidade está correlacionada à condição de repressão catabólica de nitrogênio, o que está de pleno acordo com nossos resultados [31, 32].

Por fim, o fungo expressa genes com propriedades antifúngicas, como uma proteína similar a taumatina e uma toxina do tipo KP4, primordialmente no micélio saprotrófico. Tal micélio poderia lançar mão desses mecanismos para evitar a competição de outros fungos saprotróficos durante o processo infeccioso [17].

Esses dois amplos trabalhos acima citados servem atualmente de base para o desenvolvimento de vários projetos de iniciação científica, mestrado e doutorado em nosso laboratório, buscando aprofundarmos o conhecimento em questões que julgamos importantes para um maior entendimento sobre a biologia de *M. perniciosa* e sua interação com o cacaueiro. A presente tese de doutorado se encaixa nesse contexto, visto que os genes aqui estudados foram inicialmente encontrados em análises genômicas e/ou de sequências expressas.

#### 1.3. O metabolismo de metanol em fungos

Metanol oxidase (MOX) e catalase (CAT) são as enzimas relacionadas ao metabolismo do metanol. A enzima metanol oxidase catalisa a oxidação irreversível de um metanol ao seu aldeído correspondente e peróxido de hidrogênio, com o uso de oxigênio como aceptor de elétrons e FAD como cofator da reação. O peróxido de hidrogênio é decomposto pela enzima catalase, liberando água e oxigênio. A maioria das MOX estudadas possui maior atividade quando o álcool que serve de substrato para a reação é o metanol [33].

Em leveduras metilotróficas, como algumas espécies de *Hansenula, Pichia e Candida*, MOX e CAT estão localizadas nos peroxissomos, sendo primeiramente traduzidas no citoplasma e posteriormente importadas pelos peroxissomos. Essas organelas reconhecem um peptídeo sinal de três aminoácidos (S/A-K/R-L/M/F), denominado de PTS1 (*peroxisome targeting signal*), localizado em sua porção C-terminal, o qual sinaliza para a importação dessas enzimas [34]. Um segundo peptídeo sinal, PTS2, é encontrado na região N-terminal; no entanto, apenas uma minoria das proteínas peroxissomais até hoje descritas possuem essa sequência sinalizadora caracterizada [35].

Além de ser encontrada em leveduras metilotróficas, a atividade de MOX já foi detectada em vários fungos basidiomicetos, como *Poria contigua* [36], *Polyporus sp.* [37] e *Pleurotus ostreatus* [38]. O ascomiceto *Cladosporium fulvum*, um patógeno que ataca plantas de tomate [39], apresenta atividade de MOX peroxissomal tanto em condições de escassez de nutrientes *in vitro* quanto *in planta*. No entanto, o papel exato da MOX na patogenicidade por *C. fulvum* ainda não foi estabelecida, visto que essa enzima pode estar associada ao metabolismo de metanol ou etanol, ambos detectados em folhas de tomate [33]. Além disso, o *knockout* do gene que codifica metanol oxidase nesse fungo acarretou uma drástica redução em sua capacidade de infectar plantas de tomate; dessa forma, os autores concluíram que a metanol oxidase é um fator de patogenicidade utilizado por esse fungo durante a interação com seu hospedeiro.

Recentemente, a MOX do basidiomiceto *Gloeophyllum trabeum* foi descrita como sendo secretada para o meio extracelular e o metanol foi identificado como o substrato pelo qual possui maior afinidade. Em sua sequência não está presente o peptídeo PTS1 na porção C-terminal; por outro lado, a MOX desse fungo possui uma sequência C-terminal única quando comparada às MOX já descritas, à qual os autores atribuem ao fato de essa enzima ser secretada [40]. Esse basidiomiceto causa uma

doença chamada de "Brown Rot Decay of Wood", e a presença de uma MOX extracelular foi relacionada à possível demetilação de ligninas, a qual libera metanol. O basidiomiceto Phanerochaete chrysosporium, causador da doença "White Root of Wood", foi crescido in vitro em meio de cultura com glicose ou celulose como fontes de carbono [41]. Somente as culturas crescidas em celulose foram capazes de degradar lignina, e nessas culturas foi encontrada uma maior atividade de uma metanol oxidase e duas catalases. Ensaios de expressão gênica também detectaram um maior número de transcritos desses genes nessas condições. A metanol oxidase de *Phanerochaete chrysosporium* provavelmente é extracelular, devido à alta similaridade com a MOX de fungo *G. trabeum*. Também nesse caso, a presença dessa enzima foi associada ao metabolismo de ligninas.

Os fungos *Aspergillus terreus* e *A. ochraceus* tiveram suas MOX caracterizadas recentemente. Sua estrutura se assimila bastante às enzimas de leveduras metilotróficas. As MOX de leveduras tem o metanol como substrato preferencial; entretanto, a enzima produzida por *A. terreus* tem preferência por nheptanol [42] enquanto a produzida pelo *A. ocraceus* tem preferência por etanol [43]. O ascomiceto *Penicillium purpurescens* possui uma metanol oxidase cuja atividade é detectada quando o fungo é induzido por vários compostos, entre eles metanol, etanol, glicose e glicerol. Diferentemente das MOX de leveduras, cujas proteínas são formadas por 8 subunidades, este fungo possui uma enzima com apenas 6 subunidades [44].

Em leveduras metilotróficas, a enzima metanol oxidase peroxissomal tem papel fundamental no catabolismo de metanol, liberando formaldeído e peróxido de hidrogênio; o peróxido gerado deve ser rapidamente degradado, devido à sua toxicidade, por uma catalase também peroxissomal; há, dessa forma, uma corregulação das atividades da MOX e CAT peroxissomais. Consistente com esse fato, leveduras da espécie *Hansenula polymorpha* deficientes para a produção de catalase não conseguem sobreviver em meio contendo apenas metanol como fonte de carbono, devido ao acúmulo de peróxido de hidrogênio [45].

Experimentos realizados em nosso laboratório demonstraram que o micélio necrotrófico de *M. perniciosa* é capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como fonte única de carbono (Figura 2), fato que nos chamou a atenção, visto que apenas um número limitado de espécies das leveduras metilotróficas *Hansenula, Pichia, Cândida e Torulopsis* são descritas na literatura como sendo capazes de utilizar metanol como fonte única de carbono [46]. Como MOX é a enzima responsável pelo

metabolismo de metanol em fungos, realizamos uma busca em nosso banco de dados genômicos de sequências com similaridade a metanol oxidases, as quais, de fato, foram encontradas. Além disso, também foram encontradas sequências com similaridade a catalases.



Figura 2: Micélio necrotrófico de *M. perniciosa* (linhagem FA553) em meio mínimo de cultura suplementado com diferentes concentrações de metanol.

#### 1.4. Possível relação entre a degradação de pectina e o metabolismo de metanol em M.

#### perniciosa.

Nakagawa et al. [47] detectaram alta expressão de um gene que codifica metanol oxidase na levedura *Pichia methanolica*, quando esta era crescida em meio de cultura cujas únicas fontes de carbono eram pectina cítrica ou poligalacturonato. Associada à alta expressão do gene *mox*, foram detectadas atividades da enzima pectina metilesterase (PME) e outras enzimas peroxissomais. Por fim, foi observada uma proliferação do número de peroxissomos quando a levedura era crescida em meio com pectina. Em vista da existência neste fungo da enzima pectina metilesterase, a qual converte a pectina em ácido poligalacturonico liberando metanol, os autores concluíram que *P. methanolica* é capaz de utilizar o metanol proveniente das pectinas através do metabolismo peroxissomal. O mesmo grupo de pesquisadores já havia relatado resultados similares no estudo do metabolismo peroxissomal associado à degradação de pectina na levedura *Candida albicans*. Nesta levedura, a atividade da enzima metanol oxidase se mostrou mais elevada quando pectina com 90% de metilesterificação era usada no meio de cultura, ao invés de pectina não esterificada [48]. Por fim, estudos com o fungo filamentoso *Thermoascus* 

*aurantiacus* demonstraram uma maior da atividade das enzimas metanol oxidase e catalase quando o fungo era crescido em meio sólido contendo pectina do que quando glicose era utilizada [49].

Sabe-se que plantas são organismos que produzem metanol durante seu metabolismo. Obendorf *et al.* [50] sugerem que os radicais metil das pectinas são a principal fonte de metanol em sementes de soja. O processo de remoção dos radicais metil ocorre durante o crescimento e senescência de células vegetais, mas pode ser aumentado devido à ação da enzima pectina metilesterase de organismos patogênicos [51].

Recentemente, kang *et al.* [52] encontraram uma relação entre os níveis de metanol e os níveis de transcritos da enzima pectina metilesterase em folhas de arroz em senescência. A superexpressão do gene PME1 levou ao aumento da concentração de metanol presente nas folhas de arroz, enquanto seu silenciamento via interferência por RNA acarretou na redução desse composto.

Há evidências de que o fungo M. perniciosa seja capaz de degradar a pectina das células vegetais durante a infecção de plantas de cacau. A inspeção do banco genômico de M. perniciosa acusou a presença de uma sequência com alta similaridade a uma pectina metilesterase de outros fungos, a qual teria a capacidade de retirar os radicais metil das cadeiras pécticas, liberando metanol. Como o fungo possui em seu banco genômico várias outras pectinases, testamos o crescimento in vitro do micélio do fungo em meio de cultura contendo apenas pectina cítrica como fonte de carbono (Figuras 3A e 3B); o fungo se mostrou capaz de crescer nesse meio, indicando a atividade de enzimas que degradam pectina. Além disso, a pesquisadora Maria Carolina Scatolin do Rio, ex-aluna de pósdoutorado do nosso laboratório, detectou, em cortes histológicos de plantas de cacau infectadas por M. perniciosa, a presença de células de cacaueiro adjacentes a hifas do micélio biotrófico do fungo, cuja parede celular apresentava-se em processo degradativo (Figura 3C). Por fim, M. perniciosa também possui em seu genoma uma sequência com similaridade à oxaloacetato acetilhidrolase (oah); essa enzima tem sido descrita como responsável pela produção de oxalato em fungos, composto que está ligado ao processo de degradação da pectina. O oxalato é capaz de guelar íons cálcio presentes na estrutura péctica, formando cristais de oxalato de cálcio, reduzindo a estabilidade da parece celular vegetal [53].



**Figura 3**: **A e B**) Micélio necrotrófico de *M. perniciosa* (linhagem FA553) em meio mínimo de cultura: **A**) Meio mínimo sem fonte de carbono (controle) **B**) Meio suplementado com 1% de pectina cítrica como fonte de carbono; **C**) Microscopia de luz de tecidos de cacau infectados por *M. perniciosa* (as setas destacam hifas do fungo). O tecido foi corado com Azul de Toluidina. A parede celular das células de cacau aparece corada em roxo; a coloração em tom de rosa, nas partes adjacentes à parede, indica a degradação da mesma. Microscopia realizada pela Dra. Maria Carolina Scatolin do Rio.

#### 2. Hipótese de trabalho

A partir das evidências do crescimento do fungo em metanol como fonte única de carbono, e da presença de sequências como similaridade à *mox*, *cat*, *pme* e *oah* no genoma de *M. perniciosa*, traçamos uma hipótese inicial de trabalho, a partir da qual o fungo seria capaz produzir oxalato, o qual poderia quelar o cálcio das pectinas, as quais ficariam susceptíveis para a ação de enzimas hidrolíticas. Dentre essas enzimas, encontra-se a pectina metilesterase, que retira os radicais metil da cadeia péctica, liberando metanol. O metanol liberado seria metabolizado pelos peroxissomos, visto que essa é a via de degradação de metanol descrita na literatura, cujas duas enzimas principais, metanol oxidase (MOX) e catalase (CAT) foram identificadas no genoma de *M. perniciosa*. Adicionalmente, a planta gera peróxido de hidrogênio como uma defesa contra o patógeno, o qual provavelmente é degradado através de uma catalase extracelular.

#### 3. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi o estudo do metabolismo de metanol em *M. perniciosa*. Para isso, analisamos a possível produção de oxalato pelo fungo, caracterizamos a família das catalases presentes do genoma do fungo, e caracterizamos uma metanol oxidase produzida pelo fungo. Por fim, também realizamos uma análise preliminar do secretoma de *M. perniciosa*.

#### 4. Referências

- 1. Purdy LH, Schmidt RA: Status of cacao witches' broom: Biology, epidemiology, and management. *Annual Review of Phytopathology* 1996, **34**:573-594.
- Pereira JL, Ram A, Figuereido JM, L.C. dA: La primera aparición de la "Escoba de Bruja"en la principal región productora de cacao del Brasil. *Turrialba* 1989, 36(4):459-461.
- Stahel G: *Marasmius perniciosus* nov. spec., the cause of the krulloten disease of cacao in Suriname. *Bull* 1915, 33:1-27.
- Singer R: A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. *Lilloa* 1942, 8:441-534.
- Aime MC, Phillips-Mora W: The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 2005, 97(5):1012-1022.
- Evans HC: Pleomorphism in Crinipellis perniciosa, Causal Agent of Witches Broom Disease of Cocoa. Transactions of the British Mycological Society 1980, 74(JUN):515-523.
- Frias GA, Purdy LH, Schmidt RA: Infection Biology of *Crinipellis perniciosa* on Vegetative Flushes of Cacao. *Plant Disease* 1991, 75(6):552-556.
- Sreenivasan TN, Dabydeen S: Modes of Penetration of Young Cocoa Leaves by Crinipellis perniciosa. Plant Disease 1989, 73(6):478-481.
- Delgado JC, Cook AA: Nuclear Condition of Basidia, Basidiospores, and Mycelium of Marasmius perniciosus. Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique 1976, 54(1-2):66-72.
- Evans HC, Bastos CN: Basidiospore Germination as a Means of Assessing Resistance to Crinipellis perniciosa (Witches Broom Disease) in Cocoa Cultivars. Transactions of the British Mycological Society 1980, 74(JUN):525-536.
- Griffith GW, Hedger JN: The Breeding Biology of Biotypes of the Witches-Broom Pathogen of Cocoa, *Crinipellis perniciosa*. *Heredity* 1994, 72:278-289.
- 12. Silva SDVM, Matsuoka K: Histologia da Interação *Crinipellis perniciosa* em Cacaueiros Suscetível e Resistente à Vassoura-de-Bruxa. *Fitopatologia Brasileira* 1999, **24**(1):54-59.

- Orchard J, Collin HA, Hardwick K, Isaac S: Changes in Morphology and Measurement of Cytokinin Levels During the Development of Witches-Brooms on Cocoa. *Plant Pathology* 1994, 43(1):65-72.
- Kilaru A, Bailey BA, Hasenstein KH: *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiol Lett* 2007, 274(2):238-244.
- 15. Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella AWV, Schiavinato MA, Cascardo JCM, Pereira GAG: Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. Journal of Experimental Botany 2005, 56(413):865-877.
- Meinhardt LW, Bellato Cde M, Rincones J, Azevedo RA, Cascardo JC, Pereira GA: In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Curr Microbiol* 2006, 52(3):191-196.
- Mondego JM, Carazzolle MF, Costa GG, Formighieri EF, Parizzi LP, Rincones J, Cotomacci C, Carraro DM, Cunha AF, Carrer H *et al*: A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomics* 2008, 9:548.
- Kupfer DM, Reece CA, Clifton SW, Roe BA, Prade RA: Multicellular ascomycetous fungal genomes contain more than 8000 genes. *Fungal Genet Biol* 1997, 21(3):364-372.
- Gonzalez FJ, Nebert DW: Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 1990, 6(6):182-186.
- Cuomo CA, Guldener U, Xu JR, Trail F, Turgeon BG, Di Pietro A, Walton JD, Ma LJ, Baker SE, Rep M et al: The Fusarium graminearum genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 2007, 317(5843):1400-1402.
- 21. Doddapaneni H, Chakraborty R, Yadav JS: Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: evidence for gene duplications and extensive gene clustering. *BMC Genomics* 2005, **6**:92.

- 22. Apel K, Hirt H: Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2004, **55**:373-399.
- Tudzynski B, Holter K: Gibberellin biosynthetic pathway in Gibberella fujikuroi: evidence for a gene cluster. Fungal Genet Biol 1998, 25(3):157-170.
- 24. Ambrosio ABC, O. G. ; MILAGRES, H.M.S. ; G Pereira Avaliação da produção de giberelina pelo fungo Moniliophthora perniciosa causador da vassoura-de-bruxa. 54 Congresso Brasileiro de Genética 2008.
- 25. Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Kerckhoffs LH, Elliott RC: Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J* 2000, **21**(6):547-552.
- 26. Garcia O, Macedo JA, Tiburcio R, Zaparoli G, Rincones J, Bittencourt LM, Ceita GO, Micheli F, Gesteira A, Mariano AC *et al*: Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in Theobroma cacao. *Mycol Res* 2007, 111(Pt 4):443-455.
- 27. Zaparoli G, Cabrera OG, Medrano FJ, Tiburcio R, Lacerda G, Pereira GG: Identification of a second family of genes in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease in cacao, encoding necrosis-inducing proteins similar to cerato-platanins. *Mycol Res* 2009, **113**(Pt 1):61-72.
- Millar AH, Day DA: Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. FEBS letters 1996, 398(2-3):155-158.
- 29. Thomazella DP, Teixeira PJ, Oliveira HC, Saviani EE, Rincones J, Toni IM, Reis O, Garcia O, Meinhardt LW, Salgado I *et al*: The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New Phytol* 2012.
- 30. Rincones J, Scarpari LM, Carazzolle MF, Mondego JM, Formighieri EF, Barau JG, Costa GG, Carraro DM, Brentani HP, Vilas-Boas LA *et al*: Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Mol Plant Microbe Interact* 2008, **21**(7):891-908.

- Coleman M, Henricot B, Arnau J, Oliver RP: Starvation-induced genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are also induced during growth *in planta*. Mol Plant Microbe Interact 1997, 10(9):1106-1109.
- 32. Solomon PS, Oliver RP: The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*. *Planta* 2001, **213**(2):241-249.
- 33. Segers G, Bradshaw N, Archer D, Blissett K, Oliver RP: Alcohol oxidase is a novel pathogenicity factor for *Cladosporium fulvum*, but aldehyde dehydrogenase is dispensable. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2001, 14(3):367-377.
- 34. Waterham HR, Russell KA, Vries Y, Cregg JM: **Peroxisomal targeting, import, and assembly** of alcohol oxidase in *Pichia pastoris*. *The Journal of cell biology* 1997, **139**(6):1419-1431.
- Glover JR, Andrews DW, Subramani S, Rachubinski RA: Mutagenesis of the amino targeting signal of Saccharomyces cerevisiae 3-ketoacyl-CoA thiolase reveals conserved amino acids required for import into peroxisomes in vivo. The Journal of biological chemistry 1994, 269(10):7558-7563.
- Bringer S, Sprey B, Sahm H: Purification and properties of alcohol oxidase from *Poria* contigua. Eur J Biochem 1979, **101**(2):563-570.
- Janssen FW, Kerwin RM, Ruelius HW: Alcohol oxidase, a novel enzyme from a basidiomycete. *Biochem Biophys Res Commun* 1965, 20(5):630-634.
- 38. Sannia G, Limongi P, Cocca E, Buonocore F, Nitti G, Giardina P: Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et biophysica acta* 1991, **1073**(1):114-119.
- 39. Talbot NJ, Oliver RP, Coddington A: Pulsed field gel electrophoresis reveals chromosome length differences between strains of *Cladosporium fulvum* (syn. Fulvia fulva). *Mol Gen Genet* 1991, 229(2):267-272.
- Daniel G, Volc J, Filonova L, Plihal O, Kubatova E, Halada P: Characteristics of *Gloeophyllum* trabeum alcohol oxidase, an extracellular source of H2O2 in brown rot decay of wood. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73(19):6241-6253.

- Shary S, Kapich AN, Panisko EA, Magnuson JK, Cullen D, Hammel KE: Differential expression in *Phanerochaete chrysosporium* of membrane-associated proteins relevant to lignin degradation. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74(23):7252-7257.
- Kumar AK, Goswami P: Dissociation and reconstitution studies of a broad substrate specific multimeric alcohol oxidase protein produced by *Aspergillus terreus*. Journal of biochemistry 2009, 145(2):259-265.
- 43. Isobe K, Kato A, Ogawa J, Kataoka M, Iwasaki A, Hasegawa J, Shimizu S: Characterization of alcohol oxidase from *Aspergillus ochraceus* AlU 031. *The Journal of general and applied microbiology* 2007, **53**(3):177-183.
- Isobe K, Takahashi T, Ogawa J, Kataoka M, Shimizu S: Production and characterization of alcohol oxidase from *Penicillium purpurescens* AlU 063. *J Biosci Bioeng* 2009, 107(2):108-112.
- Aminova LR, Kyslikova E, Volfova O, Trotsenko YA: Characterization of catalase-negative mutants of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Folia microbiologica* 1991, 36(2):158-163.
- 46. Hazeu W, de Bruyn JC, Bos P: Methanol assimilation by yeasts. Arch Mikrobiol 1972, 87(2):185-188.
- 47. Nakagawa T, K. Yamada, et al: Pectin utilization by the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Microbiology* 2005, **151**(6):2047-2052.
- 48. Nakagawa T, T. Miyaji, et al: A methylotrophic pathway participates in pectin utilization by *Candida boidinii*. *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**(10): 4253-4257.
- 49. Ko HS, H. Fujiwara, et al.: Inducible production of alcohol oxidase and catalase in a pectin medium by *Thermoascus aurantiacus* IFO 31693. *J Biosci Bioeng* 2005, 99(3):200-209.
- Obendorf RL KJ, Gorecki RJ, Amable RA, Aveni MT Methanol accumulation in maturing seeds. J Exp Bot 1990, 41:489-495.
- 51. Gaffe J TD, Handa AK Pectin methylesterase isoforms in tomato (*Lycopersicon esculentum*)
  tissues. Effects of expression of a pectin methylesterase antisense gene *Plant Physiol* 1994, 105:199-203.

- 52. Kang K, Park S, Natsagdorj U, Kim YS, Back K: Methanol is an endogenous elicitor molecule for the synthesis of tryptophan and tryptophan-derived secondary metabolites upon senescence of detached rice leaves. *Plant Journal* 2011, 66(2):247-257.
- Maxwell DP, Lumsden RD: Oxalic Acid Production by Sclerotinia Sclerotiorum in Infected Bean and in Culture. *Phytopathology* 1970, 60(9):1395-&.

# **CAPÍTULO I**

## Production of Calcium Oxalate Crystals by the Basidiomycete

## Moniliophthora perniciosa, the Causal Agent of Witches' Broom

## **Disease of Cacao**

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

Current Microbiology 2008, 56(4):363-70

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

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

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

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

e-mail: goncalo@unicamp.br

J. A. F. da Silva

#### Introduction

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

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

M. C. S. do Rio  $\cdot$  B. V. de Oliveira  $\cdot$  D. P. T. de Tomazella  $\cdot$  G. A. G. Pereira  $(\boxtimes)$ 

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

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6157, Campinas 13083-970 São Paulo, Brazil

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

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

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

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

#### **Materials and Methods**

#### Fungal Strain and Growth Conditions

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

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

#### Light Microscopy

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

#### Electron Microscopy and Microanalysis

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



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

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

#### **Results and Discussion**

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

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

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



Fig. 2 Light microscopy of necrotrophic mycelium of *Moniliophthora perniciosa* without any treatment, showing crystalline structures associated with the hyphae. (A, B) Crystals of pyramidal shape of several sizes  $(2-20 \ \mu\text{m})$  were observed. (C, D) Bright crystalline

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



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

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

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

Some crystals present a bipyramidal shape, due to the tetragonal system of growth (weddelite; dihydrated  $CaC_2O_4.2H_2O$ ). (E) The crystals may cause rupture of the fungus cells. (F) Calcium oxalate crystals also grow in a monocyclic system (wewellite; monohydrate  $CaC_2O_4.H_2O$ )

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

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

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



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

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

elements.

present in the construction of the microscope chamber. Beyond this, the electron beam has penetration greater than the sample dimensions, leading to the measurement of elements present on the supporting substrate. In this work the support was made by common glass slides, which are composed of silica (SiO<sub>2</sub>) and silicates of alkaline and alkaline earth metals (essentially Na, Mg, and Ca). For silicon, x-rays generated at both position  $S_a$  and position  $S_b$ showed intensities of 21546 and 41137, respectively, which confirms that the silicon signal is due to the glass substrate. The beam penetration into the supporting substrate is less at position  $S_a$ , because the beam must pass through the crystal, which lowers the intensity at this point.

The possibility exists that the samples were formed by calcium carbonate, which has the same composition. However, this compound crystallizes as very small spheres, which were not observed in our analysis. In contrast, COCs are known to present pyramidal shapes, as a consequence of growing in the tetragonal system (weddellite; dihydrated  $CaC_2O_4.2H_2O$ ). This structure was observed in our samples (Figs. 2 and 3).

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

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

| Moniliophthora<br>Coprinopsis<br>Botryotinia<br>Aspergillus | HRKGPVDLTCLRRGNFGKILSANGKFLGERPFNGTRQFFCPPVKENWVVFLFKKFSMAPN<br>MSP-<br>MSP-   | 60<br>3                  |
|---|--|--------------------------|
| Moniliophthora<br>Coprinopsis<br>Botryotinia<br>Aspergillus | LHHKGPSSVFVLGPGMGRIRNPHLQFVKSILKAMIFIPNFRSNLSSHFPTQLTFSTDLSS<br>SIDFFPHIEEASSSAPSFMSVSIPKDD<br>MPAYSDKVMLTFNNTVKQTTGFES<br>MSASEVPYPFQFDSLRTHEPGVGPQDGTTQD<br>*  | 120<br>31<br>24<br>31    |
| Moniliophthora<br>Coprinopsis<br>Botryotinia<br>Aspergillus | QPIRRHGTRTRLPLRRKRCRQRSELCDRGSSADPGSQCLLQPSSGPE-ELSRGASLRPLD<br>APDAFRDTPSPSPSPTLPTTSLDGVYYNARLDPKNFLHGPLSPN-PATRLRQML<br>GATKLKNMLRDSNELIVCPGVYDG   | 179<br>84<br>48<br>74    |
| Moniliophthora<br>Coprinopsis<br>Botryotinia<br>Aspergillus | KTSSDACSPWYCRTNFLLPFFFFFLQHLMSRLSGRSWYLWYQCPMRSRSWLMSLPKVKTY<br>ARPGIVVAPGICDGISARCAIEAG<br>ISARVALQVG<br>LSSRLVEEAG   | 239<br>108<br>58<br>84   |
| Moniliophthora<br>Coprinopsis<br>Botryotinia<br>Aspergillus | RPAFSWHTNLLNSGAATTASRLGQPDLAIATMNDFAEVRSSHHGTFSLTQSFPAGQMVSS     FTCLYQSGAATTASRLGQPDLAIATLNDFVGAQQMVCS     FPALYMTGAGTTASRLGMADLGIAQLSDMKDHAEMIAN     FPMVFLAGYAVASS-YGLPDTGYIAMAEMCDKIRDA     ::*    :::   | 299<br>146<br>96<br>119  |
| Moniliophthora<br>Coprinopsis<br>Botryotinia<br>Aspergillus | LDPS-VPVIADADTGEATLLIDINSSLMPQFTSRFGGPANVARTVKTYARAGIAGLHIED<br>LDPT-MPVIADADTGFGGPAMIARTVTQYARAGVAALHIED<br>LDPYGPPLIADMDTGYGGPLIIDKAVKSYIRAGVAGFHIED<br>VRQVSVPVMADGDTGYGSPLNVKRTVESFAAAGAAGVMIED<br>: *::** *** : :* : ** * ***                                       | 358<br>186<br>137<br>160 |
| Moniliophthora<br>Coprinopsis<br>Botryotinia<br>Aspergillus | QVQTKRCGHLMGKQVVSREEFLTRIRAAVLARDSIPGGSDFVIIGRTDSAQVLVLLIEKS<br>QVQTKRCGHLLGKQVVSRDEFVTRVRAAVLARDSIPGGSDFVIIARTDSAQVL<br>QIQNKRCGHLQGKKVVPAEEYYMRIRAAKAAKEAMMSDIVLIARTDALQQL<br>QQWPKRCGHTKGKSVVSREEAFARIKAACDARNQGLDIFILARTDALIHG<br>* ***** **.**. :* *::** *: *:.***: | 418<br>239<br>188<br>210 |
| Moniliophthora<br>Coprinopsis<br>Botryotinia<br>Aspergillus | PDIFSSLLRGMDEAITRLKLAAAAGADVCFIEGVRSKELLESTVQALAPTPVLVNVISGG<br>GMEEAVYRLKLAADVGADVCFIEGVKTKELLESTVAALAPKPVLVNVISGG<br>GYDECIKRLKVAREMGADVGLLEGYTSKEMAAKTVKEFAPWPILLNMVENG<br>WDEAMSRAQEFRRLGVDAVFVEALPDREAMKRCVQEVG-IPIFANIIEGG<br>:*.: * : *.*. :* * *: * *:: *:*      | 478<br>290<br>239<br>259 |
| Moniliophthora<br>Coprinopsis<br>Botryotinia<br>Aspergillus | LTPPFTYHEAEQMGAKIISGCSISGI<br>LTPSFTTLEAEQMGAKIIIFSLVSSVAMVHACRNAMQLLKKTGTDFTSAQGMDPKAFFEV<br>STPIITTKEAQEMGFRIMIFSFAALAPAYLAIQETFLRLKRDGVVGTPKN-LTPKALFDV<br>KTENLSAKDLAQLGFCAVAYPWTLVAAHLRGLREALDGLKRSMTVGAPPMILTYDQVCEG<br>* :: : ::* :                               | 504<br>350<br>298<br>319 |
| Moniliophthora<br>Coprinopsis<br>Botryotinia<br>Aspergillus | MGLNEVVEFDAKAGGNAFATI- 371<br>CGLKDSIVVDTTAGGGAFADGV 320<br>VGFNEYWDLEERYKYE 335   |                          |

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

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

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

369





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

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

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

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

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

#### References

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

- Goldstein J, Newbury D, Joy D, et al. (2003) Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. Vol 3. Springer Science+Business Media, New York
- Griffith GW, Nicholson J, Nenninger A, et al. (2003) Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. New Zeal J Bot 41:423–435
- Guimaraes RL, Stotz HU (2004) Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. Plant Physiol 136:3703–3711
- Han Y, Joosten HJ, Niu WL, et al. (2007) Oxaloacetate hydrolase, the C-C bond lyase of oxalate secreting fungi. J Biol Chem 282:9581–9590
- Kesarwani M, Azam M, Natarajan K, et al. (2000) Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*—molecular cloning and its overexpression to confer resistance to fungal infection in transgenic tobacco and tomato. J Biol Chem 275:7230–7238
- Kubicek CP, Schreferlkunar G, Wohrer W, et al. (1988) Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*. Appl Environ Microbiol 54:633–637
- Lenz H, Wunderwald P, Eggerer H (1976) Partial purification and some properties of oxalacetase from *Aspergillus niger*. Eur J Biochem 65:225–236
- Maximova SN, Marelli JP, Young A, et al. (2006) Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. Planta 224:740–749
- Meinhardt LW, Bellato CD, Tsai SM (2001) SYBR (R) Green I used to evaluate the nuclei number of fungal mycelia. Biotechniques 31:42–46
- Munir E, Yoon JJ, Tokimatsu T, et al. (2001) A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. Proc Natl Acad Sci USA 98:11126–11130

- Pedersen H, Christensen B, Hjort C, et al. (2000) Construction and characterization of an oxalic acid nonproducing strain of *Aspergillus niger*. Metab Eng 2:34–41
- Pennman D, Britton G, Hardwick K, et al. (2000) Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches broom disease of cocoa. Mycol Res 104:671–675
- Purdy LH, Schmidt RA (1996) Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. Annu Rev Phytopathol 34:573–594
- Rincones J, Meinhardt LW, Vidal BC, et al. (2003) Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. Mycol Res 107:452–458
- Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, et al. (2005) Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. J Exp Bot 56:865–877
- Sexton AC, Cozijnsen AJ, Keniry A, et al. (2006) Comparison of transcription of multiple genes at three developmental stages of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. FEMS Microbiol Lett 258:150–160
- Silva SDVM, Matsuoka K (1999) Histologia da interação *Crinipellis perniciosa* em cacaueiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. Fitopat Bras 24:54–59
- 30. Tokimatsu T, Nagai Y, Hattori T, et al. (1998) Purification and characteristics of a novel cytochrome c dependent glyoxylate dehydrogenase from a wood-destroying fungus *Tyromyces palustris*. FEBS Lett 437:117–121
- Whitney KD, Arnott HJ (1986) Calcium oxalate crystals and basidiocarp dehiscence in *Geastrum saccatum* (Gasteromycetes). Mycologia 78:649–656
- Whitney KD, Arnott HJ (1987) Calcium oxalate crystal morphology and development in *Agaricus bisporus*. Mycologia 79:180–187
# **CAPÍTULO II**

# Análise da expressão das catalases de Moniliophthora perniciosa e

# seu possível papel na defesa antioxidante

Bruno V de Oliveira, Paulo José PL Teixeira, Marcelo F. Carazzolle, Johana Rincones; Gonçalo AG Pereira.

## Resumo

A análise do genoma de M. perniciosa revelou a presença de 5 sequências codantes para catalases. A expressão relativa dos genes que codificam catalase foi analisada, por Real-time PCR, no micélio necrotrófico crescido in vitro, mediante a presença de peróxido de hidrogênio no meio de cultura. Os genes Mp catA, Mp catB e Mp catC tiveram sua expressão aumentada na presença de peróxido em relação ao controle; não foi possível detectar a expressão dos genes Mp catD e Mp catE. A expressão desses genes também foi analisada, por seguenciamento de RNA em larga escala (RNAseg), nas diferentes fases do ciclo de vida de M. perniciosa. O gene Mp catD tem uma expressão quase inexistente em todas as fases do ciclo de vida do fungo analisadas. Já o gene Mp catE somente é expresso em esporos e basidiomas, o que está de acordo com a existência, na literatura, de várias catalases "específicas de esporos" descritas para vários fungos. Os genes Mp catA, Mp catB e Mp catC estão expressos em todas as fases do ciclo de vida de M. perniciosa. A expressão desses genes também foi avaliada in planta, tanto por Real-time PCR guanto por RNAseg. Para isso, plântulas de cacau foram infectadas com esporos de *M. perniciosa*, sob condições controladas, em casa de vegetação. Plantas em diferentes pontos da progressão da vassoura-de-bruxa foram coletadas. Os genes Mp\_catA, Mp\_catB e Mp\_catC estão expressos em todos os pontos analisados, enquanto os genes Mp\_catD e Mp\_catE não estão expressos in planta, nos estágios da doenca analisados. M. perniciosa tem a capacidade de manter seu crescimento intacto mesmo na presenca de altas concentrações de peróxido de hidrogênio. Essa alta tolerância a peróxido pode ser uma das razões para o sucesso da infecção e pelo estabelecimento da vassoura-de-bruxa e pode estar diretamente relacionada às catalases produzidas pelo fungo.

## 1. Introdução

O peróxido de hidrogênio é uma das espécies reativas de oxigênio (ROS) mais abundantes na natureza, sendo produzido principalmente como um subproduto da cadeia transportadora de elétrons da respiração e como produto de reações enzimáticas, principalmente oxidases. Níveis excessivos de peróxido de hidrogênio são danosos para a grande maioria das células; dessa forma, uma remoção rápida e eficiente desse composto é essencial para o metabolismo de organismos aeróbicos. Dessa maneira, esses organismos lançam mão de várias enzimas capazes de degradar peróxido de hidrogênio no intuito de se manter a concentração desse composto em níveis toleráveis para a célula. Dentre essas enzimas, encontram-se as catalases, enzimas capazes de degradar o peróxido de hidrogênio, liberando água e oxigênio.

Catalases têm sido descritas em diversos tipos de organismos, incluindo animais, plantas, bactérias e fungos. As catalases produzidas por fungos formam um diverso grupo de enzimas no que diz respeito a sua estrutura, localização e funções metabólicas [1].

O fungo *Neurospora crassa* possui quatro catalases em seu genoma, com características distintas. O gene *cat-1*, altamente expresso nos conídios do fungo, e o gene *cat-3*, expresso em condições de estresse fisiológico, pertencem à família gênica das catalases produzidas por fungos filamentosos [2]; o gene *cat-2*, altamente expresso em conídios e hifas aéreas, pertence à família das catalase-peroxidases bacterianas [3]; por fim, o gene *cat-4* ainda não foi caracterizado [4]. O fungo *Aspergillus nidulans*, por sua vez, apresenta apenas três genes que codificam catalases. O gene *cat-A* é altamente expresso nos conídios [5]; a expressão do gene *cat-B* é detectada nas hifas do fungo [6]; o gene *cat-C*, provavelmente codante para uma catalase peroxissomal, possui pouca variação em sua expressão sob diversas condições testadas [7]; os autores sugerem que os diferentes genes que codificam catalases em *A. nidulans* exercem suas funções em diferentes estágios de seu ciclo de vida [8]. Por fim, os dois genes que codificam catalases no fungo *Cladosporium fulvum* são altamente divergentes: o gene *cat-A*, altamente expresso nos esporos do fungo, pertence à família de catalases peroxissomais presentes em leveduras e mamíferos; já o gene *cat-B*, cuja expressão é detectada em resposta a peróxido de hidrogênio exógeno, pertence à família de catalases sintetizadas por bactérias e fungos filamentosos [9].

As funções exercidas pelas catalases nas diferentes espécies de fungos também são diversas. Em leveduras metilotróficas, como *Hansenula polimorfa e Pichia pastoris*, a catalase peroxissomal é necessária para metabolizar o peróxido gerado pelo metabolismo de metanol. Em fungos fitopatogênicos, as catalases têm sido associadas à proteção do fungo contra o peróxido de hidrogênio liberado pela planta como defesa contra o mesmo [10]; no entanto, em alguns casos, como no fungo fitopatogênico *Cladosporium fulvum*, a enzima catalase parece também estar associada à decomposição do peróxido endógeno liberado devido à atividade da enzima peroxissomal metanol oxidase [9]. Apesar da atividade de catalase ser detectada na maioria das interações patogênicas entre plantas e fungos, o papel exato de cada isoforma dessa enzima durante o processo infeccioso é de difícil descrição, já que a presença de vários parálogos do gene dificulta os estudos de genoma funcional por construção de mutantes *knockout* para tais genes [11].

Quanto à estrutura, as catalases são comumente divididas em 2 grupos: as grandes e as pequenas. As catalases grandes possuem entre 680 e 750 aminoácidos em sua sequência e sua proteína funcional geralmente é formada por um homo-oligomêro, geralmente tetrâmeros ou hexâmeros. Já as catalases pequenas são geralmente monoméricas e possuem cerca de 480 a 550 aminoácidos em sua sequência. Todas as catalases possuem o domínio conservado catalase (cd00328), responsável por sua atividade catalítica. O domínio GATase1\_catalase (cd03132) é encontrado somente na porção C-terminal de várias catalases grandes e seu papel está associado à oligomeirização para formação da proteína funcional, composta por tetrâmeros na maioria dos casos [11].

A análise do genoma de *M. perniciosa* revelou a presença de 5 sequências com similaridade a catalases de outros fungos. Visto que durante a interação planta-patógeno uma das formas de a planta tentar conter a infecção é a produção de altas concentrações de peróxido de hidrogênio, as catalases produzidas por *M. perniciosa* podem representar uma importante forma de o fungo se proteger desse peróxido de hidrogênio exógeno.

## 2. Objetivos

O objetivo dessa etapa do trabalho foi o estudo dos genes que codificam catalases em *M. perniciosa*, através da análise de suas sequências, da predição de localização subcelular e da análise de sua expressão *in vitro* e *in planta*.

## 3. Material e métodos

## 3.1. Isolado de M. perniciosa

Para todos os experimentos realizados nessa etapa do trabalho, foi utilizado o isolado FA553 de *M. perniciosa* [12], o qual é derivado da linhagem CP02 [13], a qual foi utilizada para o sequenciamento do genoma do fungo. Esse isolado é mantido em nosso laboratório em meio MYEA (malte, extrato de levedura, ágar) a uma temperatura de 28°C.

# 3.2. Análise da expressão *in vitro* dos genes que codificam catalases mediante indução com peróxido de hidrogênio

Para a realização desses experimentos, o micélio necrotrófico de *M. perniciosa* foi crescido por 7 dias em meio malte, sob uma agitação de 150 rpm a 28°C. Após o crescimento, esses micélios foram transferidos para: 1) um novo meio malte (controle); 2) o mesmo meio contendo 20 mM de peróxido de hidrogênio. Os períodos de incubação foram de 90 e 180 minutos.

Após o período de incubação do fungo, foi realizada a extração de RNA total através do *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen). A seguir, o RNA total extraído foi quantificado no *Nanodrop<sup>TM</sup> 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific), tratado com *RQ1 RNAse-free DNAse* (Promega) e em seguida utilizado para a síntese de cDNA. Tal síntese foi realizada através da transcriptase reversa *Superscript<sup>TM</sup> II* (Invitrogen) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

A partir do cDNA sintetizado, foram realizados os experimentos de *Real-time* PCR, de forma a quantificar a expressão relativa dos genes estudados. A quantificação da expressão foi realizada detectando a fluorescência do reagente *SYBRGreen* (Applied Biosystems), utilizando a plataforma *Step One Plus* (Applied Biosystems). O programa de amplificação utilizado foi formado por um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 20 segundos a 55 °C e 60 segundos a 60 °C. Após cada ciclo de extensão, o aparelho media a fluorescência da amostra. Terminada a amplificação dos fragmentos, foi iniciada a etapa para a formação da curva de *melting*, composto por um ciclo a 95 °C por 15 segundos, seguido por uma rampa entre 60 °C e 95 °C, com leituras do nível de fluorescência a cada aumento de 0,3 °C. A tabela 1 mostra os primers utilizados nas amplificações.

**Tabela 1**: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de *Real-time* PCR. Todas as reações foram realizadas utilizando-se a temperatura de anelamento de 55º, a qual se mostrou eficiente para todos eles.

|         | DIRETO (5' - 3')       | REVERSO (5' - 3')      |
|---------|------------------------|------------------------|
| Mp_catA | ATAGAGGTATCCCTCGCTCGTA | TGGAACTTGACAAAGTGTCGTT |
| Mp_catB | AATCGTCCTCATGTACCAGTCC | TATTGAGTGTGTTCGGGGTGTA |
| Mp_catC | TCCCTGTTAACGCTCCACTC   | GCGATGCTGCTCTGGTAGTT   |
| Mp_catD | TGGCACTTTAGGACTCTCCAA  | TGAACAAATCCTGACGGTGA   |
| Mp_catE | CGAGTTATCCCACGTCCAAT   | GTTGATCGCCAATGCAACAC   |
| Mp_act  | CCCTTCTATCGTCGGTCGT    | AGGATACCACGCTTGGATTG   |

A análise dos dados foi realizada segundo o método proposto por Pfaffl *et al.* [14]. Para isso, foram geradas curvas-padrões para todos os genes estudados, de modo que a eficiência de sua amplificação foi calculada. A partir desses dados, foram calculados os valores de expressão relativa de todos os genes em todas as condições. O fungo crescido em meio malte foi escolhido como condição normalizadora do experimento (controle); o gene codificante para β-actina (Mp\_act) foi utilizado como normalizador da expressão, visto que sua expressão se mantém relativamente constante nas condições analisadas.

# 3.3. Análise da expressão dos genes que codificam catalase no ciclo de vida de *M.* perniciosa

Foi realizada uma análise de expressão gênica por sequenciamento de RNA em larga escala (RNAseq) em cinco pontos do ciclo de vida de *M. perniciosa*: esporos não germinados, esporos germinados, basidiomas, micélio *biotrophic-like* e micélio necrotrófico. Para isso, o RNA de cada uma dessas fases foi extraído através do *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen), quantificado no *Nanodrop<sup>TM</sup> 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) e utilizado para a confecção das bibliotecas de transcriptoma.

As bibliotecas foram preparadas segundo instruções fornecidas pela Illumina. Basicamente, o RNAm foi purificado a partir de 1 a 10µg de RNA total utilizando-se *Sera-Mag Magnetic Oligo(dT) Beads* (Thermo Scientific, EUA), e então fragmentado na presença de cátions divalentes sob elevadas temperaturas. Após isso, o RNAm clivado foi copiado na primeira fita de cDNA utilizando-se *random hexamer primers* e a enzima transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen, EUA). A segunda fita de cDNA foi sintetizada utilizando as enzimas DNA polimerase I e RNAse H. Em seguida, as enzimas T4 DNA polimerase e Klenow DNA polimerase foram utilizadas para obtenção de extremidades abruptas do

cDNA. Uma adenina foi então adicionada à extremidade 3' das moléculas de cDNA utilizando-se a enzima Klenow exo-. Em seguida, realizou-se a ligação de adaptadores (que possuem uma timina *overhang*) para amplificação e sequenciamento do cDNA. Os adaptadores não ligados foram separados através de eletroforese e purificação de fragmentos de 200 a 300 pares de base, correspondentes ao cDNA ligado aos adaptadores. Finalmente, as bibliotecas foram enriquecidas através de 15 ciclos de PCR utilizando-se primers complementares às sequências dos adaptadores. A concentração e a qualidade das bibliotecas foram aferidas utilizando-se o fluorômetro Qubit (Invitrogen, EUA) e o sistema de eletroforese capilar Experion (Bio-Rad, EUA). Para cada biblioteca, foram realizados 36 ciclos de sequenciamento *single ends* utilizando-se o equipamento *Genome Analyzer IIx* (Illumina, EUA).

As sequências geradas foram montadas pela equipe de bioinformática do LGE. O sequenciamento das bibliotecas foi realizado pelo aluno de doutorado Paulo José Teixeira, em parceria com a *facility* de sequenciamento da Universidade da Carolina do Norte (EUA).

## 3.4. Análise da expressão in planta dos genes que codificam catalase

## 3.4.1. Obtenção de esporos para a infecção de plântulas de cacau

Os esporos de *M. perniciosa* foram obtidos segundo o método desenvolvido por Teixeira e colaboradores, em nosso laboratório (manuscrito em preparação).

Recipientes de vidro com capacidade para aproximadamente 100 mL de volume foram preenchidos com 5 mL de meio ágar-água 2%, sobre o qual foram posicionados 2 galhos secos de cacau. Os recipientes foram fechados com um tampão de gaze e autoclavados por 1 hora. Após a polimerização do meio, 2 *plugs* de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de raio de uma cultura de micélio necrotrófico de *M. perniciosa* foram adicionados nas bases dos galhos. Esses recipientes foram então estocados em nossa sala de esterilização por cerca de 30-35 dias. Durante esse período, o micélio cresce sobre os galhos de cacau e a água do meio de cultura vai sendo absorvida. Quando o meio de cultura seca completamente, inicia-se a rega dos galhos, a cada 3 dias, até o aparecimento de cogumelos (Figura 1), o que costuma ocorrer durante cerca de 30 dias após o inicio das regas.



Figura 1: Produção de basidiocarpos de *M. perniciosa*, *in vitro*, para a obtenção de esporos.

A partir dos basidiocarpos produzidos, os esporos foram coletados e armazenados em biofreezer (-80 °C), em uma solução contendo 20% de glicerol, até o momento correto para o inóculo das plântulas de cacau.

## 3.4.2. Cultivo de plântulas de cacau em casa de vegetação

Frutos de cacau tiveram suas sementes extraídas e delas toda a mucilagem foi removida. Cada semente (aproximadamente 150 no total) foi utilizada para o inóculo de um saco plástico contendo aproximadamente 1 kg de terra e vermiculita na proporção de 2:1. As plântulas originadas a partir do plantio das sementes cresceram por cerca de 3 meses em casa de vegetação com condições controladas: temperatura variando entre 25 e 28 °C e umidade relativa acima de 80 %, mimetizando as condições climáticas das regiões produtoras de cacau.

## 3.4.3. Infecção de plântulas com esporos de M. pernciosa

Após cerca de 3 meses de crescimento, as plântulas atingiram o momento ideal para serem infectadas. Nessa época, foi realizado o corte do meristema apical das mesmas para induzir o brotamento dos meristemas laterais (perda da dominância apical). Essa medida é utilizada para garantirmos uma alta taxa de infecção, visto que esporos de *M. pernciosa* infectam tecidos meristemáticos jovens e em alta atividade.

Três semanas após o corte dos meristemas apicais, as plântulas foram infectadas. Para isso, todas elas foram submetidas a uma câmara úmida por 24 horas; um saco plástico umedecido foi colocado sobre as plântulas para induzir a abertura dos estômatos. As plântulas foram então infectadas com 30 μL de uma solução de esporos do isolado FA553 de *M. perniciosa*, cuja concentração se encontrava na casa de 10<sup>5</sup> esporos/mL. Após a infecção, a câmara úmida foi mantida por 2 dias. Das 150 plantas, 75% foram infectadas e 25% não foram, sendo esse último grupo de plantas o controle do experimento.

As coletas de plantas infectadas foram realizadas de duas maneiras diferentes durante a progressão da vassoura-de-bruxa.

Em um primeiro momento, foram coletados quatro pontos distintos da progressão da doença: fase assintomática (aproximadamente 16 dias após a infecção, DAI), vassoura-verde 1 (25 DAI), vassoura-verde 2 (32 DAI) e sintomas de necrose (45 DAI). Sempre eram coletadas três plantas infectadas em cada ponto e uma não infectada com a mesma idade (controle). As plantas coletadas tiveram o ramo infectado (vassoura) congelados em nitrogênio líquido e armazenado em biofreezer até o momento da extração de RNA. Essas plantas foram utilizadas para ensaios de expressão gênica por *Real-time* PCR.

Em um segundo momento, as plantas foram coletadas e outros quatro pontos: vassoura-verde (30 DAI), necrose 1 (45 DAI), necrose 2 (60 DAI) e vassoura-seca (90 DAI). Novamente, as plantas coletadas tiveram o ramo infectado (vassoura) congelados em nitrogênio líquido e armazenado em biofreezer até o momento da extração de RNA. Essas plantas foram utilizadas para ensaios de expressão gênica por RNAseq. Esse experimento foi realizado pelo aluno de doutorado Paulo José Teixeira.

A extração de RNA foi realizada através do protocolo idealizado por Barau *et al.*, em nosso laboratório (manuscrito em preparação). A síntese de cDNA e os ensaios de *Real-time* PCR foram realizados como descrito no item 3.2, e o gene codificador para  $\beta$ -tubulina foi utilizado como normalizador (forward: 3'-GACCAACAGCTTGTCTTTGC-5' e reverse: 3'-GACATTGCAAACATCGAGGA-5'). Os ensaios de RNAseq foram realizados como descritos no item 3.3.

## 4. Resultados

## 4.1. Análise das sequências das catalases de M. perniciosa

A análise do banco de dados genômicos de *M. perniciosa* revelou a presença de 5 sequências com similaridade a catalases, as quais foram denominadas de *Mp\_catA* a *Mp\_catE*. A tabela 2 mostra o tamanho da sequência codante de cada uma delas (CDS), assim como o resultado de Blast contra a base de dados NR. Todas elas possuem o domínio conservado catalase (cd00328), responsável por sua atividade catalítica, e o domínio GATase1\_catalase (cd03132), responsável por sua oligomerização (dados não mostrados).

| Gene    | CDS (kB) | Organism (1 <sup>st</sup> hit) | e-value |
|---------|----------|--------------------------------|---------|
| Mp_catA | 2211     | Postia placenta                | 0       |
| Mp_catB | 2160     | Myceliophthora thermophila     | 0       |
| Mp_catC | 1581     | Laccaria bicolor               | 0       |
| Mp_catD | 2184     | Myceliophthora thermophila     | 0       |
| Mp_catE | 2157     | Myceliophthora thermophila     | 0       |

Tabela 2: Análise das sequências das catalases de M. perniciosa

Também foi realizada uma predição da localização subcelular para cada uma das 5 catalases, através dos programas Psort (http://psort.hgc.jp) e SignalP (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP), o qual detecta possíveis sinais de secreção para meio extracelular. O resultado dessa predição está mostrado na tabela 3.

| Gene    | Psort Prediction                                  | SignalP |
|---------|---|---------|
| Mp_catA | cyto: 12.0, pero: 7.0, mito: 5.0, nucl: 3.0       | no      |
| Mp_catB | extr: 23.0, mito: 3.0                             | yes     |
| Mp_catC | cyto: 12.0, cyto_nucl: 10.0, nucl: 6.0, pero: 6.0 | no      |
| Mp_catD | extr: 21.0, E.R.: 4.0                             | yes     |
| Mp_catE | extr: 26.0  | yes     |

Tabela 3: Predição da localização subcelular das catalases de M. perniciosa através dos programas Psort e SignalP.

Como pode ser observado na tabela 3, *M. perniciosa* possui três catalases preditas como sendo secretadas para o meio extracelular (B, D e E) e duas preditas como sendo provavelmente citosólicas (A

e C). De fato, é possível detectar a atividade extracelular de catalase em sobrenadantes da cultura de *M. perniciosa*, mediante a adição de peróxido de hidrogênio. A formação de bolhas, como mostrado na figura 2, é um indício da atividade de catalase extracelular.



Figura 2: Detecção da atividade de catalase extracelular em *M. perniciosa*, mediante adição de peróxido de hidrogênio. 1) meio malte (controle) e 2) sobrenadante de uma cultura necrotrófica de *M. perniciosa*.

# 4.2. Análise da expressão *in vitro* dos genes que codificam catalases mediante indução com peróxido de hidrogênio

Todos os genes que codificam catalase tiveram sua expressão analisada em resposta a peróxido de hidrogênio no micélio necrotrófico de *M. perniciosa*. Após do crescimento do micélio necrotrófico, o micélios foram transferidos para: 1) um novo meio malte (controle); 2) meio malte contendo 20 mM de peróxido de hidrogênio. Os períodos de incubação foram de 90 e 180 minutos.

Antes da realização dos ensaios de *Real-time* PCR, realizamos amplificações com *primers* para todos os genes para verificarmos sua especificidade, além de padronizarmos a temperatura de anelamento a ser utilizada. O resultado dessas amplificações, realizadas com uma temperatura de anelamento de 55 °C, escolhida para a realização de todo o experimento por ser adequada a todos os *primers* utilizados, está mostrado na figura 4. Como podemos observar, todas as amplificações resultaram em transcritos de 100-105 pB específicos.



**Figura 3**: Amplificações de fragmentos dos genes utilizados nos ensaios de expressão gênica. 1. *Mp\_catA*; 2. *Mp\_catB*; 3. *Mp\_catC*; 4. *Mp\_act*. O marcador de peso molecular utilizado foi o 100 pB O'gene ruler (Fermentas), em gel de agarose 2%.

A especificidade de todos os *primers* utilizados também foi analisada através de curvas de *melting* realizada após o fim dos ciclos de amplificação em tempo-real, as quais estão mostradas na Figura 4.



Figura 4: Curvas de *melting* para os genes analisados. A. *Mp\_catA*; B. *Mp\_catB*; C. *Mp\_catC*; D. *Mp\_act*.

A análise dos dados foi realizada segundo o método proposto por Pfaffl et al [14]. Para isso,

foram geradas curvas-padrões para todos os genes estudados, de modo que a eficiência de sua amplificação foi calculada. Todas as curvas geradas estão mostradas na tabela 4.

|                   | mean CP  | mean CP  | mean CP  | mean CP |
|-------------------|----------|----------|----------|---------|
| cDNA<br>input(ng) | Act      | CatA     | CatB     | CatC    |
| 1                 | 17,55    | 29,47    | 29,26    | 25,88   |
| 0,25              | 19,41    | 31,30    | 31,26    | 27,64   |
| 0,083             | 20,33    | 32,48    | 32,57    | 29,06   |
| 0,04166           | 22,02    | 33,88    | 33,48    | 29,90   |
| slope             | -3,04    | -3,08    | -3,04    | -2,92   |
| SE(slope)         | ±0,40833 | ±0,25069 | ±0,10038 | ±0      |
| Efficiency        | 2,13     | 2,11     | 2,13     | 2,2     |
| SE(E)             | ±0,21619 | ±0,12821 | ±0,05341 | ±0      |
| correlation       | -0,984   | -0,994   | -0,999   | -1      |

Tabela 4: Curvas padrões dos primers utilizados nos ensaios de amplificação em tempo real.

Os experimentos de *Real-time* PCR foram realizados em triplicatas. Para todas as reações, foram incluídos controles negativos. O perfil de expressão dos genes *Mp\_catA*, *Mp\_catB* e *Mp\_catC* em resposta a esses tratamentos está mostrado nos gráficos abaixo.



**Figura 3**: Padrão de expressão dos genes *Mp\_catA*, *Mp\_catB* e *Mp\_catC* no micélio necrotrófico crescido em meio malte (controle - CT) e tratado com peróxido de hidrogênio (Per) por 90 minutos. Os valores de expressão foram normalizados pela expressão do gene codificante para β-actina.



**Figura 4**: Padrão de expressão dos genes *Mp\_catA*, *Mp\_catB* e *Mp\_catC* no micélio necrotrófico crescido em meio malte (controle - CT) e tratado com peróxido de hidrogênio (Per) por 180 minutos. Os valores de expressão foram normalizados pela expressão do gene codificante para β-actina.

Como podemos observar pelos gráficos, os genes Mp catA, Mp catB e Mp catC tiveram sua expressão aumentada na presença de peróxido no tratamento de 90 minutos. É interessante observar que a resposta a peróxido de hidrogênio é bastante rápida, pois se notam variações na expressão das catalases após cercas de 90 minutos de tratamento; essa variação, no entanto, inexiste no tempo de 180 minutos, quando o nível de expressão das catalases voltou ao mesmo nível apresentado no controle. A quantidade de catalases produzida pelo fungo M. perniciosa parece ser bastante robusta, visto que para esse experimento poder ser realizado, o micélio do fungo precisou ser lavado e trocado para um novo meio. Quando esse experimento foi realizado pela primeira vez (dados não mostrados), o peróxido e o foi adicionado diretamente às culturas com 7 dias de crescimento, e não se observou variação alguma na expressão das catalases. O que provavelmente ocorreu foi uma rápida degradação de todo o peróxido adicionado antes mesmo de ele poder ter algum efeito na expressão gênica. De fato, a quantidade de bolhas formadas nessas culturas guando o peróxido foi adicionado indicam uma rápida degradação do mesmo (Figura 2). A grande produção de catalases pelo fungo pode estar diretamente ligada à defesa antioxidante do mesmo durante sua interação com cacau e a sua resistência ao peróxido produzido pela planta na tentativa de conter a infecção pelo fungo. Nesse contexto, os genes Mp\_catA e Mp\_catB parecem ter uma função mais ligada a essa degradação de peróxido exógeno, visto que esses genes

apresentaram uma resposta maior à adição de peróxido em meio de cultura. Não foi possível detectar a expressão dos genes *Mp\_catD* e *Mp\_catE* em culturas necrotróficas de *M. perniciosa*.

4.3. Análise da expressão dos genes que codificam catalase no ciclo de vida de *M.* perniciosa

Foi realizada uma análise de expressão gênica global, através da técnica de sequenciamento de RNA mensageiro em larga escala (RNAseq), de todas as fases do fungo *M. perniciosa in vitro*: esporos não germinados, esporos germinados, basidiomas, micélio *biotrophic-like* e micélio necrotrófico. Os dados desses sequenciamentos estão disponíveis para todo nosso grupo para auxiliar nos diversos projetos em andamento no nosso laboratório.

Os dados de expressão gênica bruta, medidos através do RPKM (*Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads*), mostram que as catalases A, B e C são expressas em todas as fases do ciclo de vida do fungo. A catalase D tem uma expressão muito pequena nos esporos não germinados; nas outras fases, sua expressão é praticamente nula. Já a catalase E é bastante expressa nos esporos e basidiomas, tendo sua expressão quase nula nos dois tipos de micélio. O nível de expressão dos genes *Mp\_catD* e *Mp\_catE* no micélio necrotrófico de *M. perniciosa* justifica o fato de esses genes não terem sido detectados por *Real-time* PCR, como descrito no item 4.2.

**Tabela 5**. Valores de expressão gênica absoluta obtidos através de RNA-seq. Valores medidos em RPKM. ESP: esporos não germinados; GMN: esporos germinados; BDA, basidioma; BIO, micélio biotrophic-like; NEC, micélio necrotrófico.

|         | ESP    | GMN    | BDA    | BIO     | NEC     |
|---------|--------|--------|--------|---------|---------|
| Mp_CatA | 40,71  | 17,23  | 28,42  | 46,41   | 14,49   |
| Mp_CatB | 35,99  | 15,07  | 20,15  | 37,80   | 11,63   |
| Mp_CatC | 588,49 | 68,84  | 508,96 | 1356,97 | 1582,26 |
| Mp_CatD | 3,21   | 0,24   | 0,50   | 0,81    | 0,53    |
| Mp_CatE | 39,91  | 171,38 | 50,41  | 4,55    | 0,63    |

## 4.4. Expressão dos genes que codificam catalase in planta

Os genes que codificam catalase em *M. perniciosa* tiveram sua expressão analisada por *Realtime* PCR durante 4 pontos da progressão da vassoura-de-bruxa, como descrito no item 3.4.3. O padrão de expressão desses genes está representando na figura 5. Como podemos observar, os genes *Mp\_catA*  e *Mp\_catC* têm sua expressão aumentada durante a progressão da vassoura-de-bruxa, enquanto o gene *Mp\_catB* tem sua expressão reduzida. Não foi possível detectar a expressão dos genes Mp\_catD e Mp\_catE *in planta* por *Real-time* PCR.



**Figura 5**: Padrão de expressão dos genes  $Mp\_catA$ ,  $Mp\_CatB$  e  $Mp\_catC$  do fungo M. perniciosa in planta, durante quatro estágios da progressão da vassoura-de-bruxa: AST, assimtomático; VV1: vassoura-verde1; VV2, vassoura-verde2; NEC: necrose. Os valores de expressão foram normalizados pela expressão do gene codificante para  $\alpha$ -tubulina.

A tabela 6 mostra dos valores de expressão gênica absoluta obtidos através de RNAseq. Apesar das coletas das plantas infectadas durante a progressão da vassoura-de-bruxa terem sido realizadas em tempos diferentes em relação ao experimento de *Real-time* PCR, os valores de RPKM mostram a mesma tendência de aumento na expressão dos genes *Mp\_catA* e *Mp\_catC* e de redução na expressão do gene *Mp\_catC* durante os estágios da progressão da doença analisados. Assim como ocorreu com a análise da expressão gênica *in vitro*, a não detecção da expressão dos genes *Mp\_catD* e *Mp\_catE* por *Real-time* PCR pode ser explica pelos valores de RPKM próximos a zero, como mostrado na tabela.

| GB1     |        | NA4    | NB1    | DB1     |
|---------|--------|--------|--------|---------|
| Mp_catA | 11,44  | 88,78  | 35,21  | 200,59  |
| Mp_catB | 609,12 | 395,33 | 209,92 | 6,52    |
| Mp_catC | 927,83 | 756,78 | 1355,3 | 1657,65 |
| Mp_catD | 0      | 0      | 0      | 1,04    |
| Mp_catE | 5,85   | 1,7820 | 3,51   | 1,05    |

**Tabela 6**: Valores de expressão gênica absoluta obtidos através de RNA-seq. Valores medidos em RPKM. GB1: vassoura-verde; NA4, necrose 1; NB1, necrose 2, DB1, vassoura-seca.

## 5. Discussão

*M. perniciosa* possui 5 sequências com similaridade a catalases em seu genoma, o que está condizente com o fato de a maioria de fungos filamentosos como *Neurospora crassa, Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium fulvum* possuírem mais de uma sequência codante para essa enzima em seus respectivos genomas [4, 9, 15]. A predição da localização subcelular das catalases de *M. pernciosa*, realizada através dos programas Psort e SignalP, mostram que possivelmente três dessas catalases são secretadas para o meio extracelular e duas são citosólicas. Trata-se apenas de uma predição, que necessita de mais experimentos para ser confirmada; no entanto, essa possível distribuição celular das catalases de *M. perniciosa* faria com que esse fungo não possuísse nenhuma catalase presente dentro de organelas, assim como *N. crassa*, que produz quatro catalases sem que nenhuma esteja presente dentro de organelas [4]. Isso é um fato bastante raro dentre os fungos filamentosos, visto que na maioria deles, pelo menos uma das catalases produzidas é peroxissomal.

O padrão de expressão das catalases de *M. perniciosa* no do micélio necrotrófico crescido *in vitro* na presença de peróxido de hidrogênio mostra que os genes *Mp\_catA* e *Mp\_catB* podem estar diretamente ligados à degradação de peróxido exógeno, visto que sua expressão é aumentada nessa condição em relação ao controle. Sabe-se que plantas produzem um rápido *burst* oxidativo na presença

de algum patógeno que a esteja atacando [16, 17]. Dentre os compostos produzidos durante este *burst* oxidativo, encontra-se o peróxido de hidrogênio, o qual funciona como uma molécula sinalizadora da resposta hipersensitiva, além de induzir a expressão de genes de defesa nas células vegetais adjacentes aos pontos de infecção. Por fim, o peróxido e outros ROS podem restringir o crescimento do patógeno. Dessa forma, a presença de catalases que respondam a presença de peróxido de hidrogênio exógeno pode ser uma maneira de *M. perniciosa* evadir o *burst* oxidativo produzido pelas células de cacau durante a infecção. De fato, *M. perniciosa* tem a capacidade de manter seu crescimento intacto mesmo na presença de altas concentrações de peróxido de hidrogênio, como mostrado na figura 6. Essa alta tolerância a peróxido pode ser uma das razões para o sucesso da infecção e pelo estabelecimento da vassoura-de-bruxa e pode estar diretamente relacionada às catalases produzidas pelo fungo.



**Figura 6:** *M. perniciosa* é capaz de crescer em altas concentrações de peróxido de hidrogênio. Micélio necrotrófico crescido em meio malte (A) e suplementando com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio: B) 10 mM; C) 20 mM, D; 40 mM, E) 80 mM.

As catalases de *M. perniciosa* também estão diferencialmente expressas durante o ciclo de vida do fungo. Os genes *Mp\_catA*, *Mp\_catB* e *Mp\_catC* estão expressos em todas as fases do ciclo de vida do fungo. No entanto, o gene *Mp\_catD* somente tem uma pequena expressão em esporos não germinados e o gene *Mp\_catE* somente é expresso em esporos e basidiomas. Esse dado é condizente com a existência de várias "*spore specific*" catalases descritas na literatura. No fungo *Aspergillus nidulans*, a catalase A tem sua expressão detectada apenas nos esporos; a deleção desse gene acarretou na sensibilidade dos esporos a peróxido de hidrogênio [18]. O mesmo resultado é encontrado

para o fungo *Cladosporium fulvum*; o gene *cat1* é altamente expresso em esporos não germinados e pouco expresso em esporos em germinação; nas outras fases do ciclo de vida do fungo, sua expressão não é detectada [9].

*In planta*, o gene *Mp\_catB* parece estar mais envolvido na defesa antioxidante durante as fases mais iniciais da doença, enquanto os genes *Mp\_catA* e *Mp\_catC* tem sua expressão mais elevada nos estágios finais da doença. A não detecção da expressão dos genes *Mp\_catD* e *Mp\_catE* deve-se ao fato de esses genes estarem expressos somente em esporos do fungo, e nos estágios da doença analisados, o fungo estar presente somente em suas fases miceliares.

## 6. Rerefências

- Natvig DO, Sylvester K, Dvorachek WHJ, Baldwin JL: Superoxide dismutases and catalases. The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology 1996:191-209.
- Michan S, Lledias F, Baldwin JD, Natvig DO, Hansberg W: Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radic Biol Med* 2002, 33(4):521-532.
- Peraza L, Hansberg W: *Neurospora crassa* catalases, singlet oxygen and cell differentiation.
   *Biol Chem* 2002, 383(3-4):569-575.
- Schliebs W, Wurtz C, Kunau WH, Veenhuis M, Rottensteiner H: A eukaryote without catalasecontaining microbodies: *Neurospora crassa* exhibits a unique cellular distribution of its four catalases. *Eukaryotic Cell* 2006, 5(9):1490-1502.
- Navarro RE, Stringer MA, Hansberg W, Timberlake WE, Aguirre J: catA, a new Aspergillus nidulans gene encoding a developmentally regulated catalase. Current genetics 1996, 29(4):352-359.
- Johnson H, Whiteford JR, Eckert SE, Spanu PD: Production and secretion of Aspergillus nidulans catalase B in filamentous fungi driven by the promoter and signal peptide of the Cladosporium fulvum hydrophobin gene hcf-1. *Current Genetics* 2003, 44(3):155-163.
- Kawasaki L, Wysong D, Diamond R, Aguirre J: Two divergent catalase genes are differentially regulated during Aspergillus nidulans development and oxidative stress. *Journal of bacteriology* 1997, 179(10):3284-3292.

- Kawasaki L, Aguirre J: Multiple catalase genes are differentially regulated in Aspergillus nidulans. *Journal of Bacteriology* 2001, 183(4):1434-1440.
- Bussink HJ, Oliver R: Identification of two highly divergent catalase genes in the fungal tomato pathogen, *Cladosporium fulvum*. *European Journal of Biochemistry* 2001, 268(1):15-24.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C: Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2001, 98(23):13454-13459.
- Garre V, Tenberge KB, Eising R: Secretion of a fungal extracellular catalase by *Claviceps* purpurea during infection of rye: Putative role in pathogenicity and suppression of host defense. *Phytopathology* 1998, 88(8):744-753.
- 12. Garcia O, Macedo JA, Tiburcio R, Zaparoli G, Rincones J, Bittencourt LM, Ceita GO, Micheli F, Gesteira A, Mariano AC *et al*: Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycol Res* 2007, 111(Pt 4):443-455.
- Rincones J, Meinhardt LW, Vidal BC, Pereira GAG: Electrophoretic karyotype analysis of Crinipellis perniciosa, the causal agent of witches' broom disease of Theobroma cacao. Mycological Research 2003, 107:452-458.
- 14. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in** *Real-time* **RT-PCR**. *Nucleic acids research* 2001, **29**(9):e45.
- Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD, Latge JP: Catalases of Aspergillus fumigatus. Infection and immunity 2003, 71(6):3551-3562.
- Baker JC, Orlandi EW: Active oxygen in plant pathogenesis. Annu Rev Phytopathol 1995, 33:299-321.
- 17. Lamb C, Dixon RA: **The oxidative burst in plant disease resistance**. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997, **48**:251-275.

Navarro RE, Stringer MA, Hansberg W, Timberlake WE, Aguirre J: catA, a new Aspergillus nidulans gene encoding a developmentally regulated catalase. *Curr Genet* 1996, 29(4):352-359.

# **CAPÍTULO III**

## A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by

## Moniliophthora perniciosa in Witches' broom disease in cacao

Bruno V de Oliveira, Gleidson S Teixeira, Osvaldo Reis, Joan G Barau, Paulo José P Teixeira, Maria Carolina S do Rio, Romênia R. Domingues, Lyndel W Meinhardt, Adriana F Paes Leme, Johana Rincones, Gonçalo Guimarães Pereira.

Fungal Genetics and Biology

## **ARTICLE IN PRESS**

Fungal Genetics and Biology xxx (2012) xxx-xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Fungal Genetics and Biology



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

# A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by Moniliophthora perniciosa in Witches' broom disease in cacao

4 Q1 Bruno V. de Oliveira<sup>a</sup>, Gleidson S. Teixeira<sup>a</sup>, Osvaldo Reis<sup>a</sup>, Joan G. Barau<sup>a</sup>,

<sup>5</sup> Paulo José P.L. Teixeira<sup>a</sup>, Maria Carolina S. do Rio<sup>a,c</sup>, Romênia R. Domingues<sup>c</sup>,

<sup>6</sup> Lyndel W. Meinhardt<sup>b</sup>, Adriana F. Paes Leme<sup>c</sup>, Johana Rincones<sup>a</sup>, Gonçalo A.G. Pereira<sup>a,\*</sup>

7 a Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),

8 CP 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

9 <sup>b</sup> Sustainable Perennial Crops Laboratory, USDA–ARS, 10300 Baltimore Ave., Bldg. 001, Beltsville, MD 20705-2350, USA

10 <sup>c</sup> Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), CP 6192, 13083-970 Campinas, Brazil

## ARTICLE INFO

<u>1</u>4

11 12

- Article history:
   Received 28 May 2012
- Received 28 May 2012
   Accepted 2 September 201
- Accepted 2 September 2012
   Available online xxxx
- Available olillile xxxx
- 19 Keywords:
- 20 Moniliophthora perniciosa
- 21 Cacao 22 Witch
- 22 Witches' broom disease
- 23 Methanol oxidase
- 24 Extracellular25 Pectin methylestera
- 25 Pectin methylesterase 26

## ABSTRACT

The hemibiotrophic basidiomycete fungus Moniliophthora perniciosa, the causal agent of Witches' broom 28 29 disease (WBD) in cacao, is able to grow on methanol as the sole carbon source. In plants, one of the main sources of methanol is the pectin present in the structure of cell walls. Pectin is composed of highly 30 methylesterified chains of galacturonic acid. The hydrolysis between the methyl radicals and galacturonic 31 32 acid in esterified pectin, mediated by a pectin methylesterase (PME), releases methanol, which may be decomposed by a methanol oxidase (MOX). The analysis of the M. pernciosa genome revealed putative 33 mox and pme genes. Real-time quantitative RT-PCR performed with RNA from mycelia grown in the pres-34 ence of methanol or pectin as the sole carbon source and with RNA from infected cacao seedlings in dif-35 ferent stages of the progression of WBD indicate that the two genes are coregulated, suggesting that the 36 37 fungus may be metabolizing the methanol released from pectin. Moreover, immunolocalization of homogalacturonan, the main pectic domain that constitutes the primary cell wall matrix, shows a reduction in 38 39 the level of pectin methyl esterification in infected cacao seedlings. Although MOX has been classically classified as a peroxisomal enzyme, M. perniciosa presents an extracellular methanol oxidase. Its activity 40 was detected in the fungus culture supernatants, and mass spectrometry analysis indicated the presence 41 of this enzyme in the fungus secretome. Because M. pernciosa possesses all genes classically related to 42 methanol metabolism, we propose a peroxisome-independent model for the utilization of methanol by 43 this fungus, which begins with the extracellular oxidation of methanol derived from the demethylation 44 45 of pectin and finishes in the cytosol.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

48

## 49 1. Introduction

The basidiomycete fungus *Moniliophthora perniciosa* (Aime and Phillips-Mora, 2005) is the causal agent of Witches' broom disease (WBD) in cacao (*Theobroma cacao*), one of the most devastating diseases of cacao in the Americas (Griffith et al., 2003).

*M. perniciosa* is classified as a hemibiotrophic pathogen and presents two morphologically distinct life phases, biotrophic and necrotrophic, that are correlated with different symptoms during the progression of WBD (Evans, 1980). The biotrophic mycelium is monokaryotic, with no clamp connections, and infects flower cushions, developing fruit, and meristematic tissues. These hyphae

Q2 \* Corresponding author. Address: Genetics, Evolution and Bioagents Department, Genomics and Expression Laboratory, Institute of Biology, UNICAMP, P.O. Box 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil, Fax: +55 19 37886235.

E-mail address: goncalo@unicamp.br (G.A.G. Pereira).

1087-1845/\$ - see front matter  $\odot$  2012 Elsevier Inc. All rights reserved. http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.001 inhabit the intercellular space, where they grow slowly at a low density, causing hypertrophy and hyperplasia of the infected branches, which are the main symptoms of the green broom stage (Evans, 1978; Penman et al., 2000; Silva, 1999). These symptoms are caused by a drastic biochemical change during the development of the green brooms (Scarpari et al., 2005). Very little is known about the characteristics of this monokaryotic mycelium *ex planta* because its cultivation is difficult due to its instability; a glycerol-based culture media for the cultivation of a monokaryotic ic and biotrophic-like mycelia was developed only recently (Meinhardt et al., 2006).

Five to eight weeks after the start of the infection, a dikaryotiza-71tion process occurs, and the mycelia become necrotrophic, pre-72senting two nuclei per cell that are connected by typical73basidiomycete clamp connections. The necrotrophic mycelia rap-74idly invade the host plant cells, completely destroying the infected75tissues and causing the extensive degradation symptoms of the dry76

51

46 47

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

Please cite this article in press as: de Oliveira, B.V., et al. A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. Fungal Genet. Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.001

2

## **ARTICLE IN PRESS**

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

broom phase (Delgado and Cook, 1976; Evans and Bastos, 1980;
Frias et al., 1991; Griffith and Hedger, 1994). Although the mechanisms that trigger the dikaryotization process in *M. perniciosa* are
not yet completely elucidated, recently a study published by our
group reported that an alternative oxidase plays a role in the biotrophic development of *M. perniciosa* and regulates the transition
to its necrotrophic stage (Thomazella et al., 2012).

The introduction of WBD in Bahia, the main Brazilian cacao-pro-84 ducing state, occurred in 1989 (Pereira et al., 1989). Since then, ca-85 cao production has decreased drastically and Brazil has become a 86 net importer of cacao in order to supply the national chocolate 87 88 industry. Due to the extreme losses in cacao production, in the 89 early 2000s, the Witches' broom Genome Project was initiated to 90 decode the *M. perniciosa* genome and, based on the data acquired, 91 select genes that could be relevant during the progression of WBD 92 for characterization. In 2008, a draft genome analysis and an EST 93 and microarray-based transcriptome study were published (Mondego et al., 2008; Rincones et al., 2008). These studies revealed the 94 presence of sequences similar to methanol oxidase (mox), an en-95 96 zyme that could be related to the previously reported ability of 97 M. perniciosa to grow on methanol as the sole carbon source (Mondego et al., 2008), as shown in Fig. 1. 98

99 MOX is the key enzyme in methanol metabolism in methylo-100 trophic yeasts and other methanol-degrading organisms. It con-101 sists of an octameric flavoprotein that oxidizes methanol to formaldehyde and hydrogen peroxide (Ozimek et al., 2005). The 102 peroxide generated is decomposed by a catalase, and the formalde-103 hyde is subjected either to the action of a dihydroxyacetone syn-104 thase (DHAS) or to direct oxidation by the enzymes 105 formaldehyde dehydrogenase (FMDH) and formate dehydrogenase 106 107 (FDH) (Kaszycki and Koloczek, 2000).

In almost all methanol-degrading organisms, such as the methylotrophic yeasts *Pichia angusta* and *Pichia pastoris* and the ascomycete phytopathogen *Cladosporium fulvum*, MOX is a peroxisomal enzyme (Ozimek et al., 2005; Segers et al., 2001). It is synthesized in the cytosol and imported into the peroxisomes, triggered by a peroxisomal targeting signal (PTS1) that is located in the C-terminal part of the enzyme (Ozimek et al., 2006). To date, the only known exception concerns the MOX produced by the basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*, which is secreted into the extracellular space, despite the absence of a clear secretion signal in its sequence (Daniel et al., 2007).

In plants, one of the main sources of methanol is the pectin present in the plant cell walls (Nemecek-Marshall et al., 1995). Pectins are one of the major components of the middle lamellae and primary plant cell walls in dicotyledonous species, where they compose 30-35% of the cell wall dry weight (Pelloux et al., 2007). Pectins are highly complex polysaccharides that are rich in calcium ions, and are formed by a range of different domains, two of which may be distinguished: homogalacturonan and xylogalacturonan. Homogalacturonans are linear chains of  $\alpha$ -(1-4)-linked D-galacturonic acid, which can be either methylesterified or acetylesterified. Xylogalacturonan is a homogalacturonan with (1,3)- $\beta$ -D-xylopyranoside side chains, which like homogalacturonan, can be methylesterified (Willats et al., 2001).

The degradation of the pectin present in plant cell walls is a strategy used by many phytopathogenic fungi to invade the host tissues and establish infection. The fungi *Sclerotinia sclerotiorum* (Guimaraes and Stotz, 2004), *Botrytis cinerea* (Han et al., 2007), and *M. perniciosa* (Rio et al., 2008) produce oxalate, which removes calcium ions bound to pectin to produce calcium oxalate crystals, thus exposing the host cell walls to plant cell wall-degrading enzymes (PCWD) of fungal origin. One of the main PCWDs is pectin methylesterase (PME), an enzyme that removes the methyl ester radicals present in the galacturonic acid backbone in esterified pectin, releasing methanol (Sakai et al., 1993). PMEs are enzymes produced by plants that are related to growth, development, and defense against pathogens (Pelloux et al., 2007), though many phy-



**Fig. 1.** *M. perniciosa* is able to grow on methanol as the sole carbon source. Minimal medium without any carbon source, which cannot support *M. perniciosa* growth (A, control) and the same media supplemented with glucose (B), methanol (C) and cacao extract (D), at final concentrations of 1% (v/v).

Please cite this article in press as: de Oliveira, B.V., et al. A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. Fungal Genet. Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.001

## **ARTICLE IN PRESS**

3

215

224

topathogenic fungal species secret PMEs as pathogenicity factors.
For example, the disruption of the *B. cinerea* pectin methylesterase
gene Bcpme1 reduces virulence in several host plants, including
apple fruits, grapevines, and *Arabidopsis thaliana* leaves (ValetteCollet et al., 2003). The analysis of *M. perniciosás* genomic and expressed sequences revealed the presence of a sequence similar to a
pectin methylesterase.

Although it has been demonstrated that methylotrophic yeasts, such as *Pichia methanolica* (Nakagawa et al., 2005) and *Candida boidinii* (Yurimoto et al., 2000), are able to utilize the methanol released from pectin, very little is known about the correlation between pectin and methanol metabolism among the phytopathogenic fungal species.

158 In this study, we show that *M. perniciosa* produces a methanol 159 oxidase that is secreted into the extracellular space. Its relative 160 expression in vitro and in planta is associated with PME expression 161 levels and with the reduction in the level of methyl esterification 162 observed in infected cacao seedlings, suggesting that this fungus 163 metabolizes the methanol generated by pectin degradation. More-164 over, we show that M. perniciosa possesses all genes related to 165 methanol utilization, and their expression indicates that methanol 166 can be a relevant energy source for this fungus.

### 167 2. Material and methods

## 168 2.1. Biological material and growth conditions

The isolate FA553 of *M. perniciosa* was used for all experiments
in this work (Mondego et al., 2008). In our laboratory, necrotrophic
mycelia of this isolate were maintained on plates of Malt Yeast Extract Agar (Difco) at 28 °C. The spores were obtained from necroQ3 trophic mycelia according to the protocol developed by Teixeira
et al. (in preparation). Biotrophic-like mycelia were obtained from
spore germination in biotrophic maintenance media (Meinhardt et al., 2006).

177 For all in vitro gene expression experiments, both biotrophic-178 like and necrotrophic mycelia were grown for 7 days at 28 °C, un-179 der constant agitation at 120 rpm, in biotrophic liquid media, 180 which contains glycerol as the sole carbon source (Meinhardt et al., 2006); the same media was used for the biotrophic-like and 181 necrotrophic mycelia growth to avoid gene expression variations 182 183 associated with different growth conditions. After the 7-day 184 growth period, the mycelia were separated from the media by fil-185 tration, washed twice in sterile distilled water and inoculated in 186 new aliquots of the same media supplemented with the following 187 sole carbon sources at final concentrations of 1% (w/v): glycerol, 188 glucose, methanol, non-esterified pectin from citrus (Sigma, poly-189 galacturonate) and esterified pectin from citrus (Sigma, degree of 190 esterification,  $DE \ge 85\%$ ). After a 24-h period of incubation, the mycelia were separated from the media by filtration, washed twice 191 in sterile distilled water, frozen in liquid nitrogen, and stored at 192 193 -80 °C for further RNA isolation.

T. cacao L. variety (Catongo) was used for the M perniciosa gene 194 expression assays in planta. Plants were grown for approximately 195 3 months in a greenhouse under controlled temperature (26 °C) 196 197 and humidity (>80%) at a photoperiod of 12 h. After this period 198 of growth, the apical meristems of the plants were removed 199 2 weeks before the infection with the fungal spores to stimulate 200 growth of the lateral meristems. One day before the infection, 201 the plants were transferred to a high-humidity chamber to induce 202 stomatal opening. We used 30 µl of a solution containing approximately 10<sup>5</sup> spores/ml to infect each plant. Symptoms of WDB were 203 observed, and the plants were harvested based on the progression 204 of symptoms of the disease: asymptomatic, green broom 1, green 205 206 broom 2 and necrosis; the plants were collected in triplicate for

each stage analyzed. As the experimental control, non-infected 207 plants of the same age were collected. All collected plants were 208 frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C freezer for further 209 RNA isolation. For the immunolocalization assays, seedlings 210 from asymptomatic and necrosis stages and their respective 211 non-infected controls of the same age were harvested and fixed 212 in Karnovsky solution overnight at room temperature and under 213 vacuum (Karnovsky, 1965). 214

#### 2.2. RNA isolation

Mycelia of M. perniciosa grown in vitro were processed for RNA 216 extraction using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according 217 to the manufacturer's instructions. RNA from infected and 218 non-infected plant material was isolated according to a protocol 219 developed in our laboratory (Vidal et al., 2010). All isolated RNA 220 was qualitatively analyzed in 1% denaturing formaldehyde/agarose 221 gel electrophoresis and quantified using a Nanodrop<sup>™</sup> 1000 222 Spectrophotometer (Thermo Scientific). 223

### 2.3. Real-time PCR

One microgram of total RNA from in vitro cultures and plant 225 material was treated with RQ1 RNAse-free DNAse (Promega) and 226 used for cDNA synthesis with SuperscriptII<sup>®</sup> Reverse Transcriptase 227 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The online 228 program Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) was used to design 229 all PCR primers based on the sequences obtained from the Witches' 230 broom Genome Project database (Table 1). The optimal primer 231 annealing temperature was set to 55 °C, and the amplicon size var-232 ied from 100 to 110 bp. Quantitative PCR was performed using the 233 SYBRGreen MasterMix (Applied Biosystems), and the fluorescence 234 was detected with the Step One Plus platform (Applied Biosys-235 tems). A 16 µl reaction was set with 8 µl of the SYBRGreen Master-236 Mix, 40 ng of cDNA and 100 nM of each primer. The thermal 237 cycling conditions were 94 °C for 10 min, followed by 40 cycles 238 of 94 °C for 15 s, 55 °C for 20 s and 60 °C for 1 min. After amplifica-239 tion, a melt-curve step consisting of one cycle of 94 °C for 15 s and 240 a ramp varying from 60 °C to 94 °C in intervals of 0.3 °C was added 241 to inspect the reactions for the formation of primer dimers and 242 unspecific amplicons. The melting temperatures of the fragments 243 were determined according to the manufacturer's protocol (Table 244 1). No-template reactions (water) were included as negative con-245 trols in every plate for all of the primers used; for plant material 246 analyses, non-infected plants were also assayed to ensure that 247 the fungal primers were not amplifying cacao genetic material. 248

The data analysis was performed using a mathematical method249described previously (Pfaffl, 2001), using the  $C_t$  (cycle threshold)250mean of biological triplicates. Standard curves for each primer pair251were generated by serial cDNA dilutions. The housekeeping genes252 $\beta$ -actin and  $\alpha$ -tubulin (Table 1) were used to normalize the qPCR253reactions for *in vitro* and infected plant material, respectively.254

## 2.4. Methanol oxidase assay

Supernatants of liquid *M. perniciosa* cultures were separated 256 from the mycelia by filtration through several layers of filter paper 257

#### Table 1

Primers and melting temperatures (MT) for quantitative SYBRGreen real-time PCR.

|     | Forward                  | Reverse                  | MT<br>(°C) |
|-----|--------------------------|--------------------------|------------|
| PME | TTTTGTACTCAAACTTGCATCACC | CTGAAGGAAGATTAGACAGACACG | 75.6       |
| MOX | CTGTCGGCGTAGCCTATGTT     | TCCACTGCTCAGAACGACAC     | 82.3       |
| ACT | CCCTTCTATCGTCGGTCGT      | AGGATACCACGCTTGGATTG     | 80.7       |
| TUB | GACCAACAGCTTGTCTTTGC     | GACATTGCAAACATCGAGGA     | 81.0       |

Please cite this article in press as: de Oliveira, B.V., et al. A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. Fungal Genet. Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.001

324

325

326

327

328

329

330

331

347

370

371

372

373

374

375

376

377

378

4

B.V. de Oliveira et al./Fungal Genetics and Biology xxx (2012) xxx-xxx

(Whatman No. 1). The secretome samples were then concentrated
100-fold using an Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with an
Ultracel-10 membrane (Millipore) and quantified by the Bradford
assay using bovine serum albumin as the standard.

262 The concentrated supernatants of liquid *M. perniciosa* cultures 263 were used to detect methanol oxidase activity. MOX activity was 264 assayed spectrophotometrically at 405 nm through the oxidation 265 of 2,2-azino-bis(3-ethylbenzo-6-thiazoline sulfonic acid) (ABTS) 266 (Sahm and Wagner, 1973). The reactions were set to a final volume of 2 ml, containing 100 mM of the substrate (methanol, eth-267 268 anol and 2-propanol), 2 µmol of ABTS, 40 µg of horseradish 269 peroxidase (Sigma), and approximately 10 µg of total protein 270 from the culture supernatants. The reaction was performed at 25 °C in an air-saturated 100 mM potassium phosphate buffer at 271 pH 7.5. The oxidation of ABTS was detected by observing the 272 273 appearance of a green coloration. The 405 nm absorbance was 274 measured at 1 min intervals. The  $K_m$  for methanol and ethanol 275 was calculated as described previously (Segers et al., 2001; Van der Klei et al., 1990). 276

## 277 2.5. Enzymatic in-gel digestion and mass spectrometry analysis

278 Concentrated supernatants of liquid M. perniciosa cultures, ob-279 tained as described in Section 2.4, were used in mass spectrometry 280 analysis. SDS-PAGE electrophoresis (12.5%) was used to separate 281 20 µg of the concentrated protein mixture. The bands correspond-282 ing to the molecular mass range from 70 to 75 kDa, as predicted for 283 MOX, were excised from the gel and subjected to in-gel trypsin 284 digestion, which was performed as described previously (Hanna 285 et al., 2000), with modifications. As a negative control, we per-286 formed the same preparation with a cell-free culture media.

287 The resulting peptide solution was dried in a SpeedVac con-288 centrator, resuspended in 20 µl of 0.1% formic acid and an aliquot 289 of 4.5 µl was analyzed in a LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer 290 (Thermo Scientific) connected to a nanoflow liquid chromatogra-291 phy (LC–MS/MS) by an EASY-nLC system (Proxeon Biosystem) 292 through a Proxeon nanoelectrospray ion source. Peptides were 293 separated on a 2–90% acetonitrile gradient in 0.1% formic acid 294 using a pre-column EASY-Column (2 cm  $\times$  id 100  $\mu$ m, 5  $\mu$ m parti-295 cle size) and an analytical column EASY-Column (10 cm × id 75 µm, 3 µm particle size) at a flow rate of 300 nl/min over 296 297 45 min. The nanoelectrospray voltage was set to 1.7 kV, and the 298 source temperature was 275 °C. All instrument methods for the 299 Orbitrap Velos were set up in the data-dependent acquisition 300 mode. The full scan MS spectra (m/z 300–2000) were acquired 301 in the Orbitrap analyzer after accumulation to a target value of 302  $1e^{6}$ . The resolution was set to r = 60,000 and the 20 most intense 303 peptide ions with charge states  $\ge 2$  were sequentially isolated to 304 a target value of 5000 and fragmented in the linear ion trap by 305 low-energy CID (normalized collision energy of 35%). The signal 306 threshold for triggering an MS/MS event was set to 1000 counts. Dynamic exclusion was enabled with an exclusion size list of 500, 307 308 exclusion duration of 60 s, and repeat count of 1. An activation q = 0.25 and activation time of 10 ms were used (de Souza et 309 310 al., 2012).

Peak lists (msf) were generated from the raw data files using the 311 312 software Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific) with Sequest search engine and they were searched against *M. pernici-*313 314 osás predicted protein database (17,012 sequences) with carbami-315 domethylation (+57.021 Da) as a fixed modification, oxidation of 316 methionine (+15.995 Da) as a variable modification, one trypsin 317 missed cleavage and a tolerance of 10 ppm for the precursor and of 1 Da for fragment ions, filtered using xcorr cutoffs (+1 > 1.8,318 +2 > 2.2, +3 > 2.5 and +4 > 3.25) and false discovery rate of 0.01, 319 320 performed using a reverse M. perniciosás predicted protein 321 database.

2.6. Immunofluorescence detection of the level of methyl esterification 322 in infected and non-infected cacao seedlings 323

The immunolocalization of the methylesterified and nonmethylesterified domains of homogalacturonan present in infected and non-infected cacao seedlings was performed as described elsewhere (Buckeridge and Reid, 1994; Orfila and Knox, 2000). The primary antibodies JIM5 and JIM7, which recognize homogalacturonan epitopes with low (0–40%) and high (15–80%) levels of methyl esterification (0–40%), respectively, were used (Willats et al., 2000).

The fixed samples (Section 2.1) were dehydrated, cleared in xy-332 lene and infiltrated in Paraplast<sup>®</sup> Plus (McCormick<sup>™</sup>). Twelve-333 micrometer transverse sections of stems from asymptomatic and 334 necrotic infected cacao plants and non-infected controls of the 335 same age were dewaxed with butyl acetate, hydrated and incu-336 bated in blocking solution (3% whole milk diluted in 0.01 M saline 337 phosphate buffer pH 7.1) for 30 min. Subsequently, the samples 338 were separately incubated with primary antibodies (1:5 dilution) 339 for 3 h, washed three times with PBS buffer and incubated with 340 Goat Anti-Mouse IgG, (H + L) FITC-conjugated secondary antibody 341 for 1 h at room temperature in the dark. Control samples were 342 incubated only with the secondary antibody for 1 h at room tem-343 perature in the dark. The samples were immediately analyzed with 344 an Olympus BX51 epifluorescence microscope. At least 10 different 345 sections of each plant were analyzed. 346

#### 2.7. Transcriptomic analysis using RNA-seq

The RNA isolated from *M. perniciosa* necrotrophic mycelia in-348 duced in glycerol or methanol (Section 2.1) was processed for glo-349 bal transcriptome analysis by large scale mRNA sequencing (RNA-350 seq). Libraries were prepared according the manufacturer's 351 instructions (Illumina). The mRNA was purified from 10 µg of total 352 RNA using Sera-Mag Magnetic Oligo(dT) Beads (Thermo Scientific), 353 and fragmented in the presence of divalent cations under high 354 temperatures. The fragmented mRNA was used to synthesize the 355 cDNA. The first strand was synthesized using Superscript II Reverse 356 Transcriptase and random hexamers. Double-stranded cDNA was 357 then produced using the enzymes DNA polymerase I and RNAse 358 H. Subsequently, abrupt extremities were obtained by treatment 359 with the enzymes T4 DNA polymerase and Klenow DNA polymer-360 ase; a 3'-adenine was added by the enzyme Klenow exo-Adapters 361 with an overhang thymine were added, and non-ligated adapters 362 were purified in gel. Finally, the libraries were enriched through 363 15 cycles of amplification using primers that anneal to the adapt-364 ors. The libraries were quantitative and qualitatively assayed with 365 the Qubit fluorometer (Invitrogen) and the Experion capillary elec-366 trophoresis system (Bio-RAD). Each library was subjected to a 36-367 cycle single end sequencing in the Genome Analyzer II<sub>x</sub> platform 368 (Illumina). 369

To identify expressed genes, the reads obtained from large scale sequencing were mapped against the *M. perniciosa* genomic database using the mapping tool Bowtie (Langmead, 2010), allowing one mismatch. Ambiguous reads that mapped with similar scores to several sites were discarded. The measure of gene expression was calculated in terms of RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) (Mortazavi et al., 2008).

### 3. Results

#### 3.1. Sequence analysis of M. perniciosa methanol oxidase

The *M. perniciosa* predicted protein database (17,012 sequences) 379 was analyzed, and three sequences with the potential to encode 380

Please cite this article in press as: de Oliveira, B.V., et al. A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. Fungal Genet. Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.001

B.V. de Oliveira et al./Fungal Genetics and Biology xxx (2012) xxx-xxx

381 methanol oxidase were initially identified. These sequences were 382 compared to MOX sequences from other organisms by the Blast 383 algorithm against the NR database and subjected to a search of 384 conserved domains and classical MOX motifs, using the CDD and 385 Pfam databases. Fig. 2A shows a scheme of the three predicted 386 MOX sequences. All described MOX from fungal species contain 387 two GMC-oxidoreductase (GMC, glucose-methanol-choline) domains and a conserved ADP-binding  $\beta - \alpha - \beta$  motif on the N-termi-388 nal portion of the protein (Ozimek et al., 2005). As shown in 389 Fig. 2A, the sequences 2 and 3 lack the N-terminal  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  motif 390 391 and sequence 3 presents an incomplete N-terminal GMC-oxidoreductase domain; moreover, these sequences are shorter than se-392 393 quence 1 and MOX sequences from other organisms, in which protein size varies from 650 to 670 amino acids. Because sequence 394 395 1 is the only sequence that contains both complete GMC-oxidore-396 ductase domains and the classical  $\beta - \alpha - \beta$  motif and because it was 397 the only sequence previously identified in cacao-extract-induced 398 EST libraries (Rincones et al., 2008), we focused our work on this 399 gene. This sequence will be referred to as Mp\_mox.

400 The Mp\_mox genomic (GenBank ID: JX024739) sequence and complete CDS present 3490 and 1953 nucleotides, respectively, 401 containing 29 exons and 28 introns. The predicted protein contains 402 403 650 amino acids and has a molecular weight of approximately 404 72 kDa. Fig. 2B shows an alignment of the C-terminal part of the 405 *M. perniciosa* MOX with sequences from the methylotrophic yeasts 406 P. pastoris and P. methanolica, the ascomycete fungus C. fulvum and 407 the basidiomycete species Coprinopsis cinerea and G. trabeum, and 408 the predicted sequences 2 and 3. Mp-mox shares 89% identity with C. cinerea and G. trabeum sequences compared with its 52% identity 409 410 with the other species mentioned above. Sequence analysis with the program InterPro Scan Sequence Search (http://www.ebi.a-411 c.uk/Tools/pfa/iprscan) showed the existence of two conserved 412 413 GMC-oxidoreductase domains: an N-terminal domain correspond-414 ing to the amino acids 7-313 and a C-terminal domain that spans from amino acid 427 to 614. Residues 13-18 contain a putative fla-415 vin adenine dinucleotide (FAD) binding site (GGGPAG) within the 416 predicted ADP-binding  $\beta - \alpha - \beta$  motif, which is present in most 417 418 FAD-binding proteins (Ozimek et al., 2005; Wierenga et al., 419 1986). An N-glycosylation site at the residue 323 was predicted 420 with a score of 0.5229 by the software NetNGlyc 1.0 (http:// 421 www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc).

422 One of the main characteristics of MOX from most organisms 423 is the presence of a peroxisomal targeting signal, PTS1, at the

C-terminal region of the protein. The (S/A/C)-(K/R/H)-(L/A) tripep-424 tide interacts with the Pex5p receptor protein, leading to the 425 importation of the protein by the peroxisomes (de Hoop and Ab, 426 1992). As shown in Fig. 2B, the *M. perniciosa* MOX sequence lacks 427 PTS1. Otherwise, the last 26 amino acids (marked in gray) show 428 a high similarity with the terminal residues of the G. trabeum 429 and C. cinerea sequences; this sequence appears to be a particular 430 characteristic of MOX from basidiomycete species as it differs sub-431 stantially from the C-terminal sequences of other fungal species. 432

## 3.2. M. perniciosa MOX is a secreted protein

One hundred-fold concentrated culture supernatants (secretome) from *M. perniciosa* were assayed for MOX activity. As described in Section 2.4, MOX activity was assayed by following the oxidation of ABTS at 405 nm with a spectrophotometer. Table 2 shows MOX relative activity and  $K_m$  values in different substrates. As shown in Table 2, the preferred substrate for MOX is methanol, but it also shows a high activity when the substrate is ethanol.

LC-MS/MS analysis on an LTQ Orbitrap-Velos mass spectrome-441 ter was used to confirm the presence of methanol oxidase in the 442 extracellular extracts of M. perniciosa cultures. The concentrated 443 fungal secretome was electrophoretically separated in a 12.5% 444 one dimensional SDS-PAGE gel. As MOX is predicted to have a 445 molecular mass of approximately 72 kDa, the bands corresponding 446 to the molecular mass range of 70-75 kDa were excised from the 447 gel (Fig. 3A) and analyzed in the LTQ-Orbitrap-Velos mass spec-448 trometer. A total of 2722 spectral counts were assigned to 205 pro-449 teins of the M. perniciosa predicted protein database. As shown in 450 Fig. 3B, three unique MOX peptides were identified, totaling 7% 451 of protein coverage. This finding confirms that M. pernciosa se-452 cretes this enzyme into the extracellular space, despite the absence 453 of a predicted secretory signal peptide in its sequence. The peptide 454

| Table 2 | 2 |
|---------|---|
|---------|---|

Relative activity and K<sub>m</sub> values for MOX in different substrates.

| Substrate  | Relative activity (%) <sup>a</sup> | $K_m$ (mM) |
|------------|------------------------------------|------------|
| Methanol   | 100                                | 17.3       |
| Ethanol    | 88                                 | 21.2       |
| 2-Propanol | 7                                  | -          |

Activities are given relative to methanol.



**Fig. 2.** (A) Schematic alignment of the three sequences identified with the potential to encode methanol oxidase in the *M. perniciosa* genome, showing their amino acid length and the presence of conserved domains. (B) Alignment of the C-terminal sequence of Mp-mox from *M. perniciosa* (GenBank ID: JX024739) with MOX from *Gloeophyllum trabeum* (ABI14440.1), *Coprinopsis cinerea* (XP\_001838223.2), *Cladosporium fulvum* (AAF82788.1), *Pichia methanolica* (AAF02494.1) and *Pichia pastoris* (AAB57850.1) and the other two predicted sequences from *M. perniciosa*. The identical amino acid residues are indicated with asterisks. The specific C-terminal sequence present in MOX from the basidiomycete species is labeled in gray, and the C-terminal peroxisomal targeting signal (PTS1) present in MOX from the ascomycetes and methylotrophic yeasts is labeled in black.

Please cite this article in press as: de Oliveira, B.V., et al. A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. Fungal Genet. Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.001

433

434

435

436

437

438

439

440

## **ARTICLE IN PRESS**

B.V. de Oliveira et al. / Fungal Genetics and Biology xxx (2012) xxx-xxx



Fig. 3. MOX from *M. perniciosa* is an extracellular enzyme. (A) SDS-PAGE from *M. perniciosa* secretome indicating a 70–75 kDa band that was excised from the gel and subjected to mass spectrometry analysis. (B) Mass spectrometry analysis identified three unique MOX peptides.

#### Table 3

6

Peptide sequences identified by mass spectrometry analysis.

| Peptide sequence            | Spectral counts | Charge | m/z       | MH + [Da] |
|-----------------------------|-----------------|--------|-----------|-----------|
| VANETFTTDDFLR               | 1               | +2     | 764.8710  | 1528.7348 |
| SPSPYVDPFFDSGF <u>M</u> NNK | 1               | +2     | 1032.9590 | 2064.9107 |
| EIFAEWETSPEK                | 1               | +2     | 733.3496  | 1465.6919 |

<u>M</u> – oxidation of methionine.

455 sequences, the number of spectral counts, and their m/z are de-456 tailed in Table 3.

# 457 3.3. Mp-mox is upregulated in the presence of methanol and esterified458 pectin

The relative expression of *Mp-mox* and *Mp-pme* transcripts was measured by Real-time PCR in both biotrophic-like and necrotrophic mycelia grown *in vitro* in the presence of glycerol, glucose,



**Fig. 4.** *Mp-mox* and *Mp-pme* relative expression in the biotrophic-like and necrotrophic mycelium from *M. perniciosa* grown *in vitro* and supplemented with different sole carbon sources. Gly: glycerol; Glu, glucose; Met: methanol; Pol: polygalacturonate (pectin DE 0%); Pec: pectin, DE > 85%. The values are means of biological triplicates and the bars indicate the standard error of the mean. The data were normalized to the  $\beta$ -actin gene and the condition Gly was considered as the control of the experiment and was used to normalize the other conditions expression values.

methanol, polygalacturonate or pectin with 90% esterification. As 462 shown in Fig. 4, there was a 12- and 9-fold increase in the expres-463 sion of *Mp-mox* in the biotrophic-like and necrotrophic mycelia, 464 respectively, in the presence of methanol when compared with 465 glycerol as the carbon source. This is consistent with the fact that 466 methanol is a substrate for MOX and a known inducer of its expres-467 sion in other organisms (Ozimek et al., 2005). In the presence of 468 esterified pectin, both Mp-mox and Mp-pme genes were upregu-469 lated. The expression of Mp-mox and Mp-pme was increased 470 approximately 10 and 9 times, respectively, in both types of myce-471 lium. This result suggests that the methanol released during the 472 demethylation of pectin by the enzyme PME is a substrate for 473 MOX, which shows an increased level of expression. Interestingly, 474 in the presence of non-esterified pectin, neither gene was upregu-475 lated, thus reinforcing the hypothesis that the demethylation of 476 pectin is a key process for Mp-mox and Mp-pme upregulation. 477 The lack of variation in gene expression between the biotrophic-478 like and necrotrophic mycelia show that, although these mycelia 479 produce distinct symptoms in the progression of WBD, they may 480 exhibit similar characteristics when grown under the same condi-481 tions in vitro. The expression of these genes in the presence of glu-482 cose did not show any difference when compared to growth in 483 glycerol. 484

3.4. The reduction of the level of methyl esterification in infected cacao485seedlings is correlated with the higher levels of M. perniciosa Mp-pme486relative gene expression in planta487

*Mp-mox* and *Mp-pme* relative expression in infected cacao plants was measured by Real-time quantitative PCR. As described in Section 2.1, 3-month-old cacao seedlings were infected with *M. perniciosa* spores. The symptoms of WBD were observed and the plants were harvested according to the progression of the disease: asymptomatic, green broom 1, green broom 2 and necrosis. As shown in Fig. 5A, *Mp-mox* and *Mp-pme* are coregulated during the progression of WBD in the stages analyzed. The relative expression of both genes is reduced in the green broom phase compared with the asymptomatic stage and increases during the necrosis stage, when the expression of both genes reaches their highest level.

Spores of *M. perniciosa* infect cacao plants as biotrophic mycelia, 500 which grow slowly and at low densities in the infected plants. As 501 the disease progresses, the amount of fungal material in planta in-502 creases, reaching a maximum at the late stages of the dry broom 503 phase when the necrotrophic mycelia completely colonizes the in-504 fected tissues (Evans, 1978; Frias et al., 1991; Griffith and Hedger, 505 1994). Fig. 5B shows the amplification plots and Ct, with a thresh-506 old of 0.1, for the housekeeping gene  $\alpha$ -tubulin in the four stages of 507 WBD analyzed. The C<sub>t</sub> difference for the  $\alpha$ -tubulin gene between 508 the asymptomatic ( $C_t = 30$ ) and the necrosis phase ( $C_t = 23$ ) indi-509 cates that there is approximately 100 times more fungal material 510 in the infected plants during the necrosis phase than in the previ-511 ous stages. The relatively higher Mp-mox and Mp-pme expression 512 levels in the necrosis phase, in conjunction with the higher number 513 of mycelia infecting the plants during this phase, led us to hypoth-514 esize that the final quantity of the transcripts of these genes and, 515

Please cite this article in press as: de Oliveira, B.V., et al. A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. Fungal Genet. Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.001

488

489

490

491

492

493

494

495

496

497

498

7

B.V. de Oliveira et al. / Fungal Genetics and Biology xxx (2012) xxx-xxx



**Fig. 5.** (A) *Mp-mox* and *Mp-pme* relative expression *in planta* in different stages of the progression of WBD: AST, asymptomatic; GB1: green broom 1; GB2, green broom 2 and NEC: necrosis. The values are means of biological triplicates and the bars indicate the standard error of the mean. The data were normalized to the  $\alpha$ -tubulin gene and the condition GB2 was used to normalize the other conditions expression values. (B) Amplification plots of the  $\alpha$ -tubulin gene in the four stages of the progression of WBD analyzed, with a threshold of 0.1, showing an increase of the amount of fungal material infecting cacao in the late stages of the disease; (C) Immunofluorescence detection of the pectic homogalacturonan domain in infected and non-infected cacao seedlings (stem tissues in transverse section). Infected asymptomatic plants (2, 6 and 10) and same age non-infected plants (1, 5 and 9); infected necrotic plants (4, 8, and 12) and same age non-infected plants (3, 7 and 11). Bar = 25 µm.

516 possibly, their protein products, would be even higher in the in-517 fected plants.

518 Because PMEs remove the methyl esters from the pectin back-519 bone, we decided to test this hypothesis by analyzing the level of 520 methyl esterification present in the cell walls of infected cacao 521 seedlings during the asymptomatic and necrotic stages and their 522 respective non-infected same age controls. If there is a higher level 523 of PME enzyme due to the combined effect of the upregulation of 524 Mp-pme during the necrotrophic stage and the greater amount of 525 fungal material present in this stage, there should be an inverse 526 correlation with the degree of pectin methyl esterification in the cell wall of infected plants at this stage. 527

As mentioned in Section 2.6, the monoclonal antibodies JIM5 and JIM7 were used in this work to characterize the level of methyl esterification in the pectic domain homogalacturonan. JIM5 recognizes pectin with low DE (0–40%) and JIM7 labels pectin with high esterification content (15–80%) (Willats et al., 2000).

As shown in Fig. 5C, strong JIM7 labeling was observed in the 533 infected and non-infected asymptomatic samples analyzed 534 535 (Fig. 4C: 1 and 2); however, comparing the negative control sam-536 ples (Fig. 5C: 9 and 10), which were labeled only with the second-537 ary antibody, with the samples treated with JIM5 (Fig. 5C: 5 and 6), 538 no JIM5 labeling is observed in the treated samples. JIM5 and JIM7 are able to unspecifically label pectic domains with 15-40% DE. 539 Therefore, the fact that the samples were labeled only by JIM7 540 541 indicates that both infected asymptomatic and its same age

non-infected control present a high degree of methyl esterification (>40%).

On the other hand, infected plants showing necrosis and their non-infected same age controls show an inverse pattern of methyl esterification: the comparison between the negative control (Fig. 5C: 11) and the samples treated with the primary antibodies leads to the conclusion that non-infected plants were strongly labeled by JIM7 and were not labeled by JIM5 (Fig. 5C: 3 and 7). These data indicate a high level of methyl esterification, while infected plants were strongly marked by JIM5 and weakly by JIM7 (Fig. 5C: 4 and 8), in comparison to their negative control (Fig. 5: 12), thus indicating a low level of methyl esterification. The apparent labeling of some samples from the negative control is related with their auto fluorescence.

These results, in conjunction with the *M. perniciosa Mp-pme* expression *in planta* (Fig. 5A) and the higher amount of fungal material present in the infected tissues (Fig. 5B), strongly suggest a participation of the fungal PME enzyme in the demethylation process of cacao pectin during the necrotrophic stage of WBD.

## 4. Discussion

Methanol oxidase has been primarily studied in the methylotrophic yeasts *Pichia, Candida, Hansenula,* and *Torulopsis* (Veenhuis et al., 1983). The capability of these organisms to grow on metha-564

547

548

549

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

542

561

8

B.V. de Oliveira et al./Fungal Genetics and Biology xxx (2012) xxx-xxx

565 nol as the sole carbon source is due to the production of large 566 amounts of MOX; in the presence of methanol, MOX can reach 567 30% of the total soluble protein produced by these organisms (Giu-568 seppin et al., 1988). However, very little is known about this en-569 zyme among the basidiomycete and/or phytopathogenic fungal species. 570

571 In this study, we describe an extracellular methanol oxidase from the phytopathogenic basidiomycete species M. perniciosa. 572 573 The deduced 650 amino acid sequence shows 51-53% identity and 65-67% similarity to MOX from methylotrophic yeasts and 574 575 ascomycete species and 85-89% identity and 93-95% similarity to other basidiomycete species, indicating that this enzyme is 576 577 highly conserved among the basidiomycetes.

MOX is a classical peroxisomal enzyme. In methylotrophic 578 yeasts and ascomycetes, the enzyme is produced in the cytosol 579 580 as 70-75 kDa monomers and post-transcriptionally imported into 581 the peroxisomes, where they are assembled into active octamers 582 (Gunkel et al., 2004). The importation of the protein into the per-583 oxisomes is generally triggered by the recognition of peroxisome 584 targeting signals (PTS) present in the sequence of imported proteins by peroxin (PEX) receptors. PTS1, a C-terminal tripeptide mo-585 tif, that generally complies with the consensus sequence (S/A/C)(K/ 586 587 R/H)(L/M), is recognized by the protein Pex5p (Gould et al., 1987; 588 Waterham et al., 1997). PTS2, recognized by the peroxin Pex7p, 589 is a N-terminal sequence formed by a very general sequence, (R/ 590 K(L/V/I)X5(H/Q)(L/A), that is present in just a few peroxisomal en-591 zymes (Lazarow, 2006). M. perniciosa methanol oxidase, as shown 592 in Fig. 2, lacks both PTS1 and PTS2 sites, which is in agreement 593 with the enzyme activity assays and mass spectrometry analysis 594 showing that this enzyme is secreted to the extracellular space.

To date, the only described extracellular MOX belongs to the lig-595 nin-degrading basidiomycete G. trabeum (Daniel et al., 2007). How-596 597 ever, the protein sequence lacks any clear secretion signal. The 598 authors suggested that the differences in MOX targeting compared with the known yeast peroxisomal localization were traced to a 599 unique C-terminal sequence of the *G. trabeum* enzyme, which is 600 601 apparently responsible for the protein's extracellular translocation. 602 *M. perniciosa* MOX contains an identical C-terminal sequence when 603 compared to G. trabeum and predicted MOX from other basidiomy-604 cetes that are completely different from the known peroxisomal 605 MOX. Because M. perniciosa MOX also lacks a predicted secretion 606 signal, we suggest that its unique C-terminal sequence is the signal 607 component that leads to the translocation of this enzyme to a 608 secretory pathway, given that this is the only significant sequence 609 difference between *M. perniciosa* and other basidiomycete MOX 610 compared with the yeast and ascomycete peroxisomal mox genes.

611 In methylotrophic yeasts, methanol oxidase is regulated at the 612 transcriptional level by a repression and/or derepression mecha-613 nism (Ozimek et al., 2005). In P. angusta, the expression of mox is 614 subject to a strong carbon catabolite repression, as the mox gene 615 is completely repressed by growth on glucose; this substrate inhibits peroxisome proliferation, even in the presence of methanol. On 616 617 the other hand, mox transcripts are detected when cells are grown 618 on methanol or glycerol as the sole carbon sources (Roggenkamp et al., 1984; Veenhuis et al., 1983). In M. perniciosa, the Mp-mox gene 619 620 is detected when the mycelia is grown in vitro in glycerol and 621 strongly induced in the presence of methanol, in both biotrophic-622 like and necrotrophic mycelia (Fig. 4). However, gene repression 623 is not observed because the mycelia grown in glucose express *Mp-mox* at a similar magnitude as when grown in glycerol. 624

625 The analysis of the *M. perniciosa* genome revealed that the 626 fungus possesses all the genes classically related to the methanol degradation pathway (GenBank ID: JX024739-JX024749). RNA-627 seq-based transcriptome analysis showed that all of these genes 628 629 are upregulated in the necrotrophic mycelia supplemented with 630 methanol when compared to those supplemented with glycerol.

#### Table 4

Prediction of the subcellular localization of the enzymes involved in the methanol metabolism pathway in M. perniciosa. Catalase and pectin methylesterase are predicted as secreted; the other enzymes are predicted as cytoplasmatic, except for OAH, predicted as mitochondrial. However, MOX is as secreted protein, as show in Section 3.2, despite the absence of a predicted signal peptide. Abbreviations: cyto, cytoplasmatic; nucl, nuclear; pero, peroxisomal; extr, extracellular, mito, mitochondrial.

| Gene | SignalP | Psort prediction   | PeroxiP |
|------|---------|--|---------|
| MOX  | Ν       | cyto: 19.0, cyto_nucl: 11.5, pero: 4.0, nucl: 2.0          | Ν       |
| CAT  | Y       | extr: 23.0, mito: 3.0                                      | Ν       |
| FMDH | Ν       | cyto: 26.0   | Ν       |
| FDH  | Ν       | cyto: 15.5, cyto_nucl: 8.5, E.R.: 4.0, mito: 3.0,          | Ν       |
| DHAS | Ν       | cyto: 16.0, cyto_nucl: 9.5, pero: 5.0, extr: 3.0           | Ν       |
| DHAK | Ν       | cyto: 21.5, cyto_nucl: 11.5, extr: 5.0                     | Ν       |
| FBPA | Ν       | cyto: 24.5, cyto_nucl: 13.5                                | Ν       |
| FBPT | Ν       | cyto: 17.0, cyto_nucl: 15.3, cyto_mito: 10.5,<br>extr: 2.0 | Ν       |
| OAH  | Ν       | mito: 11.0, cyto: 5.0, plas: 3.0, extr: 3.0, pero: 3.0     | Ν       |
| PME  | Y       | extr: 26.0   | Ν       |

Based on the values of gene expression and the prediction of the 631 subcellular location of the methanol pathway enzymes, performed 632 by the software SignalP, PsortII and PeroxiP (Table 4), we propose a 633 peroxisome-independent model for methanol degradation in M. 634 perniciosa (Fig. 6). According to our model, the methanol released 635 by pectin demethylation is oxidized by an extracellular methanol 636 oxidase, generating formaldehyde and hydrogen peroxide. The peroxide generated may be degraded by an extracellular catalase (CAT) or by a secreted DyP peroxidase (PER), that uses iron ions as co factors. The resulting formaldehyde may be subjected to oxidation by the enzymes formaldehyde dehydrogenase (FMDH) and a NAD-dependent formate dehydrogenase (FDH), generating carbon dioxide. It may also be incorporated in the dihydroxyacetone (DHA) pathway, comprising the enzymes dihydroxyacetone synthase (DHAS), dihydroxyacetone kinase (DHAK), fructose-bisphosphate aldolase (FBPA) and fructose-bisphosphatase (FBPT), whose products are incorporated into the pentose phosphate pathway. One of the subproducts of the DHA pathway is glyceraldehyde 3phosphate, which can be a precursor for the synthesis of oxaloacetate. Oxaloacetate, an intermediate of the tricarboxylic acid cycle, is also a substrate for the enzyme oxaloacetate acetyl hydrolase (OAH), which generates oxalate. Oxalate is known for its capability to remove calcium ions from the structure of pectin, forming calcium oxalate crystals and allowing further enzymatic pectin degradation by PCWD (Guimaraes and Stotz, 2004). The production of calcium oxalate crystals by M. perniciosa necrotrophic mycelia has been previously reported (Rio et al., 2008).

As higher levels of gene expression may correlate to higher amounts of protein produced, we suggest that in *M. perniciosa*, the formaldehyde generated from methanol metabolism is preferentially metabolized by the enzymes FMDH and FDH due to the higher values of RPKM and the fold change when compared with the values of the DHA pathway. Formaldehyde metabolized by the DHA pathway is used in the production of cell constituents used for cell growth and proliferation; on the other hand, its use by FDH and FMDH generates NADH, used as an electron donor for the generation of energy. However, at least a part of the formaldehyde generated is metabolized by the DHA pathway, allowing M. perniciosa to grow in methanol as sole carbon source; if all the formaldehyde was metabolized by the FDH and FMDH pathway, no growth on methanol as the sole carbon source would be observed.

In methylotrophic yeasts, the peroxide generated in the peroxisomes by methanol oxidation is decomposed by a catalase (Yurimoto et al., 2011). Because M. pernciosa methanol metabolism occurs in the extracellular space, we investigated the presence of an extra-

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

B.V. de Oliveira et al./Fungal Genetics and Biology xxx (2012) xxx-xxx

9



**Fig. 6.** A peroxisome-independent model for the methanol metabolism pathway in *M. perniciosa*, which is induced at a transcriptional level in cultures supplemented with methanol when compared with cultures supplemented with glycerol. Enzyme abbreviations: MOX, methanol oxidase; CAT, catalase; PER, peroxidase; FMDH, formaldehyde dehydrogenase; FDH, NAD-dependent formate dehydrogenase; DHAS, dihydroxyacetone synthase; DHAK, dihydroxyacetone kinase; FBPA, fructose-bisphosphate aldolase; FBPT, fructose-bisphosphatase; OAH, oxaloacetate acetyl hydrolase, PME: pectin methyl esterase. GenBank ID: JX024739–JX024749. Substrate abbreviations: DHA, dihydroxyacetone; DHAP: dihydroxyacetone phosphate; GAP: glyceraldehyde 3-phosphate; FBP: fructose-1,6-bisphosphate; F6P: fructose 6-phosphate; Xu5P: xylulose 5-phosphate; OXA, oxaloacetate.

676 cellular catalase. As shown in Fig. 6, a catalase showing a clear predicted secretory signal (Table 4) is slightly induced in the presence 677 of methanol and its activity is detected in the fungal culture super-678 679 natants (data not shown), indicating a possible role in the degrada-680 tion of the peroxide generated. Moreover, M. perniciosa possesses 681 several peroxidases that are predicted to be secreted, which may 682 also participate in peroxide degradation. One of these peroxidases 683 is induced in the methanol RNA-seq libraries, as shown in Fig. 6. 684 A Dyp peroxidase, which uses iron ions as cofactors, shows a 4-fold 685 increase in its expression when M. perniciosa is supplemented with 686 methanol compared with supplemented with glycerol. In known 687 plant-pathogen models involving wood-degrading fungal species, such as Postia placenta, Phanerochaete chrysosporium and G. trabeum, 688 secreted peroxidases are related to lignin degradation (Daniel et al., 689 690 2007; Wymelenberg et al., 2010). Moreover, extracellular sources of 691 hydrogen peroxide, such as that generated by methanol oxidation are related to lignin degradation via the Fenton reaction: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + -692  $Fe^{2+} + H^{1+} = OH + Fe^{3+} + H_2O$ . The hydroxyl radicals generated by 693 694 this reaction ('OH) are able to penetrate the plant cells of infected hosts and act as depolymerizing agents, thus causing extensive cell 695 damage (Schlosser et al., 2000). The necrosis observed in the dry 696 697 broom phase of WBD as a consequence of plant cell death may be 698 caused by, among other factors, lignin degradation via peroxidases 699 and/or the Fenton reaction. Although M. perniciosa is not a classical 700 wood-degrading phytopathogen, studies have revealed that this species is probably derived from a saprotrophic ancestral (Aime 701 702 and Phillips-Mora, 2005; Tiburcio et al., 2010); thus, M. perniciosa 703 may have retained its ability to degrade wood.

As shown in Fig. 4, in addition to methanol, MOX expression is 704 also induced in the presence of esterified pectin. Our results show a 705 correlation between the expression of Mp-mox and Mp-pme in M. 706 perniciosa mycelia grown in esterified pectin, suggesting methanol 707 utilization provided by pectin degradation. Interestingly, both 708 genes also exhibit a transcriptional correlation in infected cacao 709 seedlings at the different stages of the progression of WBD that 710 were analyzed. In plants, one of the main sources of methanol is 711 pectin, which is the main constituent of primary cell walls and 712 the middle lamellae of higher plant cells (Nakagawa et al., 2000; 713 Pelloux et al., 2007). The differential expression of Mp-mox and 714 *Mp-pme* during the progression of WBD suggests an important role 715 for these genes in the development of the disease, especially during 716 the beginning of necrosis when the mycelia turn necrotrophic and 717 invade the plant cells. The higher relative expression of MOX and 718 PME, in conjunction with the lower level of methyl esterification 719 in the beginning of necrosis, as shown in Fig. 5 by a weak JIM7 720 labeling and strong JIM5 labeling (Fig. 5C: 3 and 7), may be key 721 steps in the beginning of cell invasion by the mycelia, given that 722 the activity of PME allows further action of other PCWD, such as 723 polygalacturonases and cellulases. 724

Although PMEs are constantly reported to be pathogenicity factors, because disruption of the *pme* gene in fungi like *B. cinerea* reduces virulence in their respective plant hosts (Valette-Collet et al., 2003), very little is known about the importance of MOX for pathogenicity. The only well-described case refers to the ascomycete fungus *C. fulvum*, in which the deletion of the methanol oxidase gene reduced its virulence in tomato leaves; however, the mecha-

Please cite this article in press as: de Oliveira, B.V., et al. A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. Fungal Genet. Biol. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2012.09.001

725

726

727

728

729

730

10

B.V. de Oliveira et al./Fungal Genetics and Biology xxx (2012) xxx-xxx

732 nism of MOX in the pathogenicity of this fungus remained uncer-733 tain (Segers et al., 2001). In phytopathogenicity, MOX has been re-734 lated to lignin degradation instead of the pectin degradation as 735 proposed in this work. In the wood-degrading basidiomycetes, 736 such as *P. placenta* and *G. trabeum*, MOX is suggested to generate 737 the hydrogen peroxide used for Fentońs reaction (Daniel et al., 738 2007; Martinez et al., 2009). Although we cannot discard the pos-739 sibility that MOX participates in Fentońs reaction, providing the extracellular hydrogen peroxide used for Fentońs reaction, our 740 data strongly suggest that M. perniciosa methanol oxidase is related 741 742 to the pectin degradation. Moreover, as M. perniciosa is able to grow on methanol as the sole carbon source and possesses the 743 744 complete pathway for methanol degradation, we also suggest that this fungus utilizes methanol as an energy source, similar to the 745 methylotrophic yeast species. This is in contrast to wood-degrad-746 747 ing fungal species, in which methanol degradation is only described as an provider of extracellular generator of hydrogen 748 749 peroxide (Daniel et al., 2007). Lastly, MOX also uses ethanol as a 750 substrate; in plants, ethanol is derived from fermentative growth 751 on sugars and used as a carbon source via acetaldehyde and the TCA cycle; however, we carefully inspected over 80 RNA-seq li-752 braries and have found no metabolism compatible with ethanol 753 754 production by the plant (data not shown); on the other hand, our 755 results show evidences for the presence of methanol and for that 756 reason we consider that this is the substrate utilized by the pro-757 posed pathway. The disruption of the *Mp-mox* and *Mp-pme* genes 758 from *M. pernciosa* would be a key next step in confirming the role of these two enzymes in the establishment of WBD and will be per-759 formed as soon as gene disruption techniques are developed for M. 760 761 perniciosa.

## 762 5. Conclusions

763 In this work, we demonstrate that *M. perniciosa* produces a 764 methanol oxidase that is secreted into the extracellular space. 765 The relative expression of this methanol oxidase *in vitro* and *in planta* is correlated with the *Mp-pme* expression levels and with 766 767 the reduction in the level of methyl esterification observed in in-768 fected cacao plants, suggesting that this fungus metabolizes the 769 methanol generated by pectin degradation. Moreover, we propose 770 a peroxisomal-independent methanol metabolism pathway for M. 771 perniciosa, which begins in the extracellular space and ends in 772 the cytosol.

## 773 Acknowledgments

We acknowledge the Mass Spectrometry Laboratory at Brazilian 774 775 Biosciences National Laboratory, CNPEM-ABTLuS, Campinas, Brazil 776 for their support with the mass spectrometry analysis. We also 777 thank Dr. Odalys Garcia Cabrera and Dr. Jorge Maurício Costa 778 Mondego for suggestions and critiques during the development 779 of the experiments, Marcelo Carazolle for bioinformatics support, 780 and Professor Marcos Buckeridge and Dr. Patrícia Pinho Tonini for the support with the immunolocalization experiments. This 781 work was financially supported by CNPq (Process Number: 782 472710/2008-7) and FAPESP (Process Numbers: 2006/59843-3, 783 2007/51030-6, and 2009/50119-9). 784

## 785 **References**

- Aime, M.C., Phillips-Mora, W., 2005. The causal agents of Witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. Mycologia 97, 1012–1022.
- Buckeridge, M.S., Reid, J.S., 1994. Purification and properties of a novel betagalactosidase or exo-(1→4)-beta-D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. Planta 192, 502–511.

- Daniel, G., Volc, J., Filonova, L., Plihal, O., Kubatova, E., Halada, P., 2007. Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in brown rot decay of wood. Appl. Environ. Microbiol. 73, 6241–6253.
- de Hoop, M.J., Ab, G., 1992. Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. Biochem. J. 286 (Pt 3), 657–669.
- de Souza, T.A., Soprano, A.S., de Lira, N.P., Quaresma, A.J., Pauletti, B.A., Paes Leme, A.F., Benedetti, C.E., 2012. The TAL effector PthA4 interacts with nuclear factors involved in RNA-dependent processes including a HMG protein that selectively binds poly(U) RNA. PLoS One 7, e32305.
- Delgado, J.C., Cook, A.A., 1976. Nuclear condition of basidia, basidiospores, and mycelium of Marasmius-Perniciosus. Can. J. Bot. Rev. Can. Bot. 54, 66–72.
- Evans, H.C., 1978. Witches broom disease of cocoa (Crinipellis-Perniciosa) in Ecuador 1. Fungus. Ann. Appl. Biol. 89, 185–192.
- Evans, H.C., 1980. Pleomorphism in Crinipellis-Perniciosa, causal agent of Witches broom disease of cocoa. Trans. Brit. Mycol. Soc. 74, 515–523.
- Evans, H.C., Bastos, C.N., 1980. Basidiospore germination as a means of assessing resistance to Crinipellis-Perniciosa (Witches broom disease) in cocoa cultivars. Trans. Brit. Mycol. Soc. 74, 525–536.
- Frias, G.A., Purdy, L.H., Schmidt, R.A., 1991. Infection biology of Crinipellis-Perniciosa on vegetative flushes of cacao, Plant Dis. 75, 552–556.
- Giuseppin, M.L., Van Eijk, H.M., Bes, B.C., 1988. Molecular regulation of methanol oxidase activity in continuous cultures of *Hansenula polymorpha*. Biotechnol. Bioeng. 32, 577–583.
- Gould, S.G., Keller, G.A., Subramani, S., 1987. Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. J. Cell Biol. 105, 2923–2931.
- Griffith, G.W., Hedger, J.N., 1994. The breeding biology of biotypes of the Witchesbroom pathogen of cocoa Crinipellis-Perniciosa. Heredity. 72, 278–289.
- Griffith, G.W., Nicholson, J., Nenninger, A., Birch, R.N., Hedger, J.N., 2003. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. NZ J. Bot. 41, 423–435.
- Guimaraes, R.L., Stotz, H.U., 2004. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. Plant Physiol. 136, 3703–3711.
- Gunkel, K., van Dijk, R., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., 2004. Routing of Hansenula polymorpha alcohol oxidase: an alternative peroxisomal protein-sorting machinery. Mol. Biol. Cell 15, 1347–1355.
- Han, Y., Joosten, H.J., Niu, W., Zhao, Z., Mariano, P.S., McCalman, M., van Kan, J., Schaap, P.J., Dunaway-Mariano, D., 2007. Oxaloacetate hydrolase, the C-C bond lyase of oxalate secreting fungi. J. Biol. Chem. 282, 9581–9590.
- Hanna, S.L., Sherman, N.E., Kinter, M.T., Goldberg, J.B., 2000. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Microbiology 146 (Pt 10), 2495–2508.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27, 137.
- Kaszycki, P., Koloczek, H., 2000. Formaldehyde and methanol biodegradation with the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* in a model wastewater system. Microbiol. Res. 154, 289–296.
- Langmead, B., 2010. Aligning short sequencing reads with Bowtie. Curr. Protoc. Bioinfor. Unit 11 7 (Chapter 11).
- Lazarow, P.B., 2006. The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. Biochim. Biophys. Acta 1763, 1599–1604.
- Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmoll, M., Kubicek, C.P., Ferreira, P., Ruiz-Duenas, F.J., Martinez, A.T., Kersten, P., Hammel, K.E., Wymelenberg, A.V., Gaskell, J., Lindquist, E., Sabat, G., BonDurant, S.S., Larrondo, L.F., Canessa, P., Vicuna, R., Yadav, J., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Pisabarro, A.G., Lavin, J.L., Oguiza, J.A., Master, E., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Harris, P., Magnuson, J.K., Baker, S.E., Bruno, K., Kenealy, W., Hoegger, P.J., Kues, U., Ramaiya, P., Lucash, S., Salamov, A., Shapiro, H., Tu, H., Chee, C.L., Misra, M., Xie, G., Teter, S., Yaver, D., James, T., Mokrejs, M., Pospisek, M., Grigoriev, I.V., Brettin, T., Rokhsar, D., Berka, R., Cullen, D., 2009. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 1954– 1959.
- Meinhardt, L.W., Bellato Cde, M., Rincones, J., Azevedo, R.A., Cascardo, J.C., Pereira, G.A., 2006. In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of Witches' broom disease of *Theobroma cacao*. Curr. Microbiol. 52, 191–196.
- Mondego, J.M., Carazzolle, M.F., Costa, G.G., Formighieri, E.F., Parizzi, L.P., Rincones, J., Cotomacci, C., Carraro, D.M., Cunha, A.F., Carrer, H., Vidal, R.O., Estrela, R.C., Garcia, O., Thomazella, D.P., de Oliveira, B.V., Pires, A.B., Rio, M.C., Araujo, M.R., de Moraes, M.H., Castro, L.A., Gramacho, K.P., Goncalves, M.S., Neto, J.P., Neto, A.G., Barbosa, L.V., Guiltinan, M.J., Bailey, B.A., Meinhardt, L.W., Cascardo, J.C., Pereira, G.A., 2008. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' broom disease of cacao. BMC Genom. 9, 548.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat. Methods 5, 621–628.
- Nakagawa, T., Miyaji, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N., 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., Tomizuka, N., 2005. Pectin utilization by the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. Microbiology 151, 2047–2052.
- Nemecek-Marshall, M., MacDonald, R.C., Franzen, J.J., Wojciechowski, C.L., Fall, R., 1995. Methanol emission from leaves (enzymatic detection of gas-phase

792 793

794

795

796

797

798

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939 940

941

942

943 944

945 946

947

948

949 950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

965

966

967

968

969

B.V. de Oliveira et al. / Fungal Genetics and Biology xxx (2012) xxx-xxx

methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development). Plant Physiol. 108, 1359-1368.

Orfila, C., Knox, J.P., 2000. Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. Plant Physiol. 122, 775-781.

Ozimek, P., Kotter, P., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., 2006. Hansenula polymorpha 883 and Saccharomyces cerevisiae Pex5p's recognize different, independent 884 peroxisomal targeting signals in alcohol oxidase. FEBS Lett. 580, 46-50. 885

Ozimek, P., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., 2005. Alcohol oxidase: a complex peroxisomal, oligomeric flavoprotein. FEMS Yeast Res. 5, 975-983.

Pelloux, J., Rusterucci, C., Mellerowicz, E.J., 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. Trends Plant Sci. 12, 267-277.

- 889 Penman, D., Britton, G., Hardwick, K., Collin, H.A., Isaac, S., 2000. Chitin as a measure 890 of biomass of Crinipellis perniciosa, causal agent of witches' broom disease of 891 Theobroma cacao. Mycol. Res. 104, 671-675.
- 892 Pereira, J.L., Ram, A., Figuereido, J.M., de Almeida, L.C., 1989. La primera aparición de 893 la "Escoba de Bruja" en la principal región productora de cacao del Brasil. 894 Turrialba 36, 459-461. 895
  - Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. Nucl. Acids Res. 29, e45.
- 897 Rincones, J., Scarpari, L.M., Carazzolle, M.F., Mondego, J.M., Formighieri, E.F., Barau, 898 J.G., Costa, G.G., Carraro, D.M., Brentani, H.P., Vilas-Boas, L.A., de Oliveira, B.V., 899 Sabha, M., Dias, R., Cascardo, J.M., Azevedo, R.A., Meinhardt, L.W., Pereira, G.A., 2008. Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the Witches' broom pathogen Moniliophthora perniciosa. Mol. Plant-Microbe Interact. 21, 891-908.
- Rio, M.C., de Oliveira, B.V., de Tomazella, D.P., Silva, J.A., Pereira, G.A., 2008. 904 Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete Moniliophthora 905 perniciosa, the causal agent of witches' broom disease of cacao. Curr. Microbiol. 906 56, 363-370.
- 907 Roggenkamp, R., Janowicz, Z., Stanikowski, B., Hollenberg, C.P., 1984. Biosynthesis 908 and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic 909 yeast Hansenula polymorpha. Mol. Gen. Genet. 194, 489-493.
- 910 Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for 911 biologist programmers. Methods Mol. Biol. 132, 365-386.
- 912 Sahm, H., Wagner, F., 1973. Microbial assimilation of methanol. The ethanol- and 913 methanol-oxidizing enzymes of the yeast Candida boidinii. Eur. J. Biochem. 36, 914 250-256.
- 915 Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., Vandamme, E.J., 1993. Pectin, pectinase and 916 protopectinase: production, properties, and applications. Adv. Appl. Microbiol. 917 39. 213-294.
- 918 Scarpari, L.M., Meinhardt, L.W., Mazzafera, P., Pomella, A.W., Schiavinato, M.A., 919 Cascardo, J.C., Pereira, G.A., 2005. Biochemical changes during the development 920 of Witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by 921 Crinipellis perniciosa. J. Exp. Bot. 56, 865-877.
- 922 Schlosser, D., Fahr, K., Karl, W., Wetzstein, H.G., 2000. Hydroxylated metabolites of 923 2,4-dichlorophenol imply a Fenton-type reaction in Gloeophyllum striatum. 924 Appl. Environ. Microbiol. 66, 2479-2483.

- Segers, G., Bradshaw, N., Archer, D., Blissett, K., Oliver, R.P., 2001. Alcohol oxidase is novel pathogenicity factor for Cladosporium fulvum, but aldehyde dehydrogenase is dispensable. Mol. Plant-Microbe Interact. 14, 367-377.
- Silva, S.D.V.M.K.M., 1999. Histologia da Interação Crinipellis perniciosa em Cacaueiros Suscetível e Resistente à Vassoura-de-Bruxa. Fitopatol. Bras. 24, 54-59.
- Thomazella, D.P., Teixeira, P.J., Oliveira, H.C., Saviani, E.E., Rincones, J., Toni, I.M., Reis, O., Garcia, O., Meinhardt, L.W., Salgado, I., Pereira, G.A., 2012. The hemibiotrophic cacao pathogen Moniliophthora perniciosa depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. New Phytol.
- Tiburcio, R.A., Costa, G.G., Carazzolle, M.F., Mondego, J.M., Schuster, S.C., Carlson, J.E., Guiltinan, M.J., Bailey, B.A., Mieczkowski, P., Meinhardt, L.W., Pereira, G.A., 2010. Genes acquired by horizontal transfer are potentially involved in the evolution of phytopathogenicity in Moniliophthora perniciosa and Moniliophthora roreri, two of the major pathogens of cacao. J. Mol. Evol. 70, 85-97.
- Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C., Boccara, M., 2003. Disruption of Botrytis cinerea pectin methylesterase gene Bcpme1 reduces virulence on several host plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 16, 360-367.
- Van der Klei, I.J., Bystrykh, L.V., Harder, W., 1990. Alcohol oxidase from Hansenula polymorpha CBS 4732. Methods Enzymol. 188, 420-427.
- Veenhuis, M., Van Dijken, J.P., Harder, W., 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. Adv. Microb. Physiol. 24, 1-82.
- Vidal, R.O., Mondego, J.M., Pot, D., Ambrosio, A.B., Andrade, A.C., Pereira, L.F., Colombo, C.A., Vieira, L.G., Carazzolle, M.F., Pereira, G.A., 2010. A highthroughput data mining of single nucleotide polymorphisms in Coffea species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid Coffea arabica. Plant Physiol. 154, 1053-1066.
- Waterham, H.R., Russell, K.A., Vries, Y., Cregg, J.M., 1997. Peroxisomal targeting, import, and assembly of alcohol oxidase in Pichia pastoris. J. Cell Biol. 139, 1419-1431.
- Willats, W.G., Limberg, G., Buchholt, H.C., van Alebeek, G.J., Benen, J., Christensen, T.M., Visser, J., Voragen, A., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., 2000. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. Carbohydrate Res. 327, 309-320.
- Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J.P., 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. Plant Mol. Biol. 47, 9-27.
- Wymelenberg, A.V., Gaskell, J., Mozuch, M., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., Mansfield, S.D., Blanchette, R.A., Martinez, D., Grigoriev, I., Kersten, P.J., Cullen, D., 2010. Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi Postia placenta and Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 76, 3599-3610.
- Yurimoto, H., Komeda, T., Lim, C.R., Nakagawa, T., Kondo, K., Kato, N., Sakai, Y., 2000. Regulation and evaluation of five methanol-inducible promoters in the methylotrophic yeast Candida boidinii. Biochim. Biophys. Acta 1493, 56-63.
- Yurimoto, H., Oku, M., Sakai, Y., 2011. Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis. Int. J. Microbiol. 2011, 101298.

970 971 972

878

879

880

881

882

886

887

888

900 903

901 902

# **CAPÍTULO IV**

# Secretoma de *M. perniciosa*

Bruno V de Oliveira, Gustavo C. Lacerda, Leandro C. Nascimento, Adriana F Paes-Leme, Gonçalo AG Pereira.

## 1. Justificativa

Apesar de o estudo do secretoma de *M. perniciosa* não ter sido um dos objetivos iniciais da presente tese de doutorado, várias análises do secretoma do mesmo foram realizadas inicialmente com o objetivo de provar que a metanol oxidase produzida pelo fungo era secretada, como mostrado no capítulo 3. Como o estudo do secretoma de fungos tem sido bastante importante na descoberta de possíveis fatores de patogenicidade, na validação de genes com funções desconhecidas e na busca de enzimas com potencial biotecnológico, como discutido anteriormente, decidimos aproveitar os experimentos envolvendo espectrometria de massas que estávamos desenvolvendo para realizarmos uma análise global preliminar do secretoma de *M. perniciosa*.

## 2. Introdução

O estudo do proteoma extracelular, ou secretoma, de fungos fitopatogênicos é de fundamental importância, visto que proteínas secretadas são liberadas por fungos como uma resposta inicial ao seu hospedeiro; dessa forma, esse *pool* de proteínas é um dos responsáveis pelo sucesso do estabelecimento do processo infeccioso e do desenvolvimento de doenças em plantas [1]. Todos os fungos fitopatogênicos secretam um arsenal de enzimas com as mais distintas funções durante o processo infeccioso; dessa forma, o estudo do secretoma de fungos fitopatogênicos ganhou bastante importância nos últimos anos, principalmente na busca de fatores de patogenicidade [2].

Até o a década passada, o estudo de proteínas secretadas era feito primordialmente de forma manual, devido a várias limitações técnicas até então existentes [3]. A maioria dos trabalhos publicados na área estudavam proteínas isoladas por eletroforese bidimensional: o secretoma era separado em um gel de 2D de poliacrilamida, os *spots* de interesse eram isolados e submetidos a espectrometria de massas para serem identificados . Apesar de um grande esforço técnico realizado, devido à dificuldade de se realizar a eletroforese bidimensional, poucas proteínas eram realmente identificadas .

Com os avanços recentes obtidos em espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta pressão, bioinformática, além da disponibilidade de vários genomas sequênciados, o estudo dos secretomas de fungos passou a ser realizado em larga escala. O secretoma de vários fungos filamentosos, como *Aspergillus oryzae, Fusarium graminearum, Aspergillus nidulans* e *Aspergillus niger* [4-8] foram analisados em larga escala nos últimos anos. A maioria desses trabalhos mostra que a

expressão de proteínas secretadas por fungos depende tanto da forma em que o fungo foi cultivado como da fase do ciclo de vida analisado.

O fungo *Botrytis cinerea*, patogênico para mais de 200 espécies de plantas, teve seu secretoma analisado em sua fase micelial na presença de extratos de tomate, morango e *Arabdopsis thaliana*. Foram identificadas 89 proteínas, dentre as quais várias se encontravam diferencialmente expressas nas diferentes condições analisadas [1]. Um trabalho semelhante foi realizado com os conídios da mesma espécie; no entanto, mesmo na presença de diferentes extratos de plantas, não houve identificação de proteínas diferencialmente expressas; os autores concluíram que nessa fase do ciclo de vida do fungo, *B. cinerea* produz o mesmo conjunto de proteínas mesmo sob diferentes condições [3]. Em ambos os trabalhos, foram identificadas várias proteínas ligadas ao metabolismo de carboidratos, peptidades, enzimas degradadoras de parede vegetal e várias proteínas consideradas fatores de patogenicidade.

Além da busca por fatores de patogenicidade, o estudo do secretoma de fungos tem sido importante na descoberta e na validação de proteínas preditas com função ainda desconhecida. O fungo *Phanerochaete chrysosporium*, uma espécie saprotrófica de madeira, teve seu secretoma analisado em meios contendo lignina ou celulose como fontes de carbono. Dentre as proteínas idenficadas, 54 delas representavam proteínas com função desconhecida, mas que se encontravam diferencialmente expressas nas condições testadas. Os autores concluíram que, apesar de serem proteínas com funções ainda desconhecida, o aumento de sua expressão na presença de celulose ou liginina indica que estas enzimas podem estar ligadas à degradação desses compostos durante o processo de degradação de madeira [9].

Por fim, o estudo dos secretomas de fungos também tem sido focado na descoberta de enzimas com potencial biotecnológico [10].

## 3. Objetivos

O objetivo dessa etapa do trabalho é a análise global do secretoma do micélio necrotrófico de *M. perniciosa* crescido sob diferentes condições de cultivo.

## 4. Material e métodos

4.1. Isolado de M. perniciosa
Para todos os experimentos realizados nessa etapa do trabalho, foi utilizado o isolado FA553 de *M. perniciosa* [11], o qual é derivado da linhagem CP02 [12], a qual foi utilizada para o sequênciamento do genoma do fungo. Esse isolado é mantido em nosso laboratório em meio MYEA (malte, extrato de levedura, ágar) a uma temperatura de 28°C.

#### 4.2. Preparação das amostras para análise em espectrometria de massas

Para esse experimento, o micélio necrotrófico de *M. pernciosa* foi crescido no meio proposto por Meindhart *et al.* [13], o qual possui glicerol como fonte púnica de carbono, por 7 dias, a 28° C, sob uma agitação constante de 150 rpm. Após esse período, os micélios foram filtrados e lavados por duas vezes em água destilada estéril, para eliminar os resquícios do meio de cultura, e transferidos para uma nova alíquota do mesmo meio de cultura, no qual se variaram apenas as fontes de carbono. Foram utilizadas as seguintes fontes de carbono, na concentração final de 1% (v/v), em triplicatas biológicas: glicerol, glicose, metanol, pectina com 90% de metilesterificação e extrato de cacau. Os micélios foram incubados por um período de 72 horas.

Após esse período, o micélio foi separado do meio através de papel filtro. O meio foi filtrado novamente através de filtros de seringa com poros de 0, 22 μm (Millipore). Um volume de 100 mL do sobrenadante de cada cultura foi concentrado aproximadamente 100 vezes através do sistema *Amicon Ultra-4 10 kDa* (Millipore); o volume final obtido (aproximadamente 1 mL) foi submetido à quantificação das proteínas presentes através do método de Bradford.

A um volume de sobrenadante concentrado contendo 20 μg de proteínas foi adicionado bicarbonato de amônio (solução 50 mM) pra um volume final de 100 μL e um volulme igual de ureia 8M. Essa solução foi reduzida em DDT, em uma concentração final de 5 mM, a 56 °C por 25 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, realizou-se a alquilação com iodoacetomida, em uma concentração final de 14 mM; essa solução foi mantida no escuro por 30 minutos. Esse volume foi então diluído com uma solução bicarbonato de amônio até que a concentração final de ureia atingisse 1,6 M. Finalmente, foi adicionado cloreto de cálcio pra um volume final de 1 mM e 0,5 μg da enzima *Sequencing grade modified trypsin* (Promega), para a digestão das proteínas. A digestão ocorreu a 37 °C por 16 horas.

Após a digestão, a reação foi interrompida com a adição de ácido trifluoracético até que o PH da solução ficasse abaixo de 2,0. A amostra foi então dessalinizada na coluna Sep-Pak® Vac tC18 cartridge

*1cc/100mg* 37-55 $\mu$ m (Waters), de acordo com o protocolo do fabricante. As proteínas foram eluídas em uma solução de acetonitrila e ácido fórmico, liofilizadas no *speed vac* e ressuspendidas em 20  $\mu$ L de ácido fórmico 0,1%.

Um volume de 4,5 µL da solução resultante de peptídeos (correspondente a cerca de 4,5 µg de proteína) foi submetido ao espectrômetro de massas do tipo LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific) conectado to à cromatografia liquida do tipo nanoflow (LC-MS/MS) pelo simstma *EASY-nLC* (Proxeon Biosystem), através de uma fonte de ionização do tipo *Proxeon nanoelectrospray*. Os peptídeos foram separados em um gradiente de acetonitrila variando entre 2-90% em ácido fórmico 1% usando uma précoluna EASY-Column (2 cm X id 100 µm, tamanho da partícula de 5 µm) e uma coluna analítica EASY-Column (10 cm X id 75 µm, tamanho da partícula de 3 µm) em uma vazão de 300 nl/min por 45 minutos. A voltagem do nanoelectrospray utilizada foi de 1.7 kV, e a temperatura da fonte foi de 275°C. Os espectros MS (m/z 300–2,000) foram adquiridos no analisador Orbitrap após o acúmulo de um valor alvo de 1e<sup>6</sup>. Foi utilizada a resolução r=60000 e os 20 peptídeos com maior intensidade com carga ≥2 foram isolados e fragmentados [14].

As listas de picos gerados (msf) foram geradas a partir dos dados brutos obtidos (arquivos RAW) através do programa *Proteome Discoverer* 1.3 (Thermo Fisher Scientific) . Através da ferramenta Sequest, foram realizadas buscas no bando de proteínas preditas de *M. perniciosa* (17012 sequências). Os parâmetros utilizados para a busca foram: carbamidomethylation (+57.021 Da) como modificação fixa, oxidação da metionina (+15.995 Da) como modificação variável, e uma tolerância de 10 ppm para o precursor e de 1 Da para íons fragmentados, filtrados através do xcorr (+1>1.8, +2>2.2, +3>2.5 and +4>3.5).

Essa etapa do trabalho foi realizada em parceria com a pesquisadora Adriana Paes Leme, líder do Laboratório de Espectrometria de Massas do LNBio, localizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

#### 5. Resultados preliminares

A partir das amostras analisadas, foi possível a identificação de 638 proteínas de *M. perniciosa* nos extratos extracelulares testados. A tabela 1 anexa mostra a identidade das 50 proteínas identificadas

com maior número de espectros, e a quantidade de espectros identificados por proteína em cada uma das amostras.

Este trabalho começou a ser realizado recentemente e ainda não foi possível uma análise mais aprofundada do secretoma de *M. perniciosa*, o que deverá ser realizado nos próximos meses.

Focaremos nossas análises nos seguintes pontos:

- Cruzaremos os dados experimentais obtidos com o proteoma secretado predito pelo nosso grupo de bioinformática, que possui cerca de 1500 proteinas preditas como secretadas.
- Compararemos a expressão das proteínas em extrato de cacau, condição que mimetiza
  o fungo crescendo *in planta*, com as outras condições, na busca de proteínas mais
  expressas na presença de extrato de cacau, as quais poderiam funcionar como fatores
  de patogenicidade.
- Validação de no hits preditos
- Busca por proteínas com potencial biotecnológico
- Validar o proteoma

**Tabela 1**: As 50 proteínas identificadas com maior número de espectros no secretoma de M. perniciosa. Amostras: G, glicerol; D, glicose; M, metanol; P, pectina; C, extrato de cacau. Cada amostra foi analisada em triplicatas biológicas, exceto a amostra D.

| Gene ID | G1 | G2  | G3 | D1 | D2 | M1 | M2 | М3 | P1 | P2 | P3 | C1 | C2  | C3 |
|---------|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|
| MP09984 | 95 | 107 | 91 | 60 | 71 | 74 | 89 | 68 | 53 | 56 | 57 | 31 | 51  | 53 |
| MP01981 | 57 | 39  | 45 | 38 | 53 | 34 | 50 | 41 | 31 | 36 | 28 | 11 | 27  | 33 |
| MP11699 | 38 | 50  | 40 | 44 | 74 | 56 | 68 | 50 | 55 | 44 | 44 | 43 | 100 | 71 |
| MP11310 | 68 | 93  | 89 | 49 | 43 | 29 | 46 | 45 | 32 | 31 | 25 | 33 | 55  | 51 |
| MP03938 | 38 | 26  | 17 | 28 | 27 | 70 | 53 | 52 | 52 | 65 | 50 | 17 | 44  | 46 |
| MP02023 | 27 | 19  | 9  | 20 | 32 | 28 | 41 | 30 | 28 | 35 | 29 | 17 | 40  | 40 |
| MP13914 | 44 | 48  | 43 | 24 | 19 | 40 | 34 | 35 | 22 | 20 | 29 | 26 | 53  | 59 |
| MP07816 | 7  | 44  | 13 | 9  | 12 | 60 | 35 | 39 | 48 | 42 | 37 | 3  | 8   | 13 |
| MP12828 | 49 | 45  | 39 | 35 | 51 | 25 | 31 | 29 | 41 | 54 | 51 | 13 | 28  | 21 |
| MP13332 | 17 | 20  | 19 | 22 | 23 | 13 | 18 | 13 | 19 | 9  | 12 | 10 | 21  | 13 |
| MP14534 | 19 | 27  | 15 | 16 | 17 | 36 | 23 | 25 | 23 | 25 | 23 | 9  | 14  | 26 |
| MP05181 | 48 | 20  | 34 | 16 | 18 | 20 | 20 | 17 | 18 | 12 | 14 | 7  | 6   | 16 |
| MP02072 | 11 | 10  | 9  | 13 | 13 | 25 | 18 | 14 | 16 | 17 | 20 | 8  | 7   | 9  |
| MP07479 | 17 | 9   | 11 | 7  | 12 | 10 | 12 | 11 | 13 | 11 | 16 | 6  | 6   | 12 |
| MP00133 | 17 | 32  | 15 | 12 | 25 | 19 | 19 | 17 | 23 | 16 | 19 | 9  | 20  | 7  |
| MP14186 | 8  | 9   | 7  | 14 | 20 | 14 | 19 | 12 | 8  | 16 | 13 | 6  | 6   | 5  |
| MP04492 | 3  | 6   | 4  | 5  | 8  | 9  | 10 | 16 | 5  | 5  | 2  | 1  | 4   | 3  |
| MP14583 | 5  | 5   | 4  | 7  | 13 | 9  | 6  | 7  | 7  | 6  | 6  | 6  | 8   | 6  |
| MP12511 | 12 | 12  | 13 | 8  | 8  | 19 | 10 | 11 | 13 | 12 | 9  | 7  | 9   | 12 |
| MP02749 | 9  | 25  | 11 | 14 | 22 | 17 | 14 | 20 | 11 | 12 | 10 | 10 | 24  | 22 |
| MP11960 | 18 | 22  | 18 | 12 | 10 | 14 | 20 | 18 | 12 | 14 | 12 | 12 | 9   | 7  |
| MP12945 | 6  | 9   | 5  | 14 | 24 | 7  | 14 | 9  | 15 | 12 | 15 | 7  | 7   | 9  |
| MP04497 | 11 | 9   | 9  | 7  | 14 | 13 | 6  | 13 | 12 | 7  | 10 | 6  | 11  | 7  |
| MP13316 | 7  | 16  | 4  | 5  | 5  | 3  | 6  | 5  | 4  | 5  | 4  | 2  | 1   | 4  |
| MP08111 | 7  | 2   | 2  | 19 | 30 | 15 | 16 | 19 | 12 | 12 | 15 | 14 | 20  | 16 |
| MP09744 | 4  | 8   | 4  | 8  | 15 | 8  | 8  | 9  | 4  | 4  | 3  | 6  | 11  | 10 |
| MP16204 | 2  | 9   | 3  | 9  | 7  | 12 | 9  | 9  | 7  | 5  | 3  | 2  | 7   | 7  |
| MP09028 | 11 | 15  | 13 | 23 | 24 | 12 | 10 | 14 | 2  | 3  | 1  | 14 | 22  | 25 |
| MP07134 | 5  | 11  | 5  | 16 | 12 | 6  | 11 | 10 | 9  | 10 | 8  | 13 | 17  | 11 |
| MP14966 | 13 | 8   | 18 | 12 | 11 | 10 | 13 | 13 | 10 | 11 | 11 | 9  | 10  | 9  |
| MP02308 | 2  | 12  | 2  | 5  | 9  | 17 | 15 | 9  | 11 | 15 | 9  | 1  | 2   | 6  |
| MP07557 | 14 | 35  | 25 | 13 | 8  | 8  | 6  | 11 | 3  | 9  | 3  | 7  | 20  | 12 |
| MP16518 | 2  | 7   | 9  | 19 | 16 | 4  | 7  | 5  | 4  | 5  | 9  | 13 | 9   | 11 |
| MP15709 | 6  | 17  | 11 | 12 | 15 | 12 | 8  | 10 | 4  | 5  | 4  | 5  | 9   | 15 |
| MP02068 | 6  | 5   | 7  | 10 | 6  | 9  | 9  | 8  | 11 | 8  | 6  | 3  | 7   | 12 |
| MP08767 | 7  | 8   | 6  | 6  | 7  | 3  | 6  | 4  | 11 | 7  | 7  | 8  | 11  | 9  |
| MP14764 | 12 | 14  | 11 | 9  | 11 | 1  | 1  | 2  | 11 | 14 | 14 | 4  | 10  | 5  |
| MP13615 | 1  | 2   | 0  | 2  | 3  | 7  | 6  | 1  | 5  | 3  | 2  | 3  | 1   | 5  |
| MP09869 | 13 | 7   | 14 | 6  | 10 | 7  | 5  | 2  | 4  | 9  | 7  | 1  | 5   | 4  |
| MP02513 | 2  | 11  | 11 | 3  | 3  | 4  | 2  | 3  | 2  | 8  | 2  | 3  | 6   | 5  |
| MP01488 | 1  | 3   | 1  | 9  | 13 | 8  | 5  | 5  | 8  | 8  | 5  | 7  | 7   | 11 |
| MP08087 |    | _   | 0  | 2  | 4  | 15 | 17 | 25 | 2  | 1  | 2  | 1  | 2   | 0  |
| MP14325 | 1  | 5   | 2  | 8  | 6  | 3  | 2  | 1  | 2  | 1  | 1  | 16 | 19  | 13 |
| MP12589 | 1  | 6   | 2  | 3  | 6  | 3  | 10 | 7  | 3  | 2  | 4  | 5  | 6   | 8  |
| MP15427 | 2  | 2   | 5  | 4  | 4  | 7  | 1  | 4  | 7  | 5  | 4  | 3  | 6   | 5  |
| MP05010 | 14 | 5   | 10 | 2  | 3  | 6  | 5  | 3  | 9  | 12 | (  | 5  | (   | 8  |
| MP05186 | 2  | 3   | 2  | 1  | 0  | 3  | 7  | 2  | 2  | 3  | 4  | ~  | 0   | 0  |
| MP13942 | 3  | (   |    | 4  | 18 | 5  | 4  | 4  | 2  | 1  | 0  | 8  | 8   | 1  |

#### 6. Referências

- Punit JAAI, Ron Orlando, Hind El Mubarek, Gopi K. Podila, and, Davis MR: Comparative Proteomic Analysis of *Botrytis cinerea* Secretome. *Journal of Proteome Research* 2009, 8(3).
- Fernandez-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Carbu M, Camafeita E, Garrido C, Lopez JA, Jorrin J, Cantoral JM: Proteomic analysis of phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* as a potential tool for identifying pathogenicity factors, therapeutic targets and for basic research. *Arch Microbiol* 2007, 187(3):207-215.
- Espino JJ, Gutierrez-Sanchez G, Brito N, Shah P, Orlando R, Gonzalez C: The *Botrytis cinerea* early secretome. *Proteomics* 2008, 10:3020-3034.
- Oda K, Kakizono D, Yamada O, lefuji H, Akita O, Iwashita K: Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72(5):3448-3457.
- 5. Kim Y, Nandakumar MP, Marten MR: **Proteomics of filamentous fungi** *Trends in biotechnology* 2007, **25**(9):395-400.
- Paper JM, Scott-Craig JS, Adhikari ND, Cuomo CA, Walton JD: Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium* graminearum. Proteomics 2007, 7(17):3171-3183.
- Saykhedkar S, Ray A, Ayoubi-Canaan P, Hartson SD, Prade R, Mort AJ: A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover. *Biotechnol Biofuels* 2012, 5(1):52.
- Lu X, Sun J, Nimtz M, Wissing J, Zeng AP, Rinas U: The intra- and extracellular proteome of Aspergillus niger growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microb Cell Fact* 2010, 9(23).
- Vanden Wymelenberg A, Gaskell J, Mozuch M, Sabat G, Ralph J, Skyba O, Mansfield SD, Blanchette RA, Martinez D, Grigoriev I *et al*: Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi Postia placenta and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 2010, 76(11):3599-3610.

- 10. Bouws H, Wattenberg A, Zorn H: Fungal secretomes—nature's toolbox for white biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, **80**(3):381-388.
- 11. Garcia O, Macedo JA, Tiburcio R, Zaparoli G, Rincones J, Bittencourt LM, Ceita GO, Micheli F, Gesteira A, Mariano AC *et al*: Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycol Res* 2007, 111(Pt 4):443-455.
- Rincones J, Meinhardt LW, Vidal BC, Pereira GAG: Electrophoretic karyotype analysis of Crinipellis perniciosa, the causal agent of witches' broom disease of Theobroma cacao. *Mycological Research* 2003, 107:452-458.
- Meinhardt LW, Bellato Cde M, Rincones J, Azevedo RA, Cascardo JC, Pereira GA: In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Curr Microbiol* 2006, 52(3):191-196.
- 14. de Souza TA, Soprano AS, de Lira NP, Quaresma AJ, Pauletti BA, Paes Leme AF, Benedetti CE: The TAL effector PthA4 interacts with nuclear factors involved in RNA-dependent processes including a HMG protein that selectively binds poly(U) RNA. PLoS One 2012, 7(2):e32305.

#### Conclusões gerais

- *M. perniciosa* produz cristais de oxalato de cálcio *in vitro*.
- As catalases de *M. perniciosa* são diferencialmente expressas tanto *in vitro* quando *in planta*.
- *M. perniciosa* produz uma metanol oxidase secretada para o meio extracelular, o qual caracterizaria um metabolismo de metanol independente de peroxissomos.

#### Perspectivas

 Análise detalhada do secretoma de *M. perniciosa*. A quantidade de dados geradas é suficiente para uma publicação, no entanto são necessárias ainda várias análises, além da validação do proteoma.
 Pretendemos realizar essas análises e submeter um manuscrito até o final do ano. Apêndice 1: Desenvolvimento de um protocolo de transformação para Moniliophthora roreri

#### Resumo

Durante o período entre março e agosto de 2010, foi realizado de um estágio de doutorado sanduíche nos Estados Unidos, no *Sustainable Perennial Crops Laboratory* (SPCL), na *facility* do USDA (*United States Departament of Agriculture*) localizada no estado de Maryland. Nosso laboratório possui uma parceria com o SPCL no desenvolvimento do projeto temático FAPESP intitulado "Estudo integrado e comparativo de três doenças fúngicas do cacau - vassoura-de-bruxa, monilíase e mal do facão - visando à compreensão de mecanismos de patogenicidade para o desenvolvimento de estratégias de controle", no qual a presente tese de doutorado se enquadra. Durante esse período, foi desenvolvido o primeiro protocolo de transformação para *M. roreri*. A linhagem AGL-1 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor binário pBGgHG foi utilizada para transformar a linhagem M2977 de *Moniliophthora roreri*. O vetor pBGgHG apresenta o gene marcador de resistência a Higromicina B (hph, higromicina fosfotransferase), além do gene repórter eGFP (proteína fluorescente verde), ambos flanqueados pelo promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Colônias resistentes à higromicina foram obtidas através da técnica de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Esse resultado abre a porta para futuros estudos de genética funcional em *M. roreri*.

#### 1. Introdução

#### 1.1. O fungo Moniliophthora roreri a monilíase do cacaueiro

A monilíase (em inglês, *frosty pod rot*) é uma doença do cacaueiro, causada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora roreri* [1], presente em países do noroeste da América do Sul e da América Central [2].

Os primeiros relatos do aparecimento da monilíase datam do início do século XX, quando essa doença causou grandes perdas na produção cacaueira do Equador, maior produtor de cacau na época

[3]. Apesar de primeiramente descrita no Equador, a Colômbia é hoje considerada o centro de origem dessa doença, pois é aí em que se encontra uma maior variabilidade genética de *M. roreri* [1].

Até o início da década de 50, a presença dessa doença só havia sido detectada no Equador, na Colômbia e na Venezuela [4]. No entanto, nos últimos 55 anos, a monilíase se espalhou para vários países da América central, como Costa Rica (1978) [5], Nicarágua (1980) [6], Honduras (1997) [7], Belize (2004) [8], finalmente chegando ao México em 2005 [9].

No Brasil, ainda não existem relatos da presença desta doença. A cordilheira dos Andes parece ter atuado como uma barreira natural efetiva contra a disseminação da doença, mas o fato de ela já ter sido encontrada em regiões próximas da fronteira, como na região de Madre de Dios (Peru) (à cerca de 600 km da fronteira com os estados de Acre e Amazonas), parece indicar que a introdução desta doença pode ocorrer num futuro próximo em nosso país [2]. Esta distância é relativamente pequena levando-se em conta a disseminação eficiente deste patógeno pelo vento e através de cursos de água. Estima-se que nas últimas três décadas, a doença de espalhou a uma distância de cerca de 2500 km. Estes fatos definem a monilíase como uma séria ameaça para a cacauicultura no Brasil [10], e sua introdução no país causaria grandes estragos nas plantações de cacau, especialmente nas regiões produtoras do estado da Bahia devido à pouca diversidade genética do cacau pelo uso de clones resistentes à vassoura de bruxa.

Esporos de *Moniliophthora roreri* infectam unicamente frutos em qualquer estágio de desenvolvimento; no entanto, frutos jovens (com até 3 meses de idade) apresentam uma suscetibilidade bem maior ao fungo do que frutos maduros. Os frutos que são infectados jovens geralmente morrem. Os que têm sua infecção no estado mais tardio geralmente apresentam sintomas externos de necrose e a podridão completa das sementes, inviabilizando o uso das mesmas para a produção de chocolate [11].

Assim como *M. perniciosa*, *M. roreri* é considerado um fungo hemibiotrófico, tendo uma fase biotrófica uninuclear e uma fase necrotrófica dinucleada. No entanto, nunca foi observado o crescimento de hifas uninucleadas *in vitro*. Alem disso, *M. roreri* não produz basidiocarpos. Os esporos são produzidos em conídios modificados. Os frutos infectados por *M. roreri* apresentam um pó de coloração cinzenta, contendo os esporos do fungo (Figura 1). O número de esporos é muito grande chegando a atingir 44 milhões de esporos por centímetro quadrado de fruto [12].



Figura 1: Frutos de cacau infectados por *M. roreri* 

#### 1.2. Transformação em fungos

Nos últimos anos, a quantidade de sequências genômicas e de genomas completos de fungos aumentou consideravelmente, devido ao surgimento de técnicas de sequênciamento em larga escala. Essa grande quantidade de sequências genômicas, aliadas a dados de transcriptoma e proteoma, fez com que surgissem várias novas hipóteses sobre a função biológica de genes presentes nos fungos sequênciados. A grande maioria dessas hipóteses são baseadas na anotação das sequências, a qual é feita a partir similaridade das mesmas com sequências de genes previamente caracterizados. No entanto, uma simples análise de similaridade de sequências não é suficiente para se caracterizar a função biológica de um gene. Isso se torna ainda mais problemático visto que grande parte dos genes encontrados em genomas de fungos não possuem similaridade com nenhuma outra sequência já existente nos bancos de dados (*no hits*) ou são similares com sequências com funções ainda desconhecidas (*unknowns*). Dessa forma, a melhor maneira de se estudar a função de um gene é a genética reversa, a partir da qual as consequências fenotípicas da inativação do gene estudado são analisadas.

Diversas estratégias para a inativação de genes de interesse têm sido desenvolvidas para o estudo funcional de genes em fungos. As duas principais técnicas de silenciamento gênico são a disrupção do gene alvo através de recombinação homóloga e o silenciamento pós-transcricional mediado por interferência por RNA (RNAi).

No entanto, a aplicação tanto de técnicas de disrupção gênica quanto de silenciamento póstranscricional dependem da existência de um protocolo de transformação eficiente, a qual permita a entrada de material genético exógeno nas células estudadas.

Quatro técnicas são as mais amplamente usadas para a transformação em fungos. São elas: transformação de protoplastos mediada por polietilenoglicol (PEG), eletroporação, biobalística e

transformação mediada por Agrobacterium tumefaciens.

Até o ano de 1998, quando o grupo composto por Groot e colaboaradores [13] adaptou a técnica de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para fungos, a técnica mais amplamente usada era a transformação de protoplastos mediada por PEG e cloreto de cálcio. No entanto, essa técnica se mostra bastante problemática devido à dificuldade de se produzir protoplastos e depois regenerá-los, alem da baixa taxa de transformação [14]. Eletroporação e biobalística já foram usados para a transformação de fungos como *Aspergillus giganteus*, apesar a baixa taxa de transformação e instabilidade dos transformantes [14]. A partir de 1998, a transformação mediada por *A. tumefaciens* se tornou a principal técnica para transformação em fungos [15].

As agrobactérias são bactérias patogênicas para plantas, capazes de manipular o material genético da planta hospedeira através da transferência do T-DNA, um fragmento do plasmídio Ti por elas carregado [16].

O plasmídio Ti é caracterizado por ser uma molécula de DNA circular e fechada contendo aproximadamente 100 genes, sendo o T-DNA uma região com cerca de 20.000 pares de bases delimitados em cada extremidade por uma sequência repetida de 25 pares de bases. A existência dessas bordas é essencial para a transferência do T-DNA [17]. Dentre os genes encontrados no T-DNA estão os responsáveis por codificar enzimas relacionadas com a síntese de hormônios vegetais e opinas.

A Agrobacterium tumefaciens apresenta grande importância em processos de transformação por ser um organismo com capacidade de transferência gênica, através do plasmídio Ti. Protocolos para a agrotransformação de plantas têm sido amplamente desenvolvidos nos últimos anos, tanto para plantas dicotiledôneas, como Arabidopsis thaliana [18] e soja [19], quanto para monocotiledôneas, como milho [20] e arroz [21].

Como citado anteriormente, a habilidade de transformação de fungos filamentosos teve um grande progresso com a adequação da transformação mediada por *A. tumefaciens* realizada por Groot e colaboradores. O grupo obteve sucesso na transformação de vários fungos filamentosos, dentre os quais estão *Neurospora crassa e Agaricus bisporus* [13].

A transformação de *Aspergillus carbonarius* via *A. tumefaciens* [22] é um exemplo recente de sucesso da utilização deste método, sendo que foi obtida uma taxa de até 62,2 transformantes/10<sup>5</sup> conídios. A transformação de conídios e protoplastos de *Trichoderma reesei* via *Agrobacterium* 

*tumefaciens* [23] também apresentou alta eficiência: 2000-9000 transformantes por 10<sup>7</sup> protoplastos. Wang e colaboradores [24] reportaram a transformação do basidiomiceto *Volvariella volvacea* com alta eficiência (30-65%) através da utilização de *A. tumefaciens*.

Para o início dos estudos de transformação com o fungo *M. roreri*, escolhemos o método de agrotransformação, pois além de hoje ser um dos mais eficientes na transformação de fungos, ele foi adaptado com sucesso para o fungo *M. perniciosa* em nosso laboratório (manuscrito em preparação).

#### 2. Objetivos

O objetivo desta etapa do trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo para a transformação do fungo *Moniliophthora perniciosa,* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

#### 3. Material e métodos

#### 3.1. Linhagem e cultivo de Moniliophthora roreri

Foi utilizado o isolado M2977 de *M. roreri*. Para os experimentos de transformação, cubos do micélio crescido em PDA foram inoculados em meio contendo 1,7 g/L de extrato de malte, 5 g/L de extrato de levedura, 50 ml/L de glicerol. As culturas foram crescidas por 7 dias, a 28°C, sob uma agitação constante de 150 rpm.

#### 3.2. Agrobacterium tumefaciens: linhagem, plasmídios e manejo da cepa

#### 3.2.1. Linhagem de A. tumefaciens

Foi utilizada a linhagem ALG-1 de *A. tumefaciens*, a qual foi gentilmente cedida pelo pesquisador Mark Guiltman, da Penn State University, nos EUA.

#### 3.2.2. Plasmídio

Foi utilizado o vetor pBGgHG, o qual apresenta o gene marcador de resistência a Higromicina B (hph, higromicina fosfotransferase), além do gene repórter eGFP (proteína fluorescente verde otimizada), ambos flanqueados pelo promotor do gene codificante para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Agaricus bisporus* e pelo terminador do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor [25]. O plasmídio também foi cedido pelo pesquisador Mark Guiltman.

#### 3.2.3. Transformação da linhagem AGL-1 com o plasmídio pBGgHG

#### A. Confirmação da identidade da linhagem AGL-1

Com o intuito de confirmarmos a presença do plasmídio Ti na linhagem AGL-1 que nos foi enviada, realizamos uma amplificação de um fragmento do mesmo a partir de colônias da bactéria. Utilizamos os *primers* VIRA-F (ATGAATGGAAGGTATTCACCG) e VIRA-R (GTTTTTGGAGCATGTCGAGTT), os quais amplificam um fragmento de aproximadamente 600 pB do plasmídio Ti. O programa de amplificação utilizado foi formado por um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 48 °C e 50 segundos a 65 °C, e finalizando com um passo de extensão final por 7 minutos a 65 °C.

#### B. Preparo de Agrobacterium competente

A linhagem de AGL-1 nos foi enviada em cubos de meio LB sólido. Retiramos uma pequena porção de um dos cubos e o plaqueamos em uma placa de meio LB, a qual foi crescida por 2 dias, a 28 °C, no escuro. Após esse período, uma colônia isolada foi inoculada em 20 mL de meio LB e crescida overnight a 28 °C, no escuro, sob uma agitação de 250 rpm. Essa cultura foi usada como pré-inóculo o preparo das células eletrocompetentes.

O inoculo foi feito em 100 mL de meio LB de modo que a OD<sub>595</sub> inicial estivesse em torno de 0,15. Essa cultura foi crescida até atingir uma OD de aproximadamente 0,4 (aproximadamente 4 horas), nas mesmas condições acima descritas. Essas culturas foram utilizadas para o preparo de células eletrocompetentes.

#### C. Transformação da linhagem AGL-1 com o plasmídio pBGgHG

Aproximadamente 40 ng do plasmídio pBGgHG foi utilizado para transformar 80 □L de solução de AGL-1. As condições do pulso dado no Gene Pulser (Biorad) foram: 2,5 kV, 2000, 25F. Após o pulso, as bactérias foram plaqueadas em meio seletivo (LB + 50 µl/ml de kanamicina) e em um meio controle (LB) e crescidas por 2 dias, a 28°C, no escuro. A confirmação da transformação foi feita através da amplificação, a partir de colônias que cresceram no meio contendo kanamicina, de um fragmento do gene *hph* (*hygromycin resistance gene*) presente no plasmídio pBGgHG. Utilizamos os *primers* HygF

(GATGTTGGCGACCTCGTATT) e HygR (GCGAAGAATCTCGTGCTTTC), os quais amplificam um fragmento de aproximadamente 600 pB. O programa de amplificação utilizado foi formado por um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C e 50 segundos a 65 °C, e finalizando com um passo de extensão final por 7 minutos a 65 °C. Algumas colônias transformadas foram estocadas em glicerol 15% sob uma temperatura de -80°C.

#### D. Cultivo de A. tumefaciens para a transformação de M. roreri

Para os ensaios de transformação de *M. roreri*, a linhagem de *A. tumefaciens* AGL-1 contendo o plasmídio pBGgHG foi crescida, por 2 dias, a 28 °C, no escuro, em 2 meios distintos: 1) meio LB; 2) meio mínimo (1,05% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,45% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,05% Na<sub>3</sub> – citrato  $\cdot$  2H<sub>2</sub>O; 0,02% MgSO<sub>4</sub>  $\cdot$  7 H<sub>2</sub>O; 0,0001% tiamina - HCL; 0,2% glicose; kanamicina). Posteriormente, 1 mL desta cultura foi centrifugado, e o precipitado foi ressuspendido em dois meios de indução distintos, para uma OD<sub>600</sub> ~ 0.2 e incubado durante 8h a 28°C com agitação de 200 rpm, no escuro: 1) meio mínimo acrescido de 40 mM de MES pH 5,3, 0,5% de glicerol e 200  $\Box$ M de acetoseringona; 2) meio de indução adaptado de Utemark e colaboradores [26]: 800  $\Box$ I de tampão fosfato 1,25 M, 20 mI de tampão MN, 1 mI de solução de CaCl2 10 mg/mL, 5 mL de MPR trace minerals, 2 ML de NH4NO3 200 mg/mL, 10 mL de glicerol 50%, 40 mL de MÊS pH 5,3, 200 mm de acetoseringona. O meio de indução contém acetoseringona, uma substância natural de defesa sintetizada pelas plantas, que torna a bactéria *A. tumefaciens* mais virulenta, ou seja, mais apta a realizar a transferência da região T do plasmídio Ti, aumentando a eficiência da transformação.

#### E. Co-cultivo de AGL-1 com *M. roreri*

O co-cultivo de AGL-1 foi com o micélio de *M. roreri* foi realizado de duas maneiras distintas:

1) Colônias do micélio do isolado M1977 de *M. roreri* foram crescidas por 2 dias, sobre membrana de papel celofane, em meio MYEA. Em seguida, estas colônias foram transferidas para meio de indução sólido (meio de indução de *A. tumefaciens* contendo 1,5% de ágar), e sobre cada uma delas foram aplicados 250µL de uma suspensão da linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens* ( $OD_{600} \sim 0.6$ ). Este co-cultivo foi mantido a 28° C durante 60h no escuro.

2) Aproximadamente 1 g de micélio de *M. roreri* foi triturado com glass beads, por 15 segundos,

em cerca de 5 ml de meio de indução de Agro. 250 ml dessa solução foi adicionada a 250 ml de uma suspensão da linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens* ( $OD_{600} \sim 0.6$ ) e deixada no escuro, a 28°C, por 2 horas. Após esse período de incubação, essa solução foi plaqueada em meio de indução sólido (meio de indução de *A. tumefaciens* contendo 1,5% de ágar), sob uma membrana de Nylon. Este co-cultivo foi mantido a 28° C durante 60h no escuro.

#### F. Seleção dos transformantes

Para seleção de possíveis transformantes, as colônias miceliares foram transferidas para placas meio MYEA acrescido de higromicina (75 μg/mL) e cefotaxime (200 μM), sendo este último utilizado para matar agrobactérias, e mantidas a 28°C, no escuro. O controle positivo foi realizado em meio sem higromicina. As primeiras hifas possivelmente transformantes cresceram em cerca de 20 dias. Estas hifas tolerantes a higromicina eram transferidas para uma nova placa de meio MYEA acrescido de 100 μg/mL de Higromicina B para confirmar a resistência.

#### G. Análise da presença do cassete de transformação no genoma do fungo através de PCR

A análise da presença do gene de resistência a Higromicina B foi realizada a partir da extração do DNA genômico do fungo selvagem e das possíveis colônias transformantes.

Para a reação de amplificação do DNA foram utilizados os *primers* específicos para o gene *hph* completo, os quais amplificam um fragmento de aproximadamente 2,2 Kb. Para a confirmação da morte das agrobactérias, também foi realizado uma amplificação com os *primers* VIRA, conforme descrito no item C.1.

#### 4. Resultados

4.1. Confirmação da transformação da linhagem AGL-1 de *Agrobacterium tumefaciens* com o plasmídio pBGgHG.

Antes de iniciarmos os experimentos de transformação de *M. roreri*, realizamos uma amplificação de um fragmento do plasmídio Ti da linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens*, delimitado pelos *primers* VIRA, e de um fragmento do plasmídio pBGgHG, delimitado pelos *primers* Hyg, para confirmarmos a identidade

de ambos, visto que recebemos esse material de outro laboratório. O resultado das amplificações está mostrado na figura 2.



**Figura 2:** Amplificação de fragmentos do plasmídio Ti da linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens* e do plasmídio pBGgHG para confirmarmos a identidade de ambos. 1) Marcador  $\lambda$ -hind. 2) Fragmentos do plasmídio Ti presente em 5 colônias isoladas da linhagem AGL-1. 3) Controle negativo; 4) Fragmentos de duas alíquotas do plasmídio pBGgHG.

Após a confirmação da identidade tanto da linhagem AGL-1 como do plasmídio pBGgHG, realizamos a transformação da agrobactéria com este plasmídio. As bactérias possivelmente transformadas que cresceram em meio seletivo (contendo 50 µg/mL de kanamicina) foram testadas para a presença do cassete de higromicina e para a manutenção do plasmídio Ti, como mostrado na figura 3.



**Figura 3**: Amplificação de fragmentos do cassete HYG e do plasmídio Ti de bactérias transformadas com o plasmídio pBGgHG para confirmação da transformação. 1 e 3) Marcador  $\lambda$  hind. 2) Fragmentos do cassete HYG em sete colônias transformadas. 4) fragmentos do plasmídio Ti nas mesmas sete colônias.

Como descrito no item C.4, testamos duas formas de crescimento da agrobactéria para posterior co-cultivo com o micélio de *M. roreri*. A primeira delas consistia em crescê-las em meio mínimo, por 2 dias, e depois induzi-las com meio mínimo acrescido de acetoseringona. Na segunda maneira, o crescimento era feito em meio LB, por 16 horas, para posterior indução com o mesmo meio mínimo acrescido de acetoseringona. O co-cultivo foi realizado com as bactérias crescidas da segunda maneira, visto que o crescimento prolongado em meio mínimo acabava acarretando com a perda do plasmídio Ti, como demonstrado na figura 4.



**Figura 4**: Amplificação de fragmentos do cassete HYG e do plasmídio Ti de bactérias transformadas com o plasmídio pBGgHG para a realização do co-cultivo com o micélio de *M. roreri*. 1) marcador 100 bp (Invitrogen). 2,3) Colônias crescidas em meio LB. Como podemos observar, o crescimento em meio mínimo acarretou a perda do plasmídio Ti.

#### 4.2. Seleção de possíveis transformantes de M. roreri

Como detalhado no item C.5, o co-cultivo de *M. roreri* e AGL-1 foi realizado tanto com colônias do micélio de *M. roreri* intactas (figura 13, A e B) quanto com as mesmas maceradas com *glass beads* (figura 13, C). Após o período de co-cultivo, as culturas foram transferidas para um meio seletivo contendo os antibióticos higromicina (75  $\mu$ g/mL) e cefotaxime (200  $\mu$ M). Após aproximadamente 12 dias, as primeiras colônias possivelmente transformantes começaram a crescer no meio seletivo, como mostrado na figura 5.



**Figura 5**: Possíveis colônias transformadas de *M. roreri*. A,B) co-cultivo realizado com colônias intactas do fungo; C) co-cultivo realizado com colônias do fungo maceradas com *glass beads*. Como podemos observar, colônias transformantes cresceram em ambas as formas de co-cultivo.

As colônias de *M. roreri* transformadas foram transferidas para um meio não seletivo por 2 semanas. Após esse período, as colônias foram novamente transferidas para o meio seletivo (figura 6), com o intuito de verificarmos se as mesmas mantiveram a resistência à higromicina, apesar da ausência de pressão seletiva.



**Figura 6:** Colônias transformadas em meio seletivo e não seletivo. A,C) Colônias transformadas em meio não seletivo; B,D) As mesmas colônias transformadas em meio seletivo; E) colônia não transformada de *M. roreri* em meio seletivo, mostrando que esse fungo não possui uma resistência natural à higromicina.

#### 4.3. Confirmação da transformação

O DNA de algumas colônias que apresentaram resistência à higromicina foi extraído e o cassete completo contendo o gene *hyg* foi amplificado, confirmando a transformação das colônias de *M. roreri* (figura 7).



**Figura 7**: Confirmação da transformação de M. roreri. A) Marcador 1 Kb ladder; B) Confirmação da transformação de 5 colônias de M. roreri através da amplificação do cassete inteiro contendo o gene Hyg; C) Controle negativo; D) Controle positivo (PCR utilizando o plasmídio pBGgHG como molde).

A não amplificação do fragmento do plasmídio Ti delimitado pelos *primers* VIRA, a partir desse mesmo DNA, confirma a morte das agrobactérias; esse mesmo material genético foi utilizado para a amplificação com o *primer* para ó gene Mr\_PME, confirmando assim a identidade das colônias transformadas (dados não mostrados).

Não foi possível a detecção de GFP nas colônias quando as mesmas foram analisadas em microscopia de fluorescência. No entanto, isso é comum em basidiomicetos, como em *Agaricus bisporus* [25], para o qual também foi utilizado o plasmídio pBGgHG.

Esse foi o primeiro protocolo desenvolvido para a transformação de *M. roreri*. O período de 6 meses disponível para a realização desses experimentos não permitiu que variações desse protocolo fossem testadas no intuito de melhorarmos a eficiência do mesmo. Além disso, não houve tempo suficiente para rastrearmos onde essas inserções do cassete de higromicina foram realizadas. No entanto, esse trabalho abre portas para o desenvolvimento de mutantes de *M. roreri* pelo grupo do USDA.

#### 5. Referências

- Aime MC, Phillips-Mora W: The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 2005, 97(5):1012-1022.
- Griffith GW, Nicholson J, Nenninger A, Birch RN, Hedger JN: Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. New Zealand Journal of Botany 2003, 41(3):423-435.
- Rorer JB: Enfermedades y plagas del cacao en el Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo del cacao. Asociación de Agricultores 1918:17-40.
- 4. Phillips-Mora W, Wilkinson MJ: Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology* 2007, 97(12):1644-1647.
- Enríquez G, and Suárez, C.: Monilia disease of cacao in Costa Rica. *Turrialba* 1978, 28:339-340.
- López GMA, and Enríquez, V. O: Presencia de Monilia roreri Cif. et Par. en el cacao, Theobroma cacao L. en la frontera de Costa Rica, Nicaragua. Ministerio de Desarrollo Agropecuario, Managua, Nicaragua 1980.
- Porras VH, and Enríquez G: Spread of monilia pod rot of cocoa through Central America.
   *IICA, San José, Costa Rica* 1998.
- Phillips-Mora W, Cawich, J., Garnett, W., and Aime, M. C: First report of frosty pod rot (= moniliasis disease) caused by *Moniliophthora roreri* on cacao in Belize. *Plant Pathol* 2006, 55:584.
- Phillips-Mora W, Coutiño, A., Ortiz, C. F., López, A. P., Hernández, J., and Aime, M. C: First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (= moniliasis disease) of cacao in Mexico. *Plant Pathol* 2006(55):584.
- 10. Ram A, Valle, R.R. & Gardini, E.A: **Monília do cacaueiro.** *Fundação Cargill* 2004, 1.
- 11. Evans HC: Cacao diseases-the trilogy revisited. *Phytopathology* 2007, 97(12):1640-1643.
- 12. Evans HC: **Pod Rot of Cacao Caused by Moniliophthora (Monilia) roreri.** Phytopathol Pap 1981, 24:1-44.

- Groot MJ, Bundock, A.P., Hooykaas, P.J.J. & Beijersbergen, A.G.M: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat Biotechnol* 1998, 16:839–842
- Meyer V, Müller, D., Strowig, T. & Stahl, U: Comparison of different transformation methods for Aspergillus giganteus. Curr Genet 2003, 43(371-377).
- 15. Michielse CB, Hooykaas, P.J., van den Hondel, C.A. & Ram, A.F: **Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi.** *Curr Genet* 2005, 48:1-17.
- 16. Gelvin SB: Agrobacterium transformation of *Arabidopsis thaliana* roots: a quantitative assay. *Methods Mol Biol* 2006, 343:105-113.
- Mullins ED, Chen X, Romaine P, Raina R, Geiser DM, Kang S: Agrobacterium-Mediated Transformation of Fusarium oxysporum: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer. *Phytopathology* 2001, 91(2):173-180.
- Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH: Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nat Protoc* 2006, 1(2):641-646.
- Kereszt Aea: Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of soybean to study root biology. Nat Protoc 2007, 3:948-952.
- 20. Ishida Y, Hiei, Y. & Komari, T: Agrobacterium-mediated transformation of maize. *Nat Protoc* 2007, 2:1614-1621.
- 21. Nishimura A, Aichi, I. & Matsuoka, M: A protocol for Agrobacterium-mediated transformation in rice. *Nat Protoc* 2006, 1:2796-2802
- Morioka LRIF, M. C.; Bogas, A. C.; Pompermayer, P.; Duarte, R. T. D.; Vieira, M. L.C.; Watanabe,
   M. A. E.; Fungaro, M. H. P: Efficient genetic transformation system for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. *Curr Microb* 2006, 52(6):469-472.
- Zhong YH, Wang XL, Wang TH, Jiang Q: Agrobacterium-mediated transformation (AMT) of Trichoderma reesei as an efficient tool for random insertional mutagenesis. Appl Microbiol Biotechnol 2007, 73(6):1348-1354.
- 24. Wang J, Guo L, Zhang K, Wu Q, Lin J: **Highly efficient Agrobacterium-mediated transformation of Volvariella volvacea.** *Bioresour Technol* 2008, 99(17):8524-8527.

- Chen X, Stone M, Schlagnhaufer C, Romaine CP: A fruiting body tissue method for efficient Agrobacterium-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Appl Environ Microbiol* 2000, 66(10):4510-4513.
- 26. Utermark J: Genetic transformation of filamentous fungi by *Agrobacterium tumefaciens*. *Protocol Exchange* 2008.

## **BMC Genomics**

Research article



**Open Access** 

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

Jorge MC Mondego<sup>†1</sup>, Marcelo F Carazzolle<sup>†1</sup>, Gustavo GL Costa<sup>1</sup>, Eduardo F Formighieri<sup>1</sup>, Lucas P Parizzi<sup>1</sup>, Johana Rincones<sup>1</sup>, Carolina Cotomacci<sup>1</sup>, Dirce M Carraro<sup>2</sup>, Anderson F Cunha<sup>3</sup>, Helaine Carrer<sup>4</sup>, Ramon O Vidal<sup>1</sup>, Raíssa C Estrela<sup>1</sup>, Odalys García<sup>1</sup>, Daniela PT Thomazella<sup>1</sup>, Bruno V de Oliveira<sup>1</sup>, Acássia BL Pires<sup>5</sup>, Maria Carolina S Rio<sup>1</sup>, Marcos Renato R Araújo<sup>1</sup>, Marcos H de Moraes<sup>1</sup>, Luis AB Castro<sup>6</sup>, Karina P Gramacho<sup>7</sup>, Marilda S Gonçalves<sup>8</sup>, José P Moura Neto<sup>8</sup>, Aristóteles Góes Neto<sup>9</sup>, Luciana V Barbosa<sup>10</sup>, Mark J Guiltinan<sup>11</sup>, Bryan A Bailey<sup>12</sup>, Lyndel W Meinhardt<sup>†12</sup>, Julio CM Cascardo<sup>†5</sup> and Gonçalo AG Pereira<sup>\*1</sup>

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

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

Published: 18 November 2008

Received: 17 June 2008 Accepted: 18 November 2008

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

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

© 2008 Mondego et al; licensee BioMed Central Ltd.

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

#### Abstract

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

Page 1 of 25 (page number not for citation purposes)

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

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

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas 13083-970, São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Laboratório 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; <sup>3</sup>Laboratório de Virologia e Bacteriologia de Plantas, Instituto Agronômico do Parana—IAPAR, Londrina 86047-902, Paraná, Brazil; <sup>4</sup>Laboratório de Genômica e Expressão Gênica, Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus 45650-000, Bahia, Brazil; <sup>5</sup>Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba 13400-970, São Paulo, Brazil; <sup>6</sup>Sustainable 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 Apêndice 3: Artigo submetido para a revista BMC Genomics

# Global analyses of *Ceratocystis cacaofunesta* mitochondria: from genome to proteome.

Alinne Batista Ambrosio<sup>1</sup>, Leandro Costa do Nascimento<sup>1</sup>, Bruno V. Oliveira<sup>1</sup>, Ricardo A. Tiburcio<sup>1</sup>, Daniela P. Toledo Thomazella<sup>1</sup>, Adriana Franco Paes Leme<sup>2</sup>, Marcelo F. Carazzolle<sup>1,3</sup>, Paulo José P. L. Teixeira<sup>1</sup>, Ramon O. Vidal<sup>2</sup>, Piotr Mieczkowski<sup>4</sup>, Lyndel W. Meinhardt<sup>5</sup>, Gonçalo A. G. Pereira<sup>1\*</sup> and Odalys G. Cabrera<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CEP: 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório Nacional de Biociências-LNBio, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho, Universidade Estadual de Campinas, CEP: 13083-970, Campinas,SP, Brasil.

<sup>4</sup> High-Throughput Sequencing Facility, University of North Carolina, 2234 Nelson Highway Chapel Hill NC 27516, NC, USA.

<sup>5</sup> Sustainable Perennial Crops Laboratory, USDA/ARS, 10300 Baltimore Ave., Beltsville, MD 20705, USA.

\*Corresponding author: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira; phone: +55 19 35216650; fax: +55 19 35216235; e-mail: goncalo@unicamp.br; website: http://www.lge.ibi.unicamp.br.

ABA (alinne@lge.ibi.unicamp.br), LCN (leandro@lge.ibi.unicamp.br), BVO (bvo@lge.ibi.unicamp.br), RAT (tiburcio@lge.ibi.unicamp.br), DPTT (danitt@lge.ibi.unicamp.br), AFPL (adriana.paesleme@lnbio.org.br), MFC (mcarazzo@lge.ibi.unicamp.br), PJPLT (paulo@lge.ibi.unicamp.br), ROV (ramon.vidal@gmail.com) PM (piotr\_mieczkowski@med.unc.edu), LWM (lyndel.meinhardt@ars.usda.gov), GAGP (goncalo@unicamp.br), OGC (odalys@lge.ibi.unicamp.br).

#### Abstract

**Background**: The ascomycete fungus *Ceratocystis cacaofunesta* is the causal agent of wilt disease in cacao, which results in significant economic losses in the affected producing areas. Despite the economic importance of the *Ceratocystis* complex of species, no genomic data are available for any of its members. Because mitochondria play important roles in fungal virulence and the susceptibility/resistance of fungi to fungicides, we performed the first genomic analysis of this organelle in *Ceratocystis* using integrated - omics approaches.

**Results**: The *C. cacaofunesta* mitochondrial genome consists of a single, 103,147-bp circular molecule, making this the second largest mitochondrial genome among the Sordariomycetes. Our bioinformatics analysis revealed the presence of 15 conserved genes and 37 intronic open read frames ORFs in this mitochondrial genome. However, only a small part of the mitochondrial proteome is encoded within the mitochondrial genome. In *C. cacaofunesta*, 1,072 mitochondrial proteins were predicted to be encoded by the nuclear genome; of these, 349 were found to be conserved hypothetical proteins and 38 obtained no hits. The total predicted mitochondrial proteome was subjected to liquid chromatographic with mass spectrometric analysis. The total number of proteins (476) that were experimentally identified, from which 304 were predicted to be mitochondrial comprising 6 were mitochondrially encoded. Moreover, we identified 117 proteins of unknown function, of which 7 were specific to this species.

**Conclusions**: This study provides the first genomic analysis of a member of the *Ceratocystis* complex and the first predicted mitochondrial protein inventory of a phytopathogenic fungus. These results should facilitate future functional studies of *C. cacaofunesta*.

**Keywords:** Wilt disease, *Ceratocystis cacaofunesta*, mitogenomics, mitochondrial proteome and fungal virulence.