ALINNE BATISTA AMBROSIO

"APLICAÇÃO DAS *OMICAS* PARA O ESTUDO DE DUAS DOENÇAS FÚNGICAS DO CACAUEIRO"

CAMPINAS 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALINNE BATISTA AMBROSIO

"Aplicação das omicas para o estudo de duas doenças fúngicas

do cacaueiro"

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

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Odalys Garcia Cabrera.

CAMPINAS, 2012

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

| Am18a | Ambrosio, Alinne Batista, 1983- Aplicação das ômicas para o estudo de duas doenças fúngicas do cacaueiro / Alinne Batista Ambrosio. – Campinas, SP: [s.n.], 2012. |
|-------|---|
| | Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira. Coorientador: Odalys Garcia Cabrera. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. |
| | Ceratocystis cacaofunesta. Moniliophthora perniciosa. Relação planta-patógeno. Theobroma cacao. Fungos fitopatogênicos. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães. Cabrera, Odalys Garcia. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Título. |

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Omics' application for the study of two fungal cocoa diseases Palavras-chave em Inglês: Ceratocystis cacaofunesta Moniliophthora perniciosa Plant-pathogen relationships Theobroma cacao Phytopathogenic fungi Área de concentração: Genética de Microorganismos Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular Banca examinadora: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador] Carlos Augusto Colombo Renato Vicentini Lázaro Eustáquio Pereira Peres Aristóteles Goes Neto Data da defesa: 02-08-2012 Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

ij.

Campinas, 02 de agosto de 2012

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto

Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres.

Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo

Prof. Dr. Renato Vincentini

Prof. Dr. Jorg Kobarg

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Prof. Dr. André Ambrósio Berteli



Assinatura

Assinatura

Assinatura

iii

Resumo

O cacaueiro (Theobroma cacao L., Sterculiaceae), planta nativa da região amazônica, é a principal espécie dentre as 22 do gênero que é comercialmente explorada para a produção de sementes, as quais tem grande importância econômica principalmente por ser usado na produção de chocolate.Por conta disso, a produção das sementes sempre foi uma grande preocupação para as regiões produtoras, e o fator que causa o maior declínio da produção de cacau é o aparecimento de doenças. No Brasil, o cacaueiro apresenta como principais doenças causadoras de perdas na produção a vassoura-de-bruxa e o maldo-fação. A vassoura-de-bruxa é causa pelo fungo Moniliophthora perniciosa e tem como sintomas característicos a hiperplasia e hipertrofia das células que dão lugar a tecidos anômalos chamados de vassoura. O mal-do-facão, causado pelo fungo Ceratocystis cacaofunesta, é uma doença assintomática, sendo detectada somente com a morte da planta. As duas doencas foram estudadas neste trabalho atravez de ferramentas da genômica na tentativa de identificação de mecanismos de interação patógenohospedeiro. Em Ceratocystis cacaofunesta foi feita uma análise global da mitocôndria integrando dados de genômica, transcritômica e proteômica. Foi gerado o primeiro inventário de proteinas mitocondriais de um fitopatógeno, sendo preditas um total de 1.124 proteinas, das guais 304 foram identificadas experimentalmente. Dentre as proteinas listadas no inventário, 117 tem função desconhecida e 7 parecem ser específicas deste fungo. Análises dos dados do genoma de *M. perniciosa* sugerem que o fungo poderia estar produzindo giberelina, o que explica muito dos eventos que acontecem durante a interação M. perniciosa-cacaueiro durante a fase biotrófica do fungo. Este trabalho demonstrou a importância desse hormônio na progressão da doença, assim como a alteração do metabolismo de giberelina na planta durante a interação. Os dados obtidos neste trabalho geraram conhecimento para desenvolvimento de estrátégias de controle das duas doenças, além de direcionar estudos com outros fitopatógenos.

iv

Abstract

Cacao tree (Theobroma cacao L., Sterculeaceae) is a native plant from Amazon region and the main species commercially exploited for seed production among the 22 of the genus. This plant has a great economic importance because of its use in the production of chocolate. Due to this, producing regions always has been concern to seed production, and diseases are the most important factors of decline in cocoa production. In Brazil, cacao witches' broom and ceratocystis wilt are major diseases causing production losses. The witches' broom is caused by the fungus Moniliophthora perniciosa and the characteristic hyperplasia and hypertrophy symptoms of cells gives rise to anomalous tissue called broom. Meanwhile, the ceratocystis wilt caused by *Ceratocystis cacaofunesta* is an asymptomatic disease; it is detected only with the death of the plant. Both diseases were studied using genomic tools in an attempt to identify mechanisms of host-pathogen interaction. In *Ceratocystis cacaofunesta*, a mitochondrial global analysis integrating data from genomics, transcriptomics and proteomics was made. This work generated the first inventory of mitochondrial proteins of a plant pathogenic fungus, in which 1,124 proteins were predicted and 304 were identified experimentally. Among the proteins listed in the inventory, 117 have unknown function and 7 appear to be specific to this fungus. Data analysis of the genome of *M. perniciosa* suggests that the fungus could be producing gibberellin, it may explain much of the events that happen during the interaction M. perniciosa-cacao in biotrophic phase of the fungus. Therefore, this work showed the importance of this hormone in disease progression, as well as altered metabolism of gibberellin in the plant during the interaction. The data obtained in this work generated knowledge to develop strategies to control these two diseases, and can drive studies with other pathogens.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais Afonso e leida por terem zelado pela minha educação e por todo amor, carinho, ajuda e incentivo que sempre me deram. Vocês foram e são fundamentais para o meu crescimento pessoal e formação profissional!

Aos meus irmãos Ana Karina e Diego, pelo incentivo, amor e amizade dedicados a mim. Ao Ramon por todo apoio e companheirismo.

Aos meus queridos amigos Marcela, Silvia, Desiree, Vanessa, Ivan e tio Sidney pela amizade, conselhos, companheirismo, pelos exemplos de dedicação e perseverança e por todo o apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gonçalo Pereira, por todos os ensinamentos e confiança. À co-orientadora Odalys Garcia por todo o apoio e auxílio.

A todos os pesquisadores, funcionários, alunos e ex-alunos do LGE, em especial a Eliane, Ernê e Silvia, pela troca de experiências e pelo auxílio durante estes anos.

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

À FAPESP pelo apoio financeiro.

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

Índice

| Introdução Geral1 |
|---|
| Objetivos4 |
| Referências bibliográficas5 |
| CAPÍTULO I7 |
| Global analyses of Ceratocystis cacaofunesta mitochondria: from genome to proteome |
| Abstract |
| 1. Background11 |
| 2. Results and discussion14 |
| 4. Conclusion34 |
| 5. Materials and Methods35 |
| 6. References41 |
| CAPÍTULO II |
| Avaliação da produção de giberelina pelo fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i> durante a interação com cacaueiro |
| Abstract |
| Resumo57 |
| 1. Introdução58 |
| 2. Objetivos70 |
| 3. Materiais e métodos71 |
| 4. Resultados e discussões78 |
| 5. Conclusões106 |
| 6. Referências107 |

Figures List – Capítulo 1

| igure 1: Map of <i>C. cacaofunesta</i> mitochondrial DNA1 | 6 |
|--|---------|
| igure 2: Flowchart of the mitochondrial gene prediction2 | 0 |
| igure 3: Distribution of RPKMs (in log scale) in the mitochondrial (white) and non-mitochondria gray) genes | эl З |
| igure 4: Distribution of Gene Onthology (GO) categories for <i>N. crassa</i> (light gray), <i>S. cerevisia</i> dark gray) and <i>C. cacaofunesta</i> (black) mitochondrial predicted genes | е 3 |
| igure 5: Distribution of Gene Onthology (GO) categories for <i>C. cacaofunesta</i> nuclear genes that odified mitochondrial proteins found in LC-MS/MS experiments | ıt) |
| igure 6: Schematic representation of the mitochondrial protein important for pathogenicity in a acaofunesta | 2. 1 |

Lista de Figuras – Capitulo2

| Figura 1: Ciclo de vida de <i>M. perniciosa</i> 62 |
|---|
| Figura 2: Representação dos sintomas característicos observados nos quatro estágios de desenvolvimento da vassoura-de-bruxa (extraído de modificado de Scarpari, et. al., 2005)63 |
| Figura 3: Esquema de regulação de expressão por giberelina66 |
| Figura 4: Mapa do plasmídeo pUCH2-8 natl utilizado para transformação de mutantes de <i>G. fujikuroi</i> |
| Figura 5: Esquema do experimento de nitrogênio em plântulas de cacau76 |
| Figura 6: Plantas tratadas com GA379 |
| Figura 7: Bioensaio com GA3, ABA e GA3/ABA diluídos em lanolina em plântulas de cacau 1, 10 e 20 dias após aplicação (DPA) de hormônio80 |
| Figura 8: Bioensaio do efeito de GA3, ácido abscisico, paclobutrazol na infecção de plântulas de cacau com <i>M. perniciosa</i> |
| Figura 9: Análise de expressão do gene CPS da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com <i>M. perniciosa</i> e sadias |
| Figura 10: Análise de expressão do gene KS da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com <i>M. perniciosa</i> e sadias |
| Figura 11: Análise de expressão do gene GA3 (ent-kaureno oxidase) da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com <i>M. perniciosa</i> e sadias |
| Figura 12: Análise de expressão da cópia 1 do gene KAO da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com <i>M. perniciosa</i> e sadias |
| Figura 13: Análise de expressão da cópia2 do gene KAO da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com <i>M. perniciosa</i> e sadias |
| Figura 14: Análise de expressão do gene GA20oxi da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com <i>M. perniciosa</i> e sadias |
| Figura 15: Análise de expressão do gene GA3oxi da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com <i>M. perniciosa</i> e sadias |
| Figura 16: Análise de expressão da cópia1 do gene GA2oxi da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com <i>M. perniciosa</i> e sadias |
| Figura 17: Análise de expressão da cópia2 do gene GA2oxi da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com <i>M. perniciosa</i> e sadias |

| Figura 18: Comparação da expressão gênica da via de síntese de GAs entre vassoura verde e planta sadia91 |
|--|
| Figura 19: Perfil de expressão dos genes da via de sinalização de GAs92 |
| Figura 20: Expressão de genes que respondem a GAs em bibliotecas de RNA-Seq93 |
| Figura 21: Análise de expressão de genes da via de síntese de giberelinas da planta em bibliotecas de plantas infectadas com <i>M. perniciosa</i> e sadias95 |
| Figura 22: Avaliação do aparecimento de sintomas em plantas infectadas e tratadas com nitrogênio97 |
| Figura 23: Esquema simplificado da via de síntese de giberelinas em fungos |
| Figura 24: Expressão de possíveis genes de síntese de GAs de <i>M. perniciosa</i> em bibliotecas de RNA- Seq100 |
| Figura 25: Identificação de MOTIFs nas sequências de CPS/KS dos fungos <i>G. fujikuroi, S. manihoticola, N. crassa</i> e <i>M. perniciosa</i> 101 |
| Figura 26: Avaliação qualitativa de expressão do gene MpCPS/KS102 |
| Figura 27: Espectro de MS de amostras de sobrenadante do fungo104 |
| Figura 28: TLC de detecção de giberelina106 |

Lista de Tabelas

| Tabela 1: Primers utilizados para clonagem no plasmídeo pUCH2-8 natl | 73 |
|--|-------------------------|
| Tabela 2: Número de genes ortólogos das vias de síntese, sinalização e resposta à | GAs em <i>T. cacao,</i> |
| A. thaliana, O. sativa e V. vinifera | 82 |
| Tabela 3: Quantificação de giberelinas ativas em amostras de plântulas tratadas co | om nitrogênio de |
| infectadas com <i>M. perniciosa</i> | 98 |
| Tabela 4: Sequências de primers para amplificação de fragmento de MpCPS/KS | 102 |

Introdução Geral

O cacaueiro (*Theobroma cacao L., Sterculiaceae*) é uma planta nativa da região amazônica. Foi trazida para o estado da Bahia em 1746, para o município de Canavieiras [1]. Esta espécie é a única dentre as 22 espécies do gênero que é comercialmente explorada para a produção de sementes (amêndoas) destinadas ao preparo de derivados e subprodutos do cacau, principalmente na sua forma mais popular, o chocolate; podendo também ser transformado em cosméticos, bebidas finas, geléias, sorvetes e sucos [2]. Desde a introdução do cacau no Brasil as áreas de cultivo foram aumentando, chegando a produzir no final da década de 80 cerca de 15% da produção mundial , tendo a Bahia como principal estado produtor com 83% da oferta brasileira [3]. Durante a década dos 1970s, a cacauicultura foi considerada uma das fontes de divisas mais importantes do Brasil sendo que até 90% da produção era destinada à exportação [4].

Em vista da grande importância econômica do cacau a produção das sementes sempre foi uma grande preocupação para para as regiões produtoras, e o fator que causa o maior declínio da produção de cacau é o aparecimento de doenças [5] e o cacau tem-se revelado altamente suscetível a pragas e a novas doenças [6].

No Brasil, por exemplo, foi até o final da década de 80 um dos grandes produtores mundiais de cacau, tendo sua produção concentrada no sul da Bahia atingindo o volume de 400.000 t. A introdução da doença vassoura de bruxa em 1989 nessa região levou a produção a níveis inferiores a 100.000 t no ano de 2000, fazendo do país um importador de cacau [7].

Devido aos danos na região cacaueira do Brasil causados pelo aparecimento da doença vassoura-de-bruxa as pesquisas no tema foram incentivadas. Em 2000 iniciou-se o projeto genoma da vassoura-de-bruxa, o qual visava à integração de diversas áreas de conhecimento biológico (genética, bioquímica, fisiologia vegetal, fitopatologia, anatomia, etc.) utilizando elementos derivados do estudo do genoma do agente etiológico da doença: o fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*.

Em 2008 foi publicado o *draft* do genoma de *M. perniciosa* [8] que direcionou muitos trabalhos aumentando o conhecimento sobre a doença e o patógeno [9-13],

permitindo a implementação de estratégias de manejo. As pesquisas iniciadas com o projeto genoma da vassoura-de-bruxa contribuiram para a criação do PAC do cacau (O Programa de Aceleração do Desenvolvimento e Diversificação da Região Agrícola Cacaueira), que além de ajudar os produtores a solucionar os débitos disponibiliza um pacote tecnológico baseados nas pesquisas realizadas até então possibilitando o cultivo sustentável do cacaueiro, mostrando a importância da integração das grupos de pesquisas com os meios produtores de cacau <<u>http://www.senado.gov.br/comissoes/CRA/AP/AP20120427 Jay Wallace da Silva Mot a.pdf Acesso em: 15/07/2012</u>>.

Dentre as principais doenças que acomente o cacau tem-se vassoura-de-bruxa, monilíase (causada pelo fungo *Moniliophthora roreri*) [14] e o mal-do-facão (causada pelo fungo ascomisceto *Ceratocistis cacaofunesta*)[15].

A Monilíase é endêmica do noroeste da América Latina e foi registrada cientificamente pela primeira vez no Equador em 1917 na mesma época da descoberta da Vassoura-de-Bruxa e do Mal-do-Facão. A cordilheira dos Andes parece ter historicamente atuado como uma barreira natural efetiva contra a disseminação da doença. Atualmente, a Monilíase está confinada a nações integrantes da América Central (como Panamá, Costa Rica, Nicarágua e Honduras) e ao noroeste da América Latina (como Equador, Colômbia e Peru) [16, 17].

Apesar da Monilíase ainda não atingir plantações no Brasil, sua penetração é iminente [16] e já se estão adotando maneiras de manejo e cuidados para evitar sua introdução [18].

O mal-do-facão foi detectada na década dos 90 nos cacaueiros do sul da Bahia [15]. Atualmente, a doença ocorre de forma endêmica, agravando a crise da lavoura cacaueira ocasionada pela Vassoura de bruxa e dificultando ainda mais esta atividade agrícola na região.

Considerando que no Brasil o cacaueiro apresenta como principais doenças causadoras de perdas da produção a vassoura-de-bruxa e o mal-do-facão, estas duas doenças foram estudadas baseadas em análise funcional do genoma, proteoma e

metaboloma de um organismo na tentativa de identificação de mecanismos de interação patógeno-hospedeiro [19, 20].

Objetivos

Este trabalho propoe-se a utilizar ferramentas da genômica para estudo de dois patógenos de cacau (*Ceratocystis cacaofunesta* e *Moniliophthora perniciosa*) para gerar conhecimento para desenvolvimento de estrátégias de controle.

A partir do objetivo geral foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Análise global da mitocôndria de *Ceratocystis cacaofunesta*: do genoma ao proteoma.
- Avaliação da produção de giberelina pelo fungo Moniliophthora perniciosa durante a interação com cacaueiro.

Referências bibliográficas

- 1. Rangel J: **Desenvolvimento institucional**. In., vol. 16. Brasília, Distrito Federal, Brasil: Ceplac/Cacau 1982: 1–11.
- Nakayama A, Park S, Zheng-Jun X, Nakajima M, Yamaguchi I: Immunohistochemistry of active gibberellins and gibberellin-inducible alphaamylase in developing seeds of morning glory. *Plant physiology* 2002, 129(3):1045-1053.
- Pereira JL, Ram, A., Figuereido, J.M. & L.C. de Almeida: "La primera aparición de la "Escoba de Bruja"en la principal región productora de cacao del Brasil". . *Turrialba* 1989, 36(4):459-461.
- 4. Bastos CN, Andebrhan T: Invitro Production of Basidiospores of Crinipellis-Perniciosa, the Causative Agent of Witches-Broom Disease of Cocoa. *Transactions* of the British Mycological Society 1987, **88**:406-409.
- 5. de Souza JT, Pomella AW, Bowers JH, Pirovani CP, Loguercio LL, Hebbar KP: Genetic and Biological Diversity of Trichoderma stromaticum, a Mycoparasite of the Cacao Witches'-Broom Pathogen. *Phytopathology* 2006, **96**(1):61-67.
- 6. Evans HC: **Cacao diseases-the trilogy revisited**. *Phytopathology* 2007, **97**(12):1640-1643.
- 7. Hebbar PK: **Cacao diseases: a global perspective from an industry point of view**. *Phytopathology* 2007, **97**(12):1658-1663.
- 8. 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.
- 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 ethyleneinducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in Theobroma cacao. *Mycological research* 2007, 111(Pt 4):443-455.
- 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*. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 2008, 21(7):891-908.
- 11. 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. *Mycological research* 2009, **113**(Pt 1):61-72.
- 12. Zaparoli G, Barsottini MR, de Oliveira JF, Dyszy F, Teixeira PJ, Barau JG, Garcia O, Costa-Filho AJ, Ambrosio AL, Pereira GA *et al*: **The crystal structure of necrosis-and ethylene-inducing protein 2 from the causal agent of cacao's Witches' Broom disease reveals key elements for its activity**. *Biochemistry* 2011, **50**(45):9901-9910.

- 13. 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**. *The New phytologist* 2012, **194**(4):1025-1034.
- 14. Saunders JA, Mischke S, Leamy EA, Hemeida AA: **Selection of international molecular standards for DNA fingerprinting of Theobroma cacao**. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik* 2004, **110**(1):41-47.
- 15. Engelbrecht CJ, Harrington TC: Intersterility, morphology and taxonomy of Ceratocystis fimbriata on sweet potato, cacao and sycamore. *Mycologia* 2005, 97(1):57-69.
- 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.
- 17. 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.
- 18. Oliveira J. E. H. K: In Informe Técnico 1992-1997. In. Edited by CEPEC/CEPLAC I, Brasil.; 1999.
- 19. Colebatch G, Trevaskis B, Udvardi M: Functional genomics: tools of the trade. *New Phytologist* 2002, **153**(1):27-36.
- 20. Tunlid A: Exploring plant-microbe interactions using DNA microarrays. *New Phytologist* 2003, **158**(2):235-238.

CAPÍTULO I

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

Global analyses of Ceratocystis cacaofunesta mitochondria: from genome to proteome

Alinne Batista Ambrosio¹, Leandro Costa do Nascimento¹, Bruno V. Oliveira¹, Ricardo A.

Tiburcio¹, Daniela P. Toledo Thomazella¹, Adriana Franco Paes Leme², Marcelo F.

Carazzolle^{1,3}, Paulo José P. L. Teixeira¹, Ramon O. Vidal², Piotr Mieczkowski⁴, Lyndel W.

Meinhardt⁵, Gonçalo A. G. Pereira¹* and Odalys G. Cabrera¹

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

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

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

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

⁵ 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: <u>goncalo@unicamp.br</u>; website: <u>http://www.lge.ibi.unicamp.br</u>.

| AA | A (alinne@lge.ibi.unicamp.br), | | LN | (leandro@lge.ibi.unicamp.br), | BVO |
|----------------------------------|--------------------------------|----|----------------|-------------------------------|-----|
| (bvo@ | lge.ibi.unicamp.br), | RT | (<u>ti</u> | burcio@lge.ibi.unicamp.br), | DT |
| (<u>danit</u> | t@lge.ibi.unicamp.br), | AL | (adriana | .paesleme@Inbio.org.br), | MC |
| (mcar | azzo@lge.ibi.unicamp.br), | | РТ | (paulo@lge.ibi.unicamp.br), | RV |
| (ramo | n.vidal@gmail.com) | PM | (<u>piotr</u> | mieczkowski@med.unc.edu), | LM |
| (lyndel.meinhardt@ars.usda.gov), | | | GP | (goncalo@unicamp.br), | OC |
| (odaly | s@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 contained 1,124 polypeptides. The mitochondria were isolated, and the 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.

1. Background

Ceratocystis cacaofunesta is an ascomycete fungus (Class Sordariomycetes, Order Microascales) that causes wilt disease in cacao (*Theobroma cacao*). This fungus is a member of the Latin American clade of the *Ceratocystis* species complex [1, 2], a taxonomic group that includes species with high genetic variability and wide host ranges [3, 4] that cause canker and wilt diseases in many economically important crops, such as *Coffea arabica* and *Eucalyptus spp*. [5]. Engelbrecht and Harrington [6] proposed that host specialization might influence speciation in this group.

C. cacaofunesta is indigenous to Central and South America [1, 2]. In Brazil, this pathogen was first reported in the Amazon region [7]. In the 1990s, *C. cacaofunesta* was introduced to the southern region of Bahia, which is the largest Brazilian cacao-producing state [8]. This fungus is able to penetrate cacao trees through stem wounds caused by either insects (natural vectors) or infected cutting tools [9, 10]. Unlike other cacao diseases that primarily affect branches and fruits, such as Witches' broom disease and Frosty pod, wilt disease is a systemic infection that damages the entire plant. The fungus enters its host through the secondary xylem, resulting in the formation of deep spots and leading to the obstruction of water and nutrient transport [11]. As a consequence, the plant turns yellow and then brown; the infection culminates in the wilting and sudden death of the tree. This disease is responsible for reductions in the cacao population in plantation areas, which has resulted in great economic losses in the affected regions. Extensive damages have also been reported in Trinidad [12], Venezuela and Colombia [13].

Several studies have attempted to characterize the genetic variation, aggressiveness and host specialization of different populations of *C. cacaofunesta* [6, 14-16]. However, little is known at the molecular level about this fungus and its interaction with cacao. Notably, no genomic data are available for any members of the *Ceratocystis* complex of species. In 2011, our group initiated the *C. cacaofunesta* Genome Project (http://www.lge.ibi.unicamp.br/*Ceratocystis*), with the goal of understanding the mechanisms underlying the interactions between *C. cacaofunesta* and *T. cacao* in the development of wilt disease. Initially, we focused on the study of *C. cacaofunesta* mitochondria for two reasons: (i) their potential role in fungal pathogenesis and (ii) the relevance of this organelle as a target for fungicides [17].

In addition to their canonical function as an energy-producing compartment, mitochondria are involved in multiple cellular processes [18]. These organelles play important roles in calcium homeostasis [19], the biosynthesis of iron-sulfur clusters [20], the metabolism of lipids and amino acids, aging and the signaling of programmed cell death [21]. Due to the importance of these processes, mitochondrial dysfunctions cause serious consequences for the cell and, eventually, the entire organism. Functionally compromised mitochondria are associated with senescence in non-pathogenic fungi, such as *Podospora anserina* [22] and *Neurospora crassa* [23].

Mitogenomics has become a useful tool for evolutionary studies [24], and the continuous advances in this field have contributed to the understanding of the diverse topology, organization and structure of mtDNA in fungi [25]. However, because mtDNA encodes approximately 1% of the mitochondrial proteome, scant information concerning

the roles of mitochondria in the metabolism, development and lifestyle of organisms has been gleaned from exclusive analyses of the mitochondrial genome Fungal mtDNA generally contains 14 genes that encode hydrophobic subunits of respiratory chain complexes, two genes that encode ribosomal RNAs (small and large subunits) and genes that encode a full set of tRNAs [26]. The other 99% of the mitochondrial proteome is encoded by the nuclear DNA and imported into the mitochondria [27]. Nuclear-encoded mitochondrial proteins (NMP) are produced by cytosolic ribosomes and are targeted to the proper mitochondrial subcompartment [28-30].

To understand mitochondrial functioning, studies using genomic, transcriptomic and proteomic approaches have been performed in several types of organisms, such as fungi [31], plants [32] and humans [33]. The first mitochondrial analysis using integrative proteomic and genomic approaches in fungi was conducted in *Saccharomyces cerevisiae* [34]. By overcoming the individual limitations of each technique, this integrative study produced a powerful tool for the prediction of mitochondrial processes in yeast. The *S. cerevisiae* mitochondrial proteome contains an estimated 1,000 proteins, of which 851 were identified using proteomic assays [30]. In *Neurospora crassa*, proteomic studies have led to the identification of 438 mitochondrial proteins [35]. Proteomics has previously been used to illuminate central processes in phytopathogenic fungi [36, 37]. Some of the more recent studies include analyses of mycelial, conidiospore and haustoria proteomes [38-42], fungal secreteomes and proteomes associated with fungal virulence [43]. However, the mitochondrial proteomes of phytopathogenic fungi have not been explored.

In this study, we performed a global analysis of *C. cacaofunesta* mitochondria using an integrative approach (i.e., mitogenomics, transcriptomics and proteomics). Here, we present the complete sequence and annotation of the *C. cacaofunesta* mitochondrial genome. In addition, we examined the nuclear genome of this species and identified a set of 1,072 genes that encode putative mitochondrial proteins. Using RNA-Seq, we verified that all these genes were transcribed in mycelia grown *in vitro*. Moreover, we identified 476 proteins using mass spectrometry, of which 83 were annotated as hypothetical proteins. This study is the first published genomic analysis of *Ceratocystis* and the first functional annotation based on the similarity of the mitochondria of phytopathogenic fungi to be created using this integrative approach.

2. Results and discussion

2.1. C. cacaofunesta mitochondrial genome structure

The complete mitochondrial genome of *Ceratocystis cacaofunesta* was assembled as a single, circular molecule comprising 103,147 bp (a coverage of 2,153-fold). *C. cacaofunesta* contains the fourth largest published fungal mitochondrial genome and the second largest among the Sordariomycetes, after that of *Chaetomium thermophylum* (127 kb) [44]. However, the differences in the sizes of fungal mitochondrial genomes are not correlated with differences in their number of genes [45, 46]. Therefore, the *C. cacaofunesta* mtDNA contains 15 genes that encode conserved proteins, such as NADH dehydrogenase subunits 1 to 6 and 4L (*nad*1 to nad6 and nad4L), cytochrome c oxidase subunits I, II and III (*cox*1, *cox*2 and *cox*3), ATP synthase subunits 6, 8 and 9 (*atp6, atp8* and atp9), apocytochrome b (cob) and a ribosomal protein (rps3) (Figure 1). With the exception of rps3, all of these conserved genes are involved in oxidative phosphorylation and ATP synthesis. The genes that encode the small and large rRNA subunits (rns and rnl, respectively) were also identified (Figure 1). All the rRNA- and protein-coding genes are oriented in the same direction (clockwise). The rps3 gene is encoded within a group I intron (small RNAs that have ability to self-splice from RNA transcripts) of the *rnl* gene in Sordariomycetes [47, 48]. It has been proposed that the structure of one gene (e.g., rps3) within another (e.g., rnl) guarantees that they are co-transcribed and that the stoichiometry of the two components is adequate for ribosome biogenesis [47]. In addition, the results of a sequence analysis using the tRNAscan-SE program [49] identified 31 putative tRNAs for 20 standard amino acids and a possible suppressor tRNA (amber). The gene order of the C. cacaofunesta mtDNA conserves all four syntenic units described for Sordariomycetes [50]: (i) rnl-trn₍₁₁₋₁₂₎-nad2-nad3, (ii) nad4L-nad5-cob-cox1, (iii) nad1nad4-atp8-atp6, and (iv) rns-trn₍₁₋₅₎-cox3-trn₍₁₋₅₎-nad6-trn₍₂₋₅₎. Several differences in the number and distribution of the *trn* genes were observed in syntenic blocks (i), (ii) and (iv). The gene pair nad2-nad3 is partially overlapping because the nad2 ORF extends 48 nucleotides into the nad3 reading frame (Figure 1). It has been proposed that the preservation of syntenic units could play a functional role, enabling the polycistronic transcription of these genes [51].



Figure 1: **Map of** *C. cacaofunesta* **mitochondrial DNA**. The numbers along the outermost circle are the DNA coordinates in Kb, beginning at 12 hours and continuing clockwise. The 12-hour scales for the GC content (in %, gray histogram) and the GC skew (dimensionless, black curve) are in the innermost circle. Conserved coding genes, pseudogenes, tRNAs and rRNAs are shown in the outermost circle. Introns and intronic ORFs are shown in the middle circle. The intronic ORFs of each gene are numbered as oi (intron number). The domains of each intronic ORF are indicated as LL, for LAGLIDADG, or G, for GIY-YIG. Similar intronic ORFs (with greater than 50% coverage and identity) are indicated with gray ribbons.

The annotation of the *C. cacaofunesta* mtDNA revealed that introns form 48.7% of the genome, which explains the large mitogenomic size; the invasion of mitochondrial genes by group I introns is a primary reason for the wide variation in fungal mitochondrial genome sizes [52]. A total of 37 mitochondrial group I introns, with an average size of

1,535 bp, were identified in the conserved coding and rRNA genes. Group I introns are commonly found in fungal mitochondria [52], and they are inserted into highly conserved sequences due to their functional importance [53]. These introns are distributed within conserved genes throughout the C. cacaofunesta mitochondrial genome, with cox1 harboring the largest number of these elements (approximately 10) (Figure 1). Cox1 has been described as a reservoir for mitochondrial group I introns in fungi, harboring up to 18 of these elements in Agaricus bisporus [54]. Most of the mitochondrial group I introns contain ORFs that encode homing endonuclease gene (HEG) [55]. The C. cacaofunesta mitochondrial genome contains 37 group I introns, of which 1 contains a conserved gene (rps3); the remaining 36 encode intronic ORFs (oi) (Figure 1). Because intron 1 of nad5 (oi1nad5) contains 2 ORFs, there are 37 total intronic ORFs in the C. cacaofunesta mitochondrial genome. Of the 37 introns, 36 encode HEGs larger than 100 amino acids. The remaining intronic ORF, which was localized to intron 5 of nad5 (oi5nad5), showed no significant similarity (e-value $< 1e^{-5}$) to any sequences in the nr or CDD databases and was considered to be a hypothetical protein. Oi5nad5 was the only non-conserved hypothetical ORF identified in the mitochondrial genome. An amino acids sequence analysis of the 36 putative endonucleases showed that 28 (75.7%) belonged to the LAGLIDADG endonuclease family and 8 (21.6%) belonged to the GIY-YIG endonuclease family, with an e-value $< 1e^{-5}$ (Figure 1). Six and twenty-two putative LAGLIDADG endonucleases contained one or two conserved domains, respectively (Figure 1). The putative function of these endonucleases is the site-specific integration of the introns in which the genes for these proteins are located, which suggests that they are mobile

elements. The dynamic properties of these introns suggest that they can be moved into other regions of the genome and between the genomes of phylogenetically distant species [56]. The mitochondrial genome analysis of 23 lineages of Podospora anserina indicated the gain and loss of intronic ORFs, which reinforces the hypothesis that they are mobile elements [57]. Two additional results suggested that these ORFs are dynamic elements. (i) We identified intronic ORFs that shared more than 50% identity and were located in introns of different genes, which suggested that these elements could be descendants of the same ancestral intronic ORF. For example, there are copies of the ORF located in intron 2 of nad5 (oi2nad5) in intron 1 of rnl (oi1rnl) and intron 1 of nad6 (oi1nad6) (Figure 1, gray ribbons). (ii) In addition, we identified an ORF similar to GIY-YIG endonucleases in an intergenic region flanked by tRNA coding sequences (Figure 1; region from nucleotide 13,156 to 14,337, labeled "pseudo GIY-YIG"). Mitochondrial introns have been associated with mitochondrial genome instability in S. cerevisiae [58], P. anserina [59] and N. crassa [60]. However, we did not observe any instability in the C. cacaofunesta mitochondrial genome.

Although the presence of mitochondrial plasmids is a common feature of Sordariomycetes such as *G. zeae* [61], *N. crassa* [60] and *P. anserine* [62], no integrated or free linear mitochondrial plasmids were revealed by the *C. cacaofunesta* mtDNA analysis. However, a pseudogene with similarity to the RNA polymerase (rpo) of the *Podospora anserina* mitochondrial plasmid pAL2-1 (e-value: 4e⁻⁹², 100% of query coverage and 57% of positives) was identified downstream of the *cox1* gene (Figure 1, labeled "pseudo *rpo*"). The first two hits in the tBLASTn searches for this pseudogene were performed with the

rpo-pseudogene from the *P. anserina* mitochondrial sequence (region from nucleotide 26,193 to 29,024) and with *rpo* from the *P. anserina* mitochondrial plasmid pAL2-1. The presence of this pseudogene suggests that this region may harbor a plasmid.

The analysis of the *C. cacaofunesta* mtDNA also showed an average of 26.8% G+C residues, which were uniformly distributed throughout the sequence. The intronic ORFs exhibited a slightly lower GC content (25.2%) than the conserved genes (26.5%). Moreover, a GC skew analysis was performed, and the shift points of the GC skew graphs were consistent with the loci of the origin (*org*) and termination (*ter*) of replication in bacteria [63] and some fungi [64].

Considering that more than 98% of its mitochondrial proteins are nuclear encoded [27], we estimated the total mitochondrial proteome of *C. cacaofunesta* based on the numbers of mitochondrial and nuclear-encoded genes.

2.2. Mitochondrial proteome

The prediction of the *C. cacaofunesta* mitochondrial proteome was performed using two computational strategies similar to the prediction strategy used for the mouse mitochondrial proteome [65]. First, we assembled a database of fungal mitochondrial proteins (FMPs) using two available mitochondrial protein datasets, those of *S. cerevisiae* [66] and *N. crassa* [35]. Based on the high conservation of mitochondrial proteins among eukaryotes [67], we used the FMP dataset to search for homologous proteins in the *C. cacaofunesta* nuclear genome. The results of this analysis revealed the presence of 488 mitochondrial proteins in *C. cacaofunesta* (Figure 2). There was strong evidence that these proteins were localized to the mitochondria: the reference database (FMP) used was

confirmed experimentally, and the filtering parameters of the BLASTp data (coverage and identity \geq 70%) were restricted to promote high accuracy. In accordance with Mcginnis and Madden [68], which revealed an identity \geq 70% and provided 90% accuracy, we used the data from the orthology analysis to infer the subcellular locations of the proteins. Considering the redundancy of the datasets used in the homology search, 65% and 57% of the mitochondrial proteins of *S. cerevisiae* and *N. crassa*, respectively, are represented in the *C. cacaofunesta* mitochondrial proteome.



Figure 2: Flowchart of the mitochondrial gene prediction. The gray boxes represent incoming and outgoing predictions, and the white boxes represent processes. The complete set of predicted mitochondrial proteins is surrounded by a black dotted line.

Although the use of the BLAST tool in small datasets from phylogenetically distant organisms imposes limitations [69], we used this computational approach to obtain a more comprehensive estimate of the mitochondrial proteome of *C. cacaofunesta*. Two mitochondrial targeting signal predictors were used to identify putative mitochondrial components: TargetP [70] and WoLF PSORT [71]. To minimize the number of false positives, mitochondrial protein classifications were based on obtaining predictions in both programs. From this analysis, 763 genes were identified that encode mitochondrial-targeted proteins in the *C. cacaofunesta* nuclear genome.

The use of these combined approaches generated a predicted total mitochondrial proteome for *C. cacaofunesta* that consisted of 1,124 polypeptides, with 1,072 nuclear-encoded proteins and 52 mitochondrial-encoded proteins (Supplemental File 1). Of the total proteins, 584 were identified using the predictor software (TargetP and WoLF PSORT), 309 were identified only by orthology analysis and 179 were identified using both methods (Figure 2). The predicted protein content of the *C. cacaofunesta* mitochondrial proteome is similar to that of the *S. cerevisiae* estimated mitochondrial proteome (approximately 1,000 polypeptides) [66], whereas the *A. thaliana* mitochondrial proteome is estimated to contain approximately 850 polypeptides [32] and the mouse mitochondrial proteome contains approximately 1,500 polypeptides [65].

2.3. Transcriptomic analysis

A global analysis of the *C. cacaofunesta* transcriptome was performed using largescale mRNA sequencing (RNA-Seq), as described in Section 5.6. This technique is widely used to analyze gene expression and to validate gene predictions [72-75], and it was

recently used to analyze mitochondrial gene expression [76, 77]. Approximately 54,500,000 reads were generated in two biological replicates (CER1 - 25,896,566 and CER2 - 28,577,566). Approximately 69% of the reads of both replicates were mapped on all the predicted genes, validating the gene predictions of C. cacaofunesta. A small number of reads were mapped to mitochondrial genes (CER1 - 400 and CER2 - 600), which primarily represented the average expression of six genes (nad2, nad3, cox3, io1cob, nadH, cox1) with RPKM \geq 1 (Supplemental File 1). Genes with RPKM < 1 were considered to not be expressed. Among the total reads mapped to nuclear genes 21,6% (11, 796,342) represent genes that encode mitochondrial proteins (5,600,151 from CER1 and 6,196,191 from CER2). This result indicates that the genes were expressed under the tested conditions and that the average expression of nuclear-encoded mitochondrial genes is approximately 2.5 times greater than the expression of all the nuclear genes (Figure 3). This high expression level can be explained by the large number of mitochondria in the cell in relation to the nuclear DNA. Of 1,072 genes, only 10 presented RPKM values less than 1 and 398 had RPKM values greater than 100 (Supplemental File 1). The gene with the largest expression level had an average RPKM value of 13,274 and encoded translation elongation factor 1a, which is a component of the protein synthesis machinery for tRNA transport to the mitochondria [78].



Figure 3: Distribution of RPKM values (in log scale) in mitochondrial (white) and nonmitochondrial (gray) genes. The transcription of the mitochondrial genes was 2.5x higher (on average) than that of the non-mitochondrial genes.

2.4. Experimental mitochondrial proteome

The isolated mitochondrial proteome was electrophoretically separated on a 12.5% SDS-PAGE gel, and 19 bands were excised from the gel and subjected to LC-MS/MS analysis, as described in Section 3.7.2. A total of 12,181 MS/MS spectra were generated and confidently assigned to 476 unique proteins with a significant (p<0.05) Mascot-based score and a 9.1% FDR (Supplemental File 4). Among the 476 proteins identified using LC-MS/MS, the 5 most abundant proteins presented more than 140 spectral counts in both samples (Supplemental File 4); these ranged from 34 to 138 kDa and presented no molecular weight bias in their abundance.

We identified 5 mitochondrial-encoded proteins (ATP6, COB, COX1, COX2 and NAD2), an intronic ORF (oi5cox2) and 470 NMPs (non-mitochondrial proteins). Among the total proteins identified using LC-MS/MS, 63.2% (304) were contained within the predicted mitochondrial proteome (Figure 2). The mitochondrial proteins identified in the experimental proteome comprised approximately 27% (304) of the total predicted proteome of *C. cacaofunesta* (1,124 polypeptides). Accordingly, the mitochondrial proteins but did not capture low-abundance proteins [65], except for proteins produced under specific circumstances [66]. Mitochondrial proteome studies of *N. crassa* have identified 473 proteins corresponding to 169 unique genes; these represent 20% of the total described mitochondrial proteome [35].

Of the 304 mitochondrial proteins that were distinguished using experimental LC-MS/MS, we identified 4 proteins of the pyruvate dehydrogenase complex (PDHA1, PDHB, PDK1 and DLAT) and 9 proteins of the tricarboxylic acid cycle (2-methylcitrate dehydratase [2], 2 CS, IDH1, isocitrate dehydrogenase, homoisocitrate dehydrogenase, isocitrate lyase, and IDH2). The experimental proteome also included a number of components of the predicted mitochondrial proteome that were associated with oxidative phosphorylation (13 complex I proteins, 2 of the 3 complex II - SDHA-B proteins, 3 complex III proteins, 2 complex IV proteins, and 5 complex V proteins). Remarkably, we identified 83 conserved hypothetical proteins and 1 unknown protein (Supplemental Files 1 and 4).

We also identified 172 proteins that were not predicted to be mitochondrial (Figure 2). These proteins included the following: (i) proteins of unknown cellular

localization, (ii) non-mitochondrial proteins that co-purified with the mitochondrial fraction and (iii) mitochondrial proteins that were not identified with the subcellular localization predictors used in this work. Manual annotation was used to elucidate the composition of this group of proteins. Of the 172 proteins, 53 were classified as having unknown cellular locations (group i) getting into this group (27 unknown function and no hits 6 in NR/NCBI). Thirty-five proteins were localized to different organelles or the cytosol (group ii) and 84 proteins were localized to the mitochondria (group iii), including 1 unknown protein (with no hits in GenBank NR) that had a conserved domain for mitochondrial localization (Supplemental File 1). This analysis brought the total number of mitochondrial proteins identified using LC-MS/MS to 388 (304 from prediction and 84 from manual annotation), which represents 81% of the total experimental proteome obtained (476 proteins). This result suggests that the enriched-mitochondrial preparation of C. cacaofunesta was performed with high efficiency. However, the preparation contained some cytosolic contaminants, such as enolases and other glycolysis-related proteins, including mannitol dehydrogenase and glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase [79]. It is well known that more than 25% of the 1,200 proteins in S. cerevisiae that are localized to a subcellular organelle are common to both a specific organelle and the cytoplasm [80]. Proteins related to different organelles have also been identified in the mitochondrial proteome of Trichoderma harzianum; almost 50% of the total proteins in this organism's mitochondrial proteome experimentally identified were identified as nonmitochondrial [81]. A survey of the experimental mitochondrial proteome of S. cerevisiae identified 750 proteins, of which 436 (58%) were known mitochondrial proteins, 208 had
no known localization and 106 were localized to other cellular compartments [66]. These results could reflect a mixed compartmentalization of proteins.

The experimental proteome was also used to identify new proteins and to confirm hypothetical proteins as real among the total proteins identified (476). In this study, we identified 110 conserved hypothetical proteins (83 predicted mitochondrial proteins and 27 proteins with no predicted location). Moreover, we revealed 7 (6 predicted and 1 unpredicted) proteins with no similarity to any other currently described proteins. Considering that there are more than 65 known *Sordariomycetes* genomes, these proteins are important for conducting additional detailed studies, as they could be specific to *C. cacaofunesta* and could be constituents of unknown mitochondrial pathways.

2.5. Functional annotation of the *C. cacaofunesta* mitochondrial proteome and comparison with homologs in *S. cerevisiae* and *N. crassa*

The predicted proteome was annotated using the NR/NCBI, KEGG [82], CDD (conserved domain) and UniRef90 databases [83]. The AutoFACT [84] and Blast2GO [85] programs were used to perform automatic annotation and Gene Ontology (GO) classification (see Methods and Supplemental File 1). Of the 1,124 predicted mitochondrial proteins, 1,070 were associated with some metabolic pathway. A total of 190 proteins were identified as enzymes in the KEGG database, and 138 of these enzymes were distributed in 78 metabolic pathways. The most abundantly represented metabolic pathways were nitrogen metabolism (with 41 enzymes) and oxidative phosphorylation (with 40 enzymes) (Supplemental File 2). A CDD search revealed that 958 proteins contained one or more conserved domains. The GO annotation assigned 724 proteins to

at least one level of ontology (411 proteins were assigned to cellular component, 619 to molecular function and 599 to biological process) (Supplemental File 1). Importantly, a functional annotation based on similarity was performed using the first hit result against NR. Our search for hypothetical proteins using KEGG, CDD and the GO analysis revealed that many of these proteins had functional annotations in most of the databases analyzed, except NR (Supplemental File 1). Forty-five proteins were not associated with any annotation data in any of the databases used (38 had no hits, and 7 were hypothetical proteins).

We focused on the GO annotation to perform a global function analysis of the predicted proteome of *C. cacaofunesta*. Putative functions were assigned to the predicted mitochondrial proteome using GO and were manually grouped into 12 categories, according to biological process. Only the amino acid, carbohydrate and lipid metabolism categories were queried using specific GO IDs, GO:0006519, GO:0005975 and GO:0006629, respectively. The remaining 9 categories included several related GO IDs, as described in Supplemental File 3. The results showed that within the subset of the *C. cacaofunesta* predicted mitochondrial proteome that had been annotated using the GO database (64% of the total), 15.2% of the proteins were directly involved in energy metabolism, including parts of the oxidative phosphorylation machinery (OXPHOS), members of the tricarboxylic acid cycle, and pyruvate dehydrogenase (Supplemental File 4). The largest category was "other" (27.6%), which was expected because it contained proteins from 26 small categories (Supplemental File 3). The second-most represented category in the proteome was genome maintenance and transcription, which includes

21.7% of all predicted mitochondrial proteins. However, the following categories were underrepresented: (i) response to stimulus, including responses to biotic, abiotic, endogenous and exogenous stimuli; and (ii) signaling, including proteins related to signal transduction, such as GTP-binding proteins and regulators of GTPases, which included 5.5% and 4.0% of all predicted mitochondrial proteins, respectively (Figure 4). At 3.0%, lipid metabolism was the smallest category in the *C. cacaofunesta* mitochondrial proteome. Notably, 18.7% of the total predicted proteins were assigned to the transport of metabolites category. This category included ATP-binding cassette (ABC) transporters, ion transport families, protein transporters and other metabolite transporters (Figure 4).



Figure 4: Distribution of Gene Ontology (GO) categories for the predicted mitochondrial genes of *N. crassa* (light gray), *S. cerevisiae* (dark gray) and *C. cacaofunesta* (black).

We used the same GO categorization criteria as above to annotate the *S. cerevisiae* and *N. crassa* mitochondrial proteomes [35, 66] to compare their global functional profiles (Supplemental File 3; Figure 4). The putative functions of the *C. cacaofunesta* predicted mitochondrial proteins showed the same percentages of proteins in each GO category as those observed for the *S. cerevisiae* and *N. crassa* proteomes. The observation of this global proteome pattern in all three fungi (Figure 4) is expected, considering the importance and preservation of mitochondrial function [86]. The most-represented category was "genome maintenance", whereas "lipid metabolism" was the leastrepresented category. Some of the categories presented here, such as signaling, energy metabolism, lipid metabolism, protein transport and protein folding, have protein percentages similar to those described for the *S. cerevisiae* mitochondrial proteome, according the most recent publication on the subject, that of Schmidt et al [30].

The same GO categorization was performed using the experimental proteome. For this purpose, the 388 proteins with potential mitochondrial localizations that had been identified using LC-MS/MS were subjected to a GO analysis (Supplemental File 3). The results shown in Figure 5 revealed that the categories most strongly represented in the experimental proteome were transport of metabolites (23.9%), energy metabolism (20.4%) and protein metabolism (19.7%). The classifications of the experimental proteins reflect the *C. cacaofunesta* culture conditions (malt, yeast extract and agar). The fungus grows rapidly, which suggests an intense metabolism, including the synthesis of enzymes and the import of proteins and metabolites. In addition, the availability of glucose as the

primary carbon source likely enhanced the expression of genes involved in energy metabolism. Vodisch et al [87] examined the mitochondrial proteome of *Aspergillus nidulans* as a part of the global fungal proteome. They observed a clear relationship between the culture conditions and the enriched classes of experimentally identified proteins.



Figure 5: Distribution of Gene Ontology (GO) categories for the *C. cacaofunesta* nuclear genes encoding the mitochondrial proteins identified using LC-MS/MS.

2.6. C. cacaofunesta global proteome survey

It is well established that mitochondrial functioning is important for the virulence and pathogenicity of fungi [17, 88]. Here, we demonstrated that the global proteome compositions of *S. cerevisiae*, *N. crassa* and *C. cacaofunesta* do not contain large differences. However, of these three fungi, *C. cacaofunesta* is the only pathogenic fungus with putative mitochondrial functions in pathogenesis, which prompted us to perform a more detailed investigation of its proteome composition. Therefore, we analyzed predicted mitochondrial proteins of *C. cacaofunesta* that might play important roles in pathogenicity and sensitivity/resistance to fungicides, according to the literature. Figure 6 shows the import of proteins into mitochondria and several proteins with important roles in the pathogenicity of fungi related to virulence (ABC transporter, aldehyde dehydrogenase, NAD alternative, oxidase alternative, the mitochondrial carrier FOW1, glutathione S-transferase and one hypoxia-related protein).



Figure 6: Schematic representation of the mitochondrial proteins involved in the pathogenicity of *C. cacaofunesta.* A: Detailed representation of a hypha, including the nucleus and mitochondria. B: Detailed representation of the import of mitochondrial proteins. C: Representation of proteins important for pathogenicity and the electron transport chain (I, II, III, IV and V).

C. cacaofunesta contains 2 genes that encode ABC transporters. These genes were expressed under the tested conditions with average RPKM values of 31, 140 and 1,463, and they were identified in the experimental proteome (Supplemental File 1). Analysis of a *Nectria haematococca* strain with a mutation in the NhABC1 transporter gene has

revealed that this gene is a virulence factor. Moreover, NhABC1 contributes to the *Nectria haematococca* tolerance of phytoalexin during the pathogen interaction with the host [89]. Furthermore, ABC transporters have been associated with fungicide resistance [90]. Aldehyde dehydrogenase has also been implicated in pathogenicity of fungi. An analysis of aldehyde dehydrogenase (ADH) expression in *Clasdosporium fulvum* both *in vitro* and *in vivo* (during interactions with tomato plants) showed that the expression of this gene was associated with infection and starvation conditions [91]. Interestingly, our *C. cacaofunesta* mitochondrial proteome survey (using RNA-Seq) identified 12 ADH genes with confirmed expression (RPKMs > 10), and 6 ADH proteins were identified in the experimental proteome.

Other mitochondrial proteins reported to be involved in pathogenicity include alternative components of the respiratory chain and alternative NAD dehydrogenase (NADH) [92] and alternative oxidase (AOX) components [93]. Studies of *Aspergillus niger* using blocked alternative NADH demonstrated the role of this protein in protection against oxidative stress [94]. The *C. cacaofunesta* mitochondrial proteome contains 3 predicted proteins whose genes presented average RPKM values > 30. One of these proteins was identified using LC-MS/MS (Supplemental File 1). In addition to protection against oxidative stress, AOX could play important roles in pathogenicity and resistance to fungicides [95, 96]. The predicted mitochondrial proteome also included a putative alternative oxidase (AOX). This protein was not identified in the experimental proteome, but it had detectable expression, with an RPKM value of approximately 88 (Supplemental

File 1). Recently, Thomazella et al [97] provided strong evidence for the involvement of AOX in maintaining the infective phase of the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*.

The deletion of a *Fusarium oxysporum* mitochondrial carrier (FOW1) caused this fungus to lose its ability to infect plant tissues [98]. A putative FOW1 protein was identified in the *C. cacaofunesta* predicted mitochondrial proteome. The RNA-Seq data showed that the gene that encodes this protein was highly expressed (with an RPKM value of 536), and its product was identified in the experimental proteome (Supplemental File 1). Because *F. oxysporum* is a Sordariomycete that causes wilt disease in the tomato, we propose that the homologous FOW1 gene in *C. cacaofunesta* could be a target for further functional studies.

Glutathione S-transferases (GSTs) are a large family of proteins involved in cellular detoxification processes in the oxidative stress response [99] and resistance to fungicides [100]. Thuillier et al [101] suggested a link between the number of the GST-encoding genes in a fungus and its life cycle. The *C. cacaofunesta* predicted mitochondrial proteome contains 4 GST proteins. The results of the RNA-Seq analysis showed varying average expression levels, with RPKM values of up to 150. A total of 4 GST proteins were identified in the *C. cacaofunesta* experimental proteome (Supplemental File 1).

It has been reported that the ability of some fungi to withstand different levels of hypoxia is a critical virulence factor for pathogenicity [102]. Hypoxia-related genes have been identified as important virulence factors for *Aspergillus* and *Candida* because these fungi are exposed to low oxygen concentrations during infection [103-105]. Under hypoxic conditions, *A. fumigatus* increased the production of respiratory proteins to compensate

for the depletion of molecular oxygen [105]. The predicted *C. cacaofunesta* mitochondrial proteome contains a protein with a conserved hypoxia response domain. The results of the RNA-Seq experiments showed that the gene that encodes this protein was highly expressed (with an RPKM value of 589), and the protein was identified in the experimental proteome (Supplemental File 1).

Of the 1,124 predicted mitochondrial proteins in *C. cacaofunesta*, 53% (599) were associated with some biological process. The amount of data attained is notable, considering that this is the first study of the *C. cacaofunesta* mitochondrial proteome. Although many previous proteomics efforts have focused on evaluating mitochondrial functions in *S. cerevisiae*, 850 (19.3%) of this organism's mitochondrial proteome are unknown function proteins (UFP) [30].

3. Conclusion

In this study, we examined the mitochondrial genome of *C. cacaofunesta*, which comprises 15 conserved genes and 37 intronic ORFs in a single, 103,147-bp circular molecule, the second largest mitochondrial genome among the *Sordariomycetes*. This study is the first global mitochondrial analysis of a member of the *Ceratocystis* species complex and of a phytopathogenic fungus. We also presented an inventory of 1,124 proteins that constitute the *C. cacaofunesta* mitochondrial proteome, including 52 mitochondrial-encoded polypeptides and 1,024 predicted nuclear-encoded mitochondrial proteins. Moreover, an experimental mitochondrial proteome was generated using LC-MS/MS, which identified 476 proteins, of which 304 were predicted to be mitochondrial, 83 were conserved hypothetical proteins and 1 was unknown. More research remains

necessary to completely characterize the total mitochondrial proteome of *C. cacaofunesta*, but the dataset generated in this work should increase our understanding of this organelle and provide a guideline for studies of *C. cacaofunesta* and other pathogenic fungi of the *Ceratocystis* complex.

4. Materials and Methods

4.1 Biological material and nucleic acid isolation

Dr. Tomas Harrington, from the Iowa State University Department of Plant Pathology, generously donated *Ceratocystis cacaofunesta* strain C1593. This strain was isolated in 1999 from infected cacao trees located on a farm in the district of Uruçuca, Bahia, Brazil. In our laboratory, *C. cacaofunesta* cultures were maintained on 2% malt, yeast extract and agar (MYEA) plates inside a BOD chamber at 28 °C. For liquid cultures, 20 to 30 agar blocks (1 mm²) removed from the solid cultures were inoculated into flasks containing 100 mL of malt media and were cultivated at 28 °C for 7 days, under constant agitation at 150 rpm.

The mycelia were separated from the media using filtration, were washed twice with sterile distilled water and were frozen with liquid nitrogen. The samples were ground to a fine powder in a mortar and were processed for DNA isolation as previously described [106]. The RNA isolation was performed using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. All the isolated genetic materials were qualitatively analyzed with denaturing formaldehyde/agarose gel electrophoresis and were guantified using a NanoDrop[™] 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

4.2 Genome sequencing and assembly

The *C. cacaofunesta* mitochondrial genome was sequenced as part of the *C. cacaofunesta* Genome Project (<u>www.lge.ibi.unicamp.br/*Ceratocystis*</u>). The DNA was sequenced on a Genome Analyzer IIx platform (Illumina) at the University of North Carolina-Chapel Hill High-Throughput Sequencing Facility. The whole-genome shotgun strategy was used to produce 76-bp paired-end reads (400-bp insert size) and 36-bp mate-pair reads (3-Kb insert size).

The paired-end reads were assembled into longer scaffolds using *de novo* assembler VELVET 1.0.12 software [107] with a k-mer parameter of 69, which maximizes the length of the mitochondrial DNA (mtDNA) contig. The mtDNA was identified through comparisons with *C. cacaofunesta* scaffolds and *Gibberella zeae* mtDNA (NC_009493), resulting in the identification of a single mtDNA contig. To verify the topology of the mtDNA, we used the paired-end and mate-pair reads that had been aligned with the mtDNA using the SOAP2 aligner [108]. The reads that mapped to the borders of the contig were located at an expected distance from their respective pairs.

The complete mtDNA sequence was deposited into the GenBank database and is available under the accession number JX185564.

4.3 mtDNA annotation

BLAST searches were used to identify known conserved coding genes and intronic ORFs [109] as well as tRNAs [110] in the *C. cacaofunesta* mtDNA. Genes that encode both rRNA subunits (small and large) were identified through comparisons with *Gibberella zeae*

homologous sequences. The putative ORFs of the *C. cacaofunesta* mitochondrial genome were annotated manually.

4.4 mtDNA GC content, GC skew and codon usage

The GC content, local GC content and cumulative GC skew of the *C. cacaofunesta* mtDNA were calculated using customized Perl scripts (available upon request). For the local GC content and cumulative GC skew, a sliding window of over 5,000 bp with a 500-bp range was used. The codon usage was determined with the CodonW program [111].

4.5 Predicted Mitochondrial Proteome

The putative genes encoding NMPs were identified using two strategies: *ab initio* prediction and sequence comparison. For the *ab initio* prediction, the SignalP 3.0 software [112] was used to analyze all the predicted nuclear proteins to identify those with a low probability ($\leq 50\%$) of containing a signal peptide. Using the SignalP results as the input, the WoLF PSORT [71] and TargetP [70] programs were used to classify putative mitochondrial proteins. In the TargetP output, only the proteins identified with highly probability as encoding mitochondrial genes (mTP $\geq 50\%$ and other $\leq 50\%$) were considered. The proteins identified by both programs (TargetP and WoLF PSORT) constituted the final *ab initio* protein dataset. In order to identify proteins using the sequence comparison approach, we built a database containing 1,583 mitochondrial proteins (Supplemental File 1); 741 proteins were from *Saccharomyces cerevisiae* [66], and 842 were from *Neurospora crassa* [35]. After the nuclear proteins were compared against this database using BLASTp (with an e-value cutoff of 1e-5), the comparative protein dataset was obtained from the BLAST results by applying query coverage ($\geq 70\%$)

and similarity (≥70%) filters. The *ab initio* and comparative protein datasets were combined to generate the final NMP dataset.

The sequences of the nuclear-encoded mitochondrial proteins from *C. cacaofunesta* are provided in Supplemental File 6.

The automatic annotation of the NMPs was performed using the NR/NCBI, KEGG [82], CDD/Pfam and UniRef90 databases (BLASTp with an e-value cutoff of 1e⁻⁵) (Bateman et al., 2002). The AutoFACT program [84] was used to perform the functional annotation, and the Blast2GO program [85] was used to perform the gene ontology classification (BLASTp with an e-value cutoff of 1e⁻⁵ on Generic GO Slim; the first 50 hits were considered). The proteins with identified biological functions according to GO Slim were manually grouped into 12 classes (amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, cell organization, energy metabolism, genome maintenance and transcription, lipid metabolism, protein metabolism, protein transport and folding, response to stimulus, signaling, transport of metabolites and other). The proteins that were classified into more than one category were considered as members of both categories, except the proteins that were classified as both "other" and another category; these were excluded from the "other" category and remained in the specific category. Thus, the "other" category includes proteins of known function that were not included in any category described above. The GO Slim biological processes clustered in each category are shown in Supplemental File 5. Similar analyses were performed for the S. cerevisiae and N. crassa mitochondrial proteomes to compare them with the *C. cacaofunesta* data.

4.6 Transcriptome analysis

The expression levels of all the predicted NMPs were verified by analyzing two RNA-Seq libraries. The SOAP2 aligner [108] was used to align the RNA-Seq reads from mycelia grown *in vitro* with predicted genes that encode nuclear-encoded mitochondrial proteins. The program was configured to allow up to two mismatches, to discard sequences containing "N"s and to return all optimal alignments. The expression level of each gene was estimated as an RPKM (reads per kilobase of exon per million reads mapped) value [113].

4.7 Mitochondrial isolation and Proteomic assays

4.7.1 Mitochondrial isolation

The mitochondrial isolation was performed according to the protocol described by Sorensen et al [114], with minor modifications. *C. cacaofunesta* was cultured for seven days in standard MYEA growth medium. Subsequently, the fungal mycelia were washed in cold water and homogenized using a bead beater in cold extraction buffer containing 330 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% PVP, 0.1% BSA and 0.3 mM PMSF (pH 7.5). The homogenates were filtered and centrifuged at 1,500 g for 15 min to remove the cellular debris. The resulting supernatants were centrifuged at 15,500 g for 20 min. The samples were rinsed twice in wash buffer (330 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.2), and the final mitochondrial preparation was used to perform the proteomic assays.

4.7.2 Identification of proteins with LC-MS/MS

Enzymatic in-gel digestion for mass spectrometry analysis

A total of 20 µg of the concentrated mitochondrial proteome was obtained as described in Section 5.7.1 and was separated using one-dimensional SDS-PAGE electrophoresis. Nineteen bands were excised from the gel and subjected to in-gel trypsin digestion as previously described [115], with modifications.

The resulting peptide solution was dried in a SpeedVac concentrator and resuspended in 100 μ L of 0.1% formic acid. An aliquot of 4.5 μ L was separated using C18 (75 μ m × 100 mm) RP-nanoUPLC (nanoAcquity, Waters) coupled with a Q-Tof Ultima mass spectrometer (Waters) with a nano-electrospray source at a flow rate of 600 nL/min. The gradient was 2-90% acetonitrile in 0.1% formic acid over 45 min. The instrument was operated in the "top three" mode, in which one MS spectrum was acquired, followed by an MS/MS analysis of the top three most-intense peaks detected [116].

The spectra were acquired using MassLynx v.4.1 software, and the raw data files were converted to a peak list format (mgf) using the Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 software (Matrix Science Ltd.) without summing the scans, which allowed a label-free analysis. The files were then searched against the *Ceratocystis cacaofunesta* database (7,321 entries – 7,269 nuclear proteins and 52 mitochondrial proteins) using Mascot engine v.2.3.01 (Matrix Science Ltd.), with carbamidomethylation as a fixed modification, methionine oxidation as a variable modification, one trypsin lacking cleavage and a tolerance of 0.1 Da for both precursor and fragment ions. For the protein quantitation, the .dat files from the Mascot output were analyzed using Scaffold Q+ (version 3_00_03,

Proteome Software), and quantitative values (normalized spectral counts) were obtained

[117, 118]. For the endogenous peptide identification, methionine oxidation was set as a

variable modification, with a tolerance of 0.1 Da for both precursor and fragment ions.

Only peptides with a minimum of five amino acid residues and significant (p<0.05)

Mascot-based scores were considered in the results.

Authors' information

¹Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CEP: 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil. ² Laboratório Nacional de Biociências-LNBio, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brasil. ³Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho, Universidade Estadual de Campinas, CEP: 13083-970, Campinas,SP, Brasil. ⁴ High-Throughput Sequencing Facility, University of North Carolina, 2234 Nelson Highway Chapel Hill NC 27516, NC, USA. ⁵ Sustainable Perennial Crops Laboratory, USDA/ARS, 10300 Baltimore Ave., Beltsville, MD 20705, USA.

Additional file 1: Supplemental1_all_genes.xlsx, 366K http://www.biomedcentral.com/imedia/1375051184785473/supp1.xlsx Additional file 2: Supplemental2_Kegg.xlsx, 12K http://www.biomedcentral.com/imedia/1677104642785473/supp2.xlsx Additional file 3: Supplemental3_GOslim.xlsx, 248K http://www.biomedcentral.com/imedia/1360831866785473/supp3.xlsx Additional file 4: Supplemental4_LCMS.xlsx, 57K http://www.biomedcentral.com/imedia/1680616544785473/supp4.xlsx Additional file 5: Supplemental5_categories.xlsx, 13K http://www.biomedcentral.com/imedia/8951794827854735/supp5.xlsx Additional file 6: Supplemental file_6.txt, 551K http://www.biomedcentral.com/imedia/1056289082785473/supp6.txt Additional file 7: SupplementaFile7.mzid, 1750K

6. References

 Baker CJ, Harrington TC, Krauss U, Alfenas AC: Genetic Variability and Host Specialization in the Latin American Clade of *Ceratocystis* fimbriata. *Phytopathology* 2003, 93(10):1274-1284.

- Johnson JA, Harrington TC, Engelbrecht CJ: Phylogeny and taxonomy of the North American clade of the *Ceratocystis* fimbriata complex. *Mycologia* 2005, 97(5):1067-1092.
- 3. Barnes I, Gaur A, Burgess T, Roux J, Wingfield BD, Wingfield MJ: Microsatellite markers reflect intra-specific relationships between isolates of the vascular wilt pathogen *Ceratocystis* fimbriata. *Molecular plant pathology* 2001, **2**(6):319-325.
- Engelbrecht CJ, Harrington TC, Steimel J, Capretti P: Genetic variation in eastern North American and putatively introduced populations of *Ceratocystis* fimbriata f. platani. *Molecular ecology* 2004, 13(10):2995-3005.
- Kamgan Nkuekam G, Wingfield MJ, Mohammed C, Carnegie AJ, Pegg GS, Roux J: Ceratocystis species, including two new species associated with nitidulid beetles, on eucalypts in Australia. Antonie van Leeuwenhoek 2012, 101(2):217-241.
- Engelbrecht CJ, Harrington TC: Intersterility, morphology and taxonomy of Ceratocystis fimbriata on sweet potato, cacao and sycamore. Mycologia 2005, 97(1):57-69.
- Bastos CN EH: Ocorrência de Ceratocystis fimbriata Ell & Halst. na Amazônia Brasileira. Acta Amazonica 1978, 8:543–544.
- Bezerra JL: Ceratocystis fimbriata causing death of budded cocoa seedlings in Bahia, Brazil. Incoped Newsletter 1997, 1:6.
- 9. Malaguti G: Ceratostomella fimbriata en el cacao de Venezuela. Acta Científica Venezolana 1952, 3:94–97.
- 10. Saunders JL: The Xyleborus-*Ceratocystis* complex of cacao. *Cacao* 1965., **10**:7-13.
- 11. Harrington TC: Host specialization and speciation in the American wilt pathogen *Ceratocystis* fimbriata. *Fitopatologia Brasileira* 2000, **25S**:262-263.
- 12. Spence JA: **Preliminary observations on a wilt condition of cocoa.** . *Caribbean Comm Publ Exchange Service, Cocoa* 1958, **No. 76.**
- 13. Thorold CA: **Diseases of cocoa.** *Diseases of cocoa Press Oxford UK,* 1975, **XII**:423 pp.

- 14. Engelbrecht CJ, Harrington TC, Alfenas A: *Ceratocystis* wilt of cacao-a disease of increasing importance. *Phytopathology* 2007, **97**(12):1648-1649.
- Ferreira MA, Harrington TC, Alfenas AC, Mizubuti ES: Movement of genotypes of Ceratocystis fimbriata within and among Eucalyptus plantations in Brazil. Phytopathology 2011, 101(8):1005-1012.
- Harrington TC, Thorpe DJ, Alfenas AC: Genetic variation and variation in aggressiveness to native and exotic hosts among Brazilian populations of *Ceratocystis* fimbriata. *Phytopathology* 2011, 101(5):555-566.
- Shingu-Vazquez M, Traven A: Mitochondria and fungal pathogenesis: drug tolerance, virulence, and potential for antifungal therapy. *Eukaryotic cell* 2011, 10(11):1376-1383.
- Schatz G: Mitochondria: beyond oxidative phosphorylation. Biochimica et biophysica acta 1995, 1271(1):123-126.
- Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD: Calcium and mitochondria.
 FEBS letters 2004, 567(1):96-102.
- 20. Muhlenhoff U, Richhardt N, Gerber J, Lill R: Characterization of iron-sulfur protein assembly in isolated mitochondria. A requirement for ATP, NADH, and reduced iron. *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(33):29810-29816.
- 21. Eisenberg T, S.Buttner, G.Kroemer, and F.Madeo. : The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis* 2007, **12**:1011-1023.
- Lorin S, Dufour E, Sainsard-Chanet A: Mitochondrial metabolism and aging in the filamentous fungus Podospora anserina. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Bioenergetics 2006, 1757(5–6):604-610.
- 23. Court DA, Griffiths AJF, Kraus SR, Russell PJ, Bertrand H: A new senescenceinducing mitochondrial linear plasmid in field-isolated <i>Neurospora crassa strains from India. Current genetics 1991, 19(2):129-137.
- 24. Torriani SF, Goodwin SB, Kema GH, Pangilinan JL, McDonald BA: Intraspecific comparison and annotation of two complete mitochondrial genome sequences

from the plant pathogenic fungus Mycosphaerella graminicola. *Fungal genetics and biology : FG & B* 2008, **45**(5):628-637.

- 25. Solieri L: Mitochondrial inheritance in budding yeasts: towards an integrated understanding. *Trends in Microbiology* 2010, **18**(11):521-530.
- 26. Wiedemann N, Frazier AE, Pfanner N: **The protein import machinery of mitochondria**. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(15):14473-14476.
- 27. Gray MW, Lang BF: Transcription in chloroplasts and mitochondria: a tale of two polymerases. *Trends in microbiology* 1998, **6**(1):1-3.
- Dolezal P, Likic V, Tachezy J, Lithgow T: Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* 2006, 313(5785):314-318.
- 29. Neupert W, Herrmann JM: **Translocation of proteins into mitochondria**. *Annual review of biochemistry* 2007, **76**:723-749.
- 30. Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C: **Mitochondrial protein import: from** proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, **11**(9):655-667.
- 31. Costa GG, Cabrera OG, Tiburcio RA, Medrano FJ, Carazzolle MF, Thomazella DP, Schuster SC, Carlson JE, Guiltinan MJ, Bailey BA *et al*: **The mitochondrial genome of Moniliophthora roreri, the frosty pod rot pathogen of cacao**. *Fungal biology* 2012, **116**(5):551-562.
- 32. Heazlewood J, Julian S. Tonti-Filippini, Alexander M. Gout, David A. Day, James Whelan, and A. Harvey Millar: Experimental Analysis of the Arabidopsis Mitochondrial Proteome Highlights Signaling and Regulatory Components, Provides Assessment of Targeting Prediction Programs, and Indicates Plant-Specific Mitochondrial Proteins. *The Plant cell* 2004, 16(1):241–256.
- Mercer Tim R, Neph S, Dinger Marcel E, Crawford J, Smith Martin A, Shearwood A-Marie J, Haugen E, Bracken Cameron P, Rackham O, Stamatoyannopoulos John A *et al*: The Human Mitochondrial Transcriptome. *Cell* 2011, 146(4):645-658.
- Prokisch H, Scharfe C, Camp DG, II, Xiao W, David L, Andreoli C, Monroe ME, Moore RJ, Gritsenko MA, Kozany C *et al*: Integrative Analysis of the Mitochondrial Proteome in Yeast. *PLoS Biol* 2004, 2(6):e160.

- 35. Doyle CE, Donaldson ME, Morrison EN, Saville BJ: Ustilago maydis transcript features identified through full-length cDNA analysis. *Molecular genetics and genomics : MGG* 2011, **286**(2):143-159.
- 36. Keeping A, Deabreu D, Dibernardo M, Collins RA: Gel-based mass spectrometric and computational approaches to the mitochondrial proteome of Neurospora. Fungal genetics and biology : FG & B 2011, 48(5):526-536.
- 37. Tan K-C, Ipcho SVS, Trengove RD, Oliver RP, Solomon PS: Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. *Molecular Plant Pathology* 2009, **10**(5):703-715.
- Gonzalez-Fernandez R, Prats E, Jorrin-Novo JV: Proteomics of plant pathogenic fungi. Journal of biomedicine & biotechnology 2010, 2010:932527.
- Yajima W, Kav NN: The proteome of the phytopathogenic fungus Sclerotinia sclerotiorum. *Proteomics* 2006, 6(22):5995-6007.
- 40. Fernandez-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Carbu M, Camafeita E, Lopez JA, Cantoral JM, Jorrin J: Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus Botrytis cinerea. *Proteomics* 2006, 6 Suppl 1:S88-96.
- Medina M: Genomes, phylogeny, and evolutionary systems biology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005, 102 Suppl 1:6630-6635.
- Shah P, Atwood JA, Orlando R, El Mubarek H, Podila GK, Davis MR: Comparative proteomic analysis of Botrytis cinerea secretome. J Proteome Res 2009, 8(3):1123-1130.
- 43. Godfrey D, Zhang Z, Saalbach G, Thordal-Christensen H: A proteomics study of barley powdery mildew haustoria. *PROTEOMICS* 2009, **9**(12):3222-3232.
- 44. Xu J, Saunders CW, Hu P, Grant RA, Boekhout T, Kuramae EE, Kronstad JW, Deangelis YM, Reeder NL, Johnstone KR *et al*: Dandruff-associated Malassezia genomes reveal convergent and divergent virulence traits shared with plant and human fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the* United States of America 2007, 104(47):18730-18735.

- 45. Amlacher S, Sarges P, Flemming D, van Noort V, Kunze R, Devos Damien P, Arumugam M, Bork P, Hurt E: Insight into Structure and Assembly of the Nuclear Pore Complex by Utilizing the Genome of a Eukaryotic Thermophile. *Cell* 2011, 146(2):277-289.
- 46. Paquin B, Lang BF: The mitochondrial DNA of Allomyces macrogynus: the complete genomic sequence from an ancestral fungus. *Journal of molecular biology* 1996, **255**(5):688-701.
- 47. Turmel M, Lemieux C, Burger G, Lang BF, Otis C, Plante I, Gray MW: The complete mitochondrial DNA sequences of Nephroselmis olivacea and Pedinomonas minor. Two radically different evolutionary patterns within green algae. *The Plant cell* 1999, **11**(9):1717-1730.
- 48. Sethuraman J, Majer A, Friedrich NC, Edgell DR, Hausner G: Genes within genes: multiple LAGLIDADG homing endonucleases target the ribosomal protein S3 gene encoded within an rnl group I intron of Ophiostoma and related taxa. *Molecular biology and evolution* 2009, 26(10):2299-2315.
- Sethuraman J, Majer A, Iranpour M, Hausner G: Molecular evolution of the mtDNA encoded rps3 gene among filamentous ascomycetes fungi with an emphasis on the Ophiostomatoid fungi. *Journal of molecular evolution* 2009, 69(4):372-385.
- 50. Lowe TM, Eddy SR: tRNAscan-SE: A Program for Improved Detection of Transfer RNA Genes in Genomic Sequence. *Nucleic Acids Research* 1997, **25**(5):0955-0964.
- 51. Pantou MP, Kouvelis VN, Typas MA: The complete mitochondrial genome of the vascular wilt fungus Verticillium dahliae: a novel gene order for Verticillium and a diagnostic tool for species identification. *Current genetics* 2006, **50**(2):125-136.
- Pantou MP, Kouvelis VN, Typas MA: The complete mitochondrial genome of Fusarium oxysporum: insights into fungal mitochondrial evolution. *Gene* 2008, 419(1-2):7-15.
- Hurst GDD, Werren JH: The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. Nat Rev Genet 2001, 2(8):597-606.

- 54. Cechetto JD, Sadacharan SK, Berk PD, Gupta RS: Immunogold localization of mitochondrial aspartate aminotransferase in mitochondria and on the cell surface in normal rat tissues. *Histology and histopathology* 2002, **17**(2):353-364.
- 55. Ferandon C, Moukha S, Callac P, Benedetto JP, Castroviejo M, Barroso G: The Agaricus bisporus cox1 gene: the longest mitochondrial gene and the largest reservoir of mitochondrial group i introns. *PloS one* 2010, **5**(11):e14048.
- Chevalier BS, Stoddard BL: Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. Nucleic Acids Research 2001, 29(18):3757-3774.
- Haugen P, Simon DM, Bhattacharya D: The natural history of group I introns.
 Trends in genetics : TIG 2005, 21(2):111-119.
- Cummings DJ, McNally KL, Domenico JM, Matsuura ET: The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of Podospora anserina. *Current genetics* 1990, 17(5):375-402.
- 59. Dimmer KS, Fritz S, Fuchs F, Messerschmitt M, Weinbach N, Neupert W, Westermann B: Genetic Basis of Mitochondrial Function and Morphology inSaccharomyces cerevisiae. *Molecular Biology of the Cell* 2002, **13**(3):847-853.
- 60. Cummings DJ, Michel F, Domenico JM, McNally KL: Mitochondrial DNA sequence analysis of the cytochrome oxidase subunit II gene from Podospora anserina. A group IA intron with a putative alternative splice site. *Journal of molecular biology* 1990, **212**(2):287-294.
- Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Selker EU, Read ND, Jaffe D, FitzHugh W, Ma L-J, Smirnov S, Purcell S *et al*: The genome sequence of the filamentous fungus Neurospora crassa. *Nature* 2003, 422(6934):859-868.
- Jurgenson JE, Bowden RL, Zeller KA, Leslie JF, Alexander NJ, Plattner RD: A genetic map of Gibberella zeae (Fusarium graminearum). *Genetics* 2002, 160(4):1451-1460.
- 63. Osiewacz HD, Hermanns J, Marcou D, Triffi M, Esser K: Mitochondrial DNA rearrangements are correlated with a delayed amplification of the mobile intron

(pIDNA) in a long-lived mutant of Podospora anserina. *Mutation research* 1989, **219**(1):9-15.

- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF *et al*: The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12. Science 1997, 277(5331):1453-1462.
- 65. Andersson SG, Kurland CG: Ancient and recent horizontal transfer events: the origins of mitochondria. *APMIS Supplementum* 1998, **84**:5-14.
- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C,
 Boneh A, Chen WK *et al*: A mitochondrial protein compendium elucidates
 complex I disease biology. *Cell* 2008, 134(1):112-123.
- 67. Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schonfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B *et al*: **The proteome of Saccharomyces cerevisiae mitochondria**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(23):13207-13212.
- 68. Gray MW: Evolution of organellar genomes. Current opinion in genetics & development 1999, 9(6):678-687.
- 69. McGinnis S, Madden TL: **BLAST: at the core of a powerful and diverse set of** sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* 2004, **32**(suppl 2):W20-W25.
- 70. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H: Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protocols* 2007, **2**(4):953-971.
- Horton P, Park KJ, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier CJ, Nakai K: WoLF
 PSORT: protein localization predictor. Nucleic Acids Res 2007, 35(Web Server issue):W585-587.
- 72. Wilhelm BT, Landry JR: RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods* 2009, **48**(3):249-257.
- 73. Au KF, Jiang H, Lin L, Xing Y, Wong WH: **Detection of splice junctions from paired**end RNA-seq data by SpliceMap. *Nucleic Acids Research* 2010, **38**(14):4570-4578.
- 74. Richard H, Schulz MH, Sultan M, Nurnberger A, Schrinner S, Balzereit D, Dagand E, Rasche A, Lehrach H, Vingron M *et al*: **Prediction of alternative isoforms from**

exon expression levels in RNA-Seq experiments. Nucleic Acids Res 2010, 38(10):e112.

- 75. Rogers MF, Thomas J, Reddy AS, Ben-Hur A: SpliceGrapher: detecting patterns of alternative splicing from RNA-Seq data in the context of gene models and EST data. *Genome biology* 2012, **13**(1):R4.
- 76. Torres TT, Dolezal M, Schlötterer C, Ottenwälder B: Expression profiling of Drosophila mitochondrial genes via deep mRNA sequencing. Nucleic Acids Research 2009, 37(22):7509-7518.
- 77. Neira-Oviedo M, Tsyganov-Bodounov A, Lycett GJ, Kokoza V, Raikhel AS, Krzywinski
 J: The RNA-Seq approach to studying the expression of mosquito mitochondrial genes. *Insect molecular biology* 2011, 20(2):141-152.
- 78. Bouzaidi-Tiali N, Aeby E, Charriere F, Pusnik M, Schneider A: Elongation factor 1a mediates the specificity of mitochondrial tRNA import in T. brucei. *The EMBO journal* 2007, 26(20):4302-4312.
- 79. Grinyer J, McKay M, Herbert B, Nevalainen H: Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a Trichoderma harzianum strain applied for biological control. *Current genetics* 2004, **45**(3):170-175.
- 80. Karlberg O, Canback B, Kurland CG, Andersson SG: **The dual origin of the yeast mitochondrial proteome**. *Yeast* 2000, **17**(3):170-187.
- Grinyer J, McKay M, Nevalainen H, Herbert BR: Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain Trichoderma harzianum. *Current genetics* 2004, 45(3):163-169.
- Kanehisa M, Goto S: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Nucleic Acids Research 2000, 28(1):27-30.
- Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Etwiller L, Eddy Sean R, Griffiths-Jones S, Howe KL, Marshall M, Sonnhammer ELL: The Pfam Protein Families Database. Nucleic Acids Research 2002, 30(1):276-280.
- 84. Koski LB, Gray MW, Lang BF, Burger G: AutoFACT: an automatic functional annotation and classification tool. *BMC bioinformatics* 2005, **6**:151.

- 85. Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M: Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 2005, 21(18):3674-3676.
- 86. Scheffler IE: **Mitochondria make a come back**. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, **49**(1–2):3-26.
- 87. Vödisch M, Scherlach K, Winkler R, Hertweck C, Braun H-P, Roth M, Haas H, Werner ER, Brakhage AA, Kniemeyer O: Analysis of the Aspergillus fumigatus Proteome Reveals Metabolic Changes and the Activation of the Pseurotin A Biosynthesis Gene Cluster in Response to Hypoxia. Journal of Proteome Research 2011, 10(5):2508-2524.
- Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth SA, Chang B, Goldberger OA, Spinazzola A, Zeviani M,
 Carr SA, Mootha VK: Systematic identification of human mitochondrial disease
 genes through integrative genomics. *Nature genetics* 2006, 38(5):576-582.
- 89. Coleman JJ, White GJ, Rodriguez-Carres M, VanEtten HD: An ABC Transporter and a Cytochrome P450 of Nectria haematococca MPVI Are Virulence Factors on Pea and Are the Major Tolerance Mechanisms to the Phytoalexin Pisatin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2010, **24**(3):368-376.
- 90. de Waard MA: Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. *Pesticide Science* 1997, **51**(3):271-275.
- 91. Coleman M, Henricot B, Arnau J, Oliver RP: Starvation-Induced Genes of the Tomato Pathogen Cladosporium fulvum Are Also Induced During Growth In Planta. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1997, **10**(9):1106-1109.
- 92. Joseph-Horne T, Hollomon DW: Functional diversity within the mitochondrial electron transport chain of plant pathogenic fungi. *Pest Management Science* 2000, 56(1):24-30.
- 93. Avila-Adame C, Koller W: Disruption of the alternative oxidase gene in Magnaporthe grisea and its impact on host infection. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 2002, **15**(5):493-500.

- 94. Voulgaris I, O'Donnell A, Harvey LM, McNeil B: Inactivating alternative NADH dehydrogenases: enhancing fungal bioprocesses by improving growth and biomass yield? *Scientific reports* 2012, **2**:322.
- 95. Miguez M, Reeve C, Wood PM, Hollomon DW: Alternative oxidase reduces the sensitivity of Mycosphaerella graminicola to QOI fungicides. *Pest Management Science* 2004, **60**(1):3-7.
- 96. Kaneko I, Ishii H: Effect of azoxystrobin on activities of antioxidant enzymes and alternative oxidase in wheat head blight pathogens <i>Fusarium graminearum and <i>Microdochium nivale</i>. Journal of General Plant Pathology 2009, 75(5):388-398.
- 97. 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. *The New phytologist* 2012, **194**(4):1025-1034.
- 98. Inoue I, Namiki F, Tsuge T: Plant colonization by the vascular wilt fungus Fusarium oxysporum requires FOW1, a gene encoding a mitochondrial protein. *The Plant cell* 2002, **14**(8):1869-1883.
- 99. Mariani D, Mathias CJ, da Silva CG, Herdeiro Rda S, Pereira R, Panek AD, Eleutherio EC, Pereira MD: Involvement of glutathione transferases, Gtt1and Gtt2, with oxidative stress response generated by H2O2 during growth of Saccharomyces cerevisiae. Redox report : communications in free radical research 2008, 13(6):246-254.
- 100. Cohen E, Gamliel A, Katan J: Glutathione and glutathione-S-transferase in fungi: Effect of pentachloronitrobenzene and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; Purification and characterization of the transferase from Fusarium. Pesticide Biochemistry and Physiology 1986, 26(1):1-9.
- 101. Mao P, Meshul CK, Thuillier P, Goldberg NR, Reddy PH: CART peptide is a potential endogenous antioxidant and preferentially localized in mitochondria. *PloS one* 2012, 7(1):e29343.

- 102. Li H, Barker BM, Grahl N, Puttikamonkul S, Bell JD, Craven KD, Cramer RA, Jr.: The small GTPase RacA mediates intracellular reactive oxygen species production, polarized growth, and virulence in the human fungal pathogen Aspergillus fumigatus. *Eukaryotic cell* 2011, **10**(2):174-186.
- 103. Warn PA, Sharp A, Guinea J, Denning DW: Effect of hypoxic conditions on in vitro susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole and micafungin against Aspergillus and Candida. The Journal of antimicrobial chemotherapy 2004, 53(5):743-749.
- 104. Adachi H, Shimizu K, Hattori H, Tanaka R, Chibana H, Takagi Y, Tomita Y, Kanbe T: Genotyping of Candida albicans by fragment analysis of microsatellites combined with 25S rDNA and RPS-based strategies. Nihon Ishinkin Gakkai zasshi = Japanese journal of medical mycology 2009, 50(3):167-174.
- 105. Vodisch M, Scherlach K, Winkler R, Hertweck C, Braun HP, Roth M, Haas H, Werner ER, Brakhage AA, Kniemeyer O: Analysis of the Aspergillus fumigatus proteome reveals metabolic changes and the activation of the pseurotin A biosynthesis gene cluster in response to hypoxia. J Proteome Res 2011, 10(5):2508-2524.
- 106. 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.
- 107. Zerbino DR, McEwen GK, Margulies EH, Birney E: Pebble and rock band: heuristic resolution of repeats and scaffolding in the velvet short-read de novo assembler. *PloS one* 2009, 4(12):e8407.
- 108. Li R, Yu C, Li Y, Lam TW, Yiu SM, Kristiansen K, Wang J: **SOAP2: an improved** ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* 2009, **25**(15):1966-1967.
- 109. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997, 25(17):3389-3402.

- 110. Lowe TM, Eddy SR: tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* 1997, **25**(5):955-964.
- 111. Peden JF: Analysis of codon usage. University of Nottingham, UK.; 1999.
- 112. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S: Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology* 2004, 340(4):783-795.
- 113. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B: **Mapping and quantifying** mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods* 2008, **5**(7):621-628.
- 114. Sorensen M, Sanz A, Gomez J, Pamplona R, Portero-Otin M, Gredilla R, Barja G: Effects of fasting on oxidative stress in rat liver mitochondria. Free radical research 2006, 40(4):339-347.
- 115. Hanna SL, Sherman NE, Kinter MT, Goldberg JB: 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* 2000, 146 (Pt 10):2495-2508.
- 116. Paes Leme AF, Sherman NE, Smalley DM, Sizukusa LO, Oliveira AK, Menezes MC, Fox JW, Serrano SMT: Hemorrhagic Activity of HF3, a Snake Venom Metalloproteinase: Insights from the Proteomic Analysis of Mouse Skin and Blood Plasma. Journal of Proteome Research 2011, 11(1):279-291.
- 117. Escalante T, Rucavado A, Pinto AF, Terra RM, Gutierrez JM, Fox JW: Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. J Proteome Res 2009, 8(11):5120-5131.
- 118. Eming SA, Koch M, Krieger A, Brachvogel B, Kreft S, Bruckner-Tuderman L, Krieg T, Shannon JD, Fox JW: Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds. J Proteome Res 2010, 9(9):4758-4766.

CAPÍTULO II

Avaliação da produção de giberelina pelo fungo Moniliophthora perniciosa durante a interação com cacaueiro

Abstract

The witches' broom is a cacao (Theobroma cacao L.) disease caused by Moniliophthora pernicious fungus and its characteristic symptoms are hyperplasia and hypertrophy of the cells giving rise to abnormal tissue called broom. This phenomenon may be due to hormone imbalance, especially gibberellins, which is involved in growth regulation and plants development, including seeds germination, stem growth, induction of flowering and fruit ripening. The gibberellic acid is also produced by fungi and in the case of pathogens causing hypertrophic tissue. Analyses of *M. perniciousa* genome data suggest that the fungus could be able to produce gibberellin. If this hypothesis is experimentally confirmed, would explain much of the events that happen during biotrophic phase of the interaction *M. perniciosa-T. cacao*. Thus, this work showed the importance of this hormone in disease progression, as well as relation of gibberellin metabolism in the plant during the interaction. We also characterized the possible pathway of gibberellin synthesis in *M. perniciosa* and evaluation of gene expression during interaction with *T. cacao*.

Resumo

A vassoura-de-bruxa é uma doença do cacaueiro (*Theobroma cacao L.*) causa pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* e tem como sintomas característicos a hiperplasia e hipertrofia das células dando lugar aos tecidos anômalos chamados de vassoura. Esse fenômeno pode ser consequência de desbalanço hormonal, em especial de giberelinas, que é um hormônio que está envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta, incluindo germinação de sementes, crescimento do caule, indução de floração e maturação de frutos. A giberelina também é produzida por alguns fungos e no caso dos patogênicos causam superalongamento dos tecidos. Análises dos dados do genoma de *M. perniciosa* sugerem que o fungo poderia estar produzindo giberelina. Se esta hipótese for comprovada experimentalmente, explicaria muito dos eventos que acontecem durante a interação *M. perniciosa*-cacaueiro na fase biotrófica do fungo. Assim sendo, este trabalho demosntrou a importancia desse hormônio na progressão da doença, assim como a aiteração do metabolismo de giberelina na planta durante a interação. Também foi caracterizada a possivel via de síntese de giberelina em *M. perniciosa* e avaliação de expressão gênica durante a interação com *T. cacao*.

1. Introdução

O cacaueiro (*Theobroma cacao L., Sterculeaceae*) é uma planta nativa da Amazônia. Foi trazida para o estado da Bahia em 1746, para o município de Canavieiras [1], e desde então a área de cultivo foi aumentando, chegando a produzir no final da década de 80 cerca de 85% da produção nacional de cacau, o que equivalia a 15% de toda produção mundial [2].

Em 1989, foi detectada pela primeira vez a doença vassoura-de-bruxa no estado da Bahia, que tem como agente causal um fungo basideomiceto, que inicialmente foi classificado no gênero *Marasmius* [3], reclassificado por [4] para *Crinipellis perniciosa* e recentemente, a partir de estudos morfológicos e moleculares, [5] inseriram o biótipo "C" (patogênico para o cacaueiro) no gênero *Moniliophthora*, pertencente à família Tricholomataceae e à ordem Agaricales.

A doença vassoura-de-bruxa é encontrada no Panamá, Trinidad e Tobago, e na América Sul [6]. No Brasil, esta doença alastrou-se consideravelmente na Bahia ocasionando queda na produção e ameaçando a competitividade da cacauicultura nacional. A queda do preço do cacau, associada às condições climáticas altamente propícias à disseminação do fungo, dificultou a exploração desse produto o qual foi abandonado em muitas fazendas da região [7]. Em menos de uma década a doença levou o Brasil de exportador a importador de cacau, constituindo talvez um dos maiores problemas fitopatológicos do Brasil com implicações sociais, econômicas e ecológicas para toda a região produtora de cacau do estado [8].

Com essa situação o Governo tentou atuar no setor e alocou consideráveis somas de recursos para resolver o problema. Entretanto, não havia o conhecimento necessário para pautar as ações governamentais e os pacotes técnicos que foram preconizados para os agricultores, em grande parte adaptados de outras partes do mundo, se mostraram catastróficos. Muitas estratégias foram tentadas na esperança do controle da doença, como por exemplo, a redução de copa para facilitar a remoção de ramos infectados. Entretanto, essa poda drástica acabou por gerar um forte brotamento, prejudicando ainda mais as plantações já que os esporos penetram exatamente por zonas em crescimento.

Essa prática levou a um alastramento da epidemia, com redução ainda maior de produção e o endividamento dos cacauicultores.

Também foram tentadas outras estratégias como o emprego do cobre nos frutos em desenvolvimento [9] e a aplicação de novos fungicidas, como o triazol e o tebuconazol [10], como também o controle biológico, porém estas estratégias não alcançaram resultados satisfatórios. A primeira por ser bastante onerosa porque depende dos preços dos fungicidas que sofrem um aumento contínuo, enquanto que os retornos gerados pelo cultivo do cacau não acompanham tal incremento [11]; e a segunda por ter sido tentada com a utilização do fungo *Trichoderma sp* como antagonista de *M. perniciosa* [9, 12], mas este atua somente numa fase tardia da doença, se mostrando pouco eficiente. Uma abordagem aparentemente mais promissora é do plantio de clones resistentes e do melhoramento genético para piramidizar genes de resistência [13]. Trata-se, entretanto, de programas de longa duração, que estariam expostos a constantes quebras de resistência por novas variações do fungo, principalmente por este apresentar em seu genoma uma grande porcentagem de transposons [14]. Portanto, dificilmente haverá uma solução para o problema baseado em uma estratégia única e sem o conhecimento aprofundado do problema.

Devido à importância da cacauicultura para o Brasil, à complexidade da doença vassoura-de-bruxa e à falta de métodos de controle eficientes, o grupo do Laboratório de Genômica e Expressão, do Departamento de Genética e Evolução, da Universidade Estadual de Campinas, começaram no ano 2001 o projeto genoma da vassoura-de-bruxa (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura). O objetivo do projeto era compreender as bases moleculares envolvidas na progressão da doença na busca de soluções práticas para o seu controle. Até 2003 o projeto gerou 75 milhões de pares de bases e 11.000 ESTs, representando aproximadamente uma cobertura de duas vezes e meia o tamanho estimado do genoma do fungo [15], e em setembro de 2007 foram geradas mais 250 milhões de pares de bases através de pirosequenciamento tendo agora uma cobertura de aproximadamente 5 vezes o genoma (aproximadamente 215 milhões de bases) e no

segundo semestre de 2008 foram geradas sequências por Solexa equivalente a 43 vezes a cobertura do genoma somando um total de 1849 milhões de bases.

Desde o inicio do projeto genoma já foram obtidos grandes avanços referentes ao entendimento da biologia do fungo com a identificação e caracterização de famílias de genes que codificam proteínas de necrose que afetam folhas de cacau e tabaco [16, 17]. O *draft* do genoma de *M. perniciosa* foi recentemente publicado sugerindo várias hipóteses sobre prováveis mecanismos que podem estar envolvidos na colonização do fungo e de desenvolvimento da doença [14]. Análises do genoma e testes fisiológicos mostraram que o fungo tem capacidade de produzir oxalato de cálcio, que aparentemente é acumulado na planta infectada durante a progressão da doença [18].

Agente causal da vassoura-de-bruxa

O fungo *Moniliophthora perniciosa* é membro da tribo *Marasmiae*, família *Tricholomataceae*, que corresponde à maior família em número de espécies da ordem *Agaricales* do filo *Basidiomycota*. Este fungo é fitopatógeno de plantas das famílias *Malvaceae*, *Sterculiaceae*, *Solanaceae* [19] e *Bixaceae* [20], além de poder colonizar secundariamente uma variedade de substratos saprofíticos [21].

O principal impacto econômico deste patógeno é na infecção da planta *Theobroma cacao*. Os basidiósporos de *M. perniciosa* infectam os tecidos meristemáticos do cacaueiro, tais como gemas vegetativas, frutos, brotos e almofadas florais [13, 22-24]. A penetração do basidiósporo se dá por meio de estômatos, ferimentos ou diretamente pela epiderme sem formação de haustórios [25], e germinam formando um micélio primário. Neste estágio da doença o patógeno apresenta-se na forma monocariótica, crescendo intercelularmente, comportando-se como biotrófico [26]. O desenvolvimento do patógeno causa uma desordem fisiológica no hospedeiro, interferindo no balanço hormonal, resultando em hipertrofia, hiperplasia das células e no desenvolvimento de frutos partenocárpicos. Nos ramos, a hipertrofia é acompanhada de brotação intensa das gemas laterais e malformação das folhas dando um aspecto de vassoura. Nessa fase também ocorre a depleção de grão de amido da planta [18]. Além disso, é nessa fase que

o tecido infectado é denominado de vassoura verde e permanece assim por alguns dias. Nas gemas dormentes a infecção torna-se latente, assumindo o aspecto de pequenos pontos necróticos que entram em atividade quando a planta reinicia a brotação [12].

Entre 2 e 9 semanas após a infecção ocorre a fusão de hifas, gerando um micélio dicariótico (secundário), reconhecível ao microscópio pela formação dos grampos de conexão. Esta fase é a saprofítica, em que o tecido do hospedeiro torna-se necrosado [27, 28]. O aspecto do ramo infectado pelo fungo apresenta semelhança com a forma de uma vassoura, surgindo assim o nome popular de vassoura-de-bruxa ou vassoura seca [28]. Esta fase é caracterizada, principalmente, pela intensa necrose dos ramos. Trabalhos realizados com com expressão heteróloga de proteinas do fungo (proteínas NEP) mostraram atividades intensas de necrose, tanto em cacau quanto em tabaco [16, 17]. A fase de vassoura-seca pode permanecer por longos períodos ou, até mesmo, por alguns anos.

Periodicamente, sob condições ambientais favoráveis de luminosidade e de períodos intermitentes de umidade e secas, o micélio secundário sofre uma morfogênese complexa para formar os corpos de frutificação (basidiocarpos) [29]. Dos basidiocarpos emergem os basídios, os quais carregam os basidiósporos que quando liberados podem infectar novos ramos, fechando assim um ciclo de vida do fungo (Figura 1). É importante destacar que a produção dos basidiósporos é altamente dependente das condições climáticas da região onde o fungo vive, sendo o sul do Estado da Bahia altamente favorável para isso, durante todo o ano [7].


Figura 1: Ciclo de vida de *M. perniciosa*.

Desbalanço hormonal na vassoura-de-bruxa

Os principais sintomas da vassoura-de-bruxa são hipertrofia e hiperplasia das células provocando inchaço da parte afetada, acompanhado da proliferação de superbrotamentos devido à perda da dominância apical (Figura 2). Sabe-se que a aparição de tais sintomas pode estar relacionada com alteração nos níveis dos fitormônios, já que estes são responsáveis por regular o crescimento e desenvolvimento da planta. Infecções por patógenos podem alterar o metabolismo dos fitormônios produzidos pela planta ou o próprio patógeno pode ser capaz de secretar hormônios vegetais. Tal aspecto é um ponto ainda pouco investigado na interação *M. perniciosa-T. cacao*, tendo sido, entretanto, observado que a vassoura verde apresenta concentrações mais elevadas de citocininas [30] e etileno [31].



Figura 2: Representação dos sintomas característicos observados nos quatro estágios de desenvolvimento da vassoura-de-bruxa (extraído de modificado de Scarpari, *et. al.*, 2005). A: vassoura-verde. B: Vassoura-verde 2, com início de necrose. C: vassoura-verde 3, folhas totalmente necrosadas. C: vassora-seca.

A complexa rede de interação e regulação existente entre as vias de sinalização de hormônios na planta permite ao patógeno modificar a fisiologia do seu hospedeiro para a sua própria vantagem usando um limitado número de moléculas [32]. Recentemente, Robert-Seilaniantz e colaboradores [33] sumarizaram um conjunto de exemplos mostrando que a infecção por patógenos induz a biossíntese de hormônios vegetais e genes de resposta na planta. O patógeno também pode produzir hormônios, e um dos primeiros e mais conhecidos exemplos é o das bactérias formadoras de galhas, como *Pseudomonas syringae* [34], *Erwinia chrysanthemi* [35] e *Rhodococcus fascians* [36], que são capazes de produzir auxinas e citocininas. Patógenos bacterianos não são os únicos capazes de produzir hormônios vegetais.

Muitas interações de plantas com fungos patogênicos apresentam sintomas que parecem refletir a ação de fitormônios [33, 37]. Na vassoura-de-bruxa, por exemplo, segundo Scarpari e colaboradores [31], durante a infecção a taxa de etileno, a partir do 21º dia, aumenta chegando a um nível que se torna constante até a morte da vassoura. Em outras plantas o aumento do etileno está relacionado com hipertrofia [30]. Porém o etileno não deve ser o único fitohormônio envolvido no estabelecimento dos sintomas, já que o crescimento e desenvolvimento da planta são resultados da combinação de vários sinais químicos, principalmente dos hormônios como auxina, giberelina, citocininas, etileno e ácido abscísico, em interação com o ambiente [38]. As auxinas (ácido indol-3-acético) são responsáveis pela regulação de processos fisiológicos como elongação do talo, dominância apical, iniciação do desenvolvimento das raízes, frutos e meristemas, indução de raízes adventícias, promoção da atividade cambial e orientação do crescimento da planta. Já em relação à interação com fitopatógenos, as auxinas, podem promover virulência com biotróficos [32].

As giberelinas regulam o alongamento do caule, germinação de sementes e iniciação floral [38]. As giberelinas também podem estar relacionadas com indução da resistência de plantas à patógenos biotróficos e susceptibilidade a necrotróficos. Segundo Grant [32] a giberelina pode atuar na indução de resistência a biotróficos através da desestabilização de proteínas DELLA, aumentando a sinalização de ácido salicílico e reduzindo e adiando a expressão de genes induzidos por ácido jasmônico e etileno. Testes com mutantes de *Arabidopsis* com perda de função de 4 dos 5 genes de DELLA exibem um aumento da resistência a *Pseudomonas syringae* e consequentemente a susceptibilidade a necrotróficos foi aumentada. Entretanto o pretratamento com giberelinas aumenta a susceptibilidade a *P. synringae*, sugerindo que GA pode atuar na sinalização de outros hormônios pela desestabilização de DELLAs [39].

As citocininas são responsáveis por induzir divisão celular e atraso na senescência foliar. O etileno é um hormônio gasoso que regula vários processos fisiológicos, desde germinação de sementes até senescência de órgãos, além de estar envolvido em reações a estresses abióticos e bióticos, principalmente na resistência a patógenos necrotróficos. O ácido abscísico (ABA) tem papel de regulador primário da iniciação e manutenção das sementes e da dominância dos brotos, além de ter ação de resposta a estresses, em particular o estresse hídrico [38]. Trabalhos recentes vêm relacionando esse hormônio com defesa e resistência da planta a patógenos. O ABA pode atuar na via de sinalização promovendo virulência ou resistência a bitróficos através da estabilização de DELLAs [32]. Estas observações sugerem que o estudo das alterações nos níveis e metabolismo dos fitohormônios durante a interação planta-patógeno, é um ponto chave para a melhor compreensão do desenvolvimento da doença.

Produção de giberelina por fungos fitopatogênicos

Giberelina (GA) foi originalmente isolada de metabólitos secundários do fungo *Gibberella fujikuroi*, causador da doença "planta boba" no arroz, na qual se observou que essa substância promovia o alongamento da haste da planta. Hoje a giberelina, é reconhecida como um hormônio vegetal, caracterizado quimicamente como um grupo de ácidos diterpenóides que está envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta, incluindo germinação de sementes, crescimento do caule, indução de floração e maturação de frutos [40].

Estudos sobre o efeito da giberelina no ciclo celular de plantas demonstraram que este hormônio ativa a divisão celular por induzir a transição da fase G1 para a fase S, através da indução da expressão de genes que codificam várias proteínas quinases dependentes de ciclinas (CDKs). A transcrição desses genes - primeiro regula a transição da fase G1 para a fase S, e depois regulam a transição da G2 para a fase M - induzindo assim a divisão das células meristemáticas [38]. A giberelina também induz a elongação de tecidos intactos da planta por acelerar processos bioquímicos que afrouxam a parede celular e que são mediados por proteínas apoplásticas tais como expansinas [41]. GAs regulam a expressão desses genes por atuarem na degradação da proteína DELLA, que é um regulador nuclear de transcrição. GAs ativas se ligam ao efetor alosterico do receptor de giberelina, que se liga a ubiquitina ligase, que atuará na proteína DELLA, o resultado da ubiquitinação é a degradação da DELLA pela 26S protease, liberando, assim, fatores de transcrição responsáveis pela expressão [42] (Figura 3).



Figura 3: **Esquema de regulação de expressão por giberelina**. A) Na ausência de giberelina os fatores de transcrição estão bloqueados pela proteína DELLA. B) Na presença de giberelina: esta se liga a GID1, que interage com SCF que sinaliza para enzimas que degradam as DELLAs liberando os fatores de transcrição, permitindo assim a expressão (Extraído de Hedden, 2010).

Segundo Arteca [43] o ácido giberélico (GA₃) estimula a síntese de alfa-amilase e outras enzimas proteolíticas, promovendo o crescimento pelo aumento da plasticidade da parede celular seguida pela hidrólise do amido em açúcar, que reduz o potencial hídrico na célula, resultando na entrada de água no seu interior, promovendo o alongamento. A quebra do amido pode ser vantajosa para o patógeno por disponibilizar uma fonte energética. Patógenos produzem amilases, que degradam o amido em moléculas de glicose diretamente utilizáveis nas atividades metabólicas desses microrganismos [43].

Vários fungos foram identificados como produtores de giberelinas: *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*) [44], *Fusarium oxysporum* [45], cinco espécies de *Sphaceloma* (*S. monihoticola, S.menthae, S. perseae, S.rhois e S. bidentis*) [46], *A. flavus, A. niger* [45], *Neurospora crassa* [47], *Penicillium corylophilum, P. cyclopium, P. funiculosum* e *Rhizopus stolonifer* [45]. Os fungos patogênicos que são grandes produtores de giberelina se caracterizam por produzir sintomas de superalongamento dos tecidos infectados, que também são característicos da doença vassoura-de-bruxa causada por *M. perniciosa*. Algumas bactérias também são capazes de sintetizar giberelinas: *Acetobacter diazotropicus, Bacillus licheniformis* e *Rhizobium phaseoli*, entre outras [48].

GAs, como outros diterpenóides, são formadas por hidroximetilglutarato (HMG) Coenzima A via ácido mevalônico, isopentenil difosfato, geranildifosfato, farnesildifosfato e geranilgeranildifosfato, que é um precursor não somente de GAs, mas também de carotenoides, neurosporaxantina e ubiquinonas ou podem ser formadas, também, por intermediários glicolíticos [37]. Posteriormente, o geranilgeranildifosfato é transformado a ent-kaureno – primeiro intermediário específico da via de síntese de giberelinas. Em plantas essa conversão é catalisada por duas enzimas (copalil disfosfato sintase e caureno sintase) enquanto em fungos essas duas funções aparecem fusionadas em uma única enzima bifuncional (copalil disfosfato sintase/caureno sintase). O ent-kaureno sofre uma serie de reações de reduções catalisadas por monoxigenases citocromos P450 até obter giberelina. 136 GAs vêm sendo identificadas em plantas, fungos e bactérias, mas somente 4 são descritas por ter atividade em plantas (GA1, GA3, GA4 e GA7) [49]. São denominadas GAx, no qual x representa a ordem da descoberta [38]. As giberelinas produzidas por plantas e por patógenos são similares tanto quimicamente quanto nos efeitos sobre a fisiologia da planta.

A rota de síntese de giberelina nos fungos é bastante semelhante à das plantas, apresentando diferenças somente nos últimos passos, quando são inseridos os grupos hidroxilas. Em fungos, GA₁₂-aldeído é 3ß-hidroxilado para GA₁₄-aldeído, enquanto que na planta GA₁₂-aldeído é convertido em GA₁₂, que depois é 13-hidroxilado para GA₅₃. Em fungos a 13-hidroxilação acontece somente no passo final de conversão de GA₃ para GA₇, enquanto que na planta o passo final é de 3ß-hidroxilação de GA₉ e GA₂₀ para GA₄ e GA₁, respectivamente [37].

A principal via regulatória da biossíntese de GA em fungos é repressão da síntese por altas concentrações de nitrogênio [50]. Estudos mostraram que o nível de expressão de seis dos sete genes de *G. fujikuroi* envolvidos na síntese de GA diminui drasticamente na presença de grandes quantidades de compostos nitrogenados como glutamina, glutamato, amônia, asparagina e nitrato; enquanto são ativados pela transcrição de AREA e condições de limitação de nitrogênio [51].

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

Análise das sequências geradas pelo projeto genoma tem direcionado um conjunto de trabalhos com o intuito de interpretar esses dados e fornecer informações técnicas

[52], biológicas [15, 53, 54], bioquímicas [16, 17, 31, 55] e citológicas [53] que facilitem o conhecimento sobre a biologia do fungo e a sua interação com o cacaueiro.

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 [14], revelou a presença de 14072 genes preditos, resultando em uma densidade gênica de 0.36 ± 0.05 gene/Kbp, número que está de acordo com a densidade gênica descrita como comum para fungos filamentosos [15].

A análise dos genes preditos indica que *M. perniciosa* possui uma grande 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 [56]. Esse alto número de citocromo P450 monooxigenases é comumente encontrado em fungos hemibiotróficos e necrotróficos [57], 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 perixodases. 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 [58]; dessa forma, tais enzimas produzidas pelo fungo poderiam estar o protegendo dos ROS.

Como já citado anteriormente, a presença do fungo gera um desbalanço hormonal na planta infectada. Uma questão sempre discutida em nosso grupo se trata da origem desse 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-kaureno sintase (CPS-KS), específica da via de síntese de giberelinas em fungos [59], assim como giberelina desaturases e oxidases. A presença de genes com similaridade a nitrilases, as quais catalisam a produção de acido indol-acético, a auxina mais abundante na natureza, sugere a possibilidade de o fungo também estar produzindo este hormônio, o qual já foi detectado em basidiocarpos do fungo [60]. A produção de giberelina e auxina pelo fungo poderia estar relacionada à produção de frutos partenocárpicos e à hiperplasia dos tecidos, ambos sendo sintomas clássicos da vassourade-bruxa [61].

M. perniciosa possui em seu genoma uma oxidase alternativa (AOX) tolerante a oxido 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 [62]. Oxidases Alternativas são capazes de realizar o transporte de elétrons em situações em que a via principal encontra-se inibida. Além disso, já foi demostrado que a AOX desempenha papel importante no desenvolvimento da fase biotrófica de *M. perniciosa*, como também participa da regulação da transição para a fase necrotrófica [54]. A presença da AOX poderia explicar a ineficácia do uso de fungicidas a base de inibidores da cadeia respiratória principal específicos para fungos no controle da vassoura-de-bruxa [54].

Lana e colaboradores [63], isolaram 33 linhagens de *M. perniciosa* de plantas com vassoura e 2 a partir de ramos saudáveis obtidos de plantas resistentes e assintomáticas. O grupo analisou as 35 linhagens quanto à produção de enzimas extracelular como lipases, pectninases, amilase, exo e endoglucanases, além de fazer uma análise genotípica por RAPD e mostraram que há a distinção de oito grupos, mas que não há a distinção entre grupos de linhagens patogênicas de grupos de linhagens endofíticas, mas pela primeira vez reportaram a colonização assintomática de tecidos de cacau pelo fungo *M. perniciosa*.

Giberelina na vassoura-de-bruxa

O aumento de níveis de giberelina em plantas infectadas com vassoura-de-bruxa efetivamente explicaria muito dos sintomas verificados no desenvolvimento desta doença: germinação de sementes dentro de frutos infectados; elongação e expansão celular por ativar enzimas xiloglucano endotransglicosilases (XET) relacionadas com o afrouxamento da parede celular. Scarpari e colaboradores [31] observaram um aumento significativo nas concentrações de açúcares quando comparadas plantas infectadas com

M. perniciosa com plantas não infectadas antes mesmo do aparecimento dos sintomas da doença. Em um trabalho publicado por pesquisadores do nosso laboratório foi descrito que em tecidos de cacau infectados na fase de vassoura verde acontece a depleção dos grãos de amido em comparação com os tecidos sadios (dados não publicados). Outra observação interessante é que em muitas plantas a giberelina leva a uma inibição do florescimento, fenômeno efetivamente verificado em plantas infectadas, e talvez a maior causa da quebra da produção. É curioso notar que tem sido conseguida a indução do florescimento do cacau a partir do uso de inibidores de giberelina, como o paclobutrazol (M.W.Muller), reforçando essa possibilidade.

É observado que a adição de uréia a plantas de cacau tem o potencial de reduzir de forma significativa à infecção por *M. perniciosa*. O fato que a via regulatória principal da biossíntese de giberelina em fungos, que consiste numa supressão da produção desse hormônio por altas concentrações de nitrogênio no meio de cultura [64], pode sugerir uma eventual relação entre a resistência de plantas com alto teor de nitrogênio à infecção por *M. perniciosa* e a diminuição dos níveis de giberelina nessas plantas.

2. Objetivos

Considerando as evidências acima, formou-se a seguinte hipótese de trabalho: "O fungo *M. perniciosa* causa um desbalanço de giberelina na planta causando o desenvolvimento dos sintomas. E este desbalanço pode ser causado pela alteração das vias do metabolismo de giberelinas da planta ou pela produção de giberelina pelo próprio fungo".

A partir desta hipótese foi proposto como objetivo geral a avaliação das alterações no metabolismo de giberelinas durante o desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa, o qual foi estudado em dois objetivos específicos:

1. Avaliar a produção de giberelinas na planta:

- Caracterização das vias de síntese, inativação e sinalização de giberelina em cacau;
- Análise de expressão gênica em plântulas infectadas e não infectadas;
- Quantificação de giberelinas em plantulas tratadas com nitrogênio.

- 2. Avaliar a produção de giberelinas pelo fungo:
 - Caracterização da via de síntese;
 - Análise de expressão gênica;
 - Detecção do hormônio em sobrenadantes do fungo.

3. Materiais e métodos

3.1 Avaliação do feito da giberelina em de plântulas

Plântulas de cacau de aproximadamente 2 meses de idades foram tratadas com hormônios (GA3 e ácido abscísico – que é descrito muitas vezes como um regulador negativo da giberelina) e o inibidor de síntese de giberelina (paclobutrazol) para avaliação do efeitos destes em comparação aos controles sadios e infectados com *M. perniciosa*.

As plântulas após a queda dos cotilédones, e tendo o mesristema apical ativo, apresentando lançamentos de aproximadamente 1 cm de comprimento, foram colocadas em situação de câmara úmida por 48 horas, metade das plântulas, neste momento, foi tratada com paclobutrazol (100 mg/planta) aplicado na terra. Após as 48 horas na câmara úmidas as plântulas foram submetidas aos tratamentos com hormônios (GA3 100µM, ABA 50µM e GA3/ABA nas mesmas concentrações). Os hormônios foram aplicados de duas formas diferentes em plântulas distintas: dissolvidas alcool (metanol-ABA e etanol-GA3) e diluídas em lanolina. Depois da aplicação dos hormônios as plântulas tratadas e não tratadas com o inibidor de giberelina. Os controles utilizados foram metanol (solvente do ABA), etanol (solvente de GA3), água e plântulas infectadas.

3.2 Linhagens de *M. perniciosa* e meios de cultura

A avaliação da produção de giberelina pelo fungo foi feita com amostras de esporos linhagem FA553 [17], derivada da CP02 [15] que foi utilizada para sequenciamento do genoma em solução de coleta (0,01M MES; 0,01 % twin 20; pH 6,1), fungo cultivado em meio para a fase *biotrophic-like* (condições ex planta que permitem manter o micélio com características biotróficas - extrato de levedura 5g/l; K2HPO4 2,5

g/l; cafeína 5µg/ml; trace elements 1 ml/l; glicose 2%) e em meio para a fase necrotrófica (extrato de malte 0,2%; extrato de levedura 0,05%; glicerol 5%) [53].

Para extração de DNA o fungo foi crescido em meio de cultura para fase necrotrófica (extrato de malte 0,2%; extrato de levedura 0,05%; glicerol 5%) [53].

Os meios utilizados para avaliação da produção de giberelinas pelo fungo foram o extrato de malte (0,2% extrato de malte; 0,05% extrato de levedura; 5% glicerol [53]), meio mínimo otimizado para produção de giberelina por fungos (3 g/L NaNO₃, 0,5g/L KCl, 0,5g/L MgSO₄.7H₂O, 1g/L KH₂PO₄, 1ml/L trace elements, 10 g/L D-glucose) e OPM (15g/L corn steeps solids; 1g/L KH₂PO₄; 1g/L (NH₄)₂SO₄; 50g/L de óleo de girassol) nos quais foram incubados a 28°C e 180 rpm.

3.3 Identificação e análise das sequências dos genes GA4 desaturase, GGPP e CPS-KS.

A identificação em *M. perniciosa* dos possíveis genes envolvidos na biossíntese de giberelina em fungos foi feita utilizando algoritmos de alinhamento de sequências (tblastn e tblastx) com as sequencias de referência dos genes de *G. fujikuroi* no genoma de *M. perniciosa*.

3.4 Análise funcional dos genes

Para avaliação funcional de CPS-KS de *M. perniciosa* foram feitos testes de complementação em mutante de *Gibberella fujikuroi* na Universidade de Munster, Alemanha. A sequência do gene CPS/KS clonado no plasmídeo pUCH2-8 natl para transformação do mutante de *G. fujikuroi* segundo o protocolo de Malonek e colaboradores (2005). O pUCH2-8 natl possui o gene de resistência a nourseotricia de *A. nidulans* (natl) e o promotor do gene glutamina sintetase de *G. fujikuroi* (Figura 4). O transformante foi então testado quanto a complementação como descrito por Malonek e colaboradores [65].



Figura 4: Mapa do plasmídeo pUCH2-8 natl utilizado para transformação de mutantes de *G. fujikuroi*.

Para amplificação do gene MpCPS/KS o sitio de Sall, que é encontrado a partir do nucleotídeo 60, foi retirado pela modificação sinônima de uma base no primer *foward* (tabela 1).

 Tabela 1: Primers utilizados para clonagem no plasmídeo pUCH2-8 natl.
 Sublinhado estão os sítios das enzimas e em vermelho a modificação do nucleotídeo (G).

| Primers | Sequência |
|---------------|--|
| CPS-KS_Sall/F | AA <u>GTCGAC</u> ATGGCTACCCACGATGACGCCAACATTTTTTTAAAACGACTGGTAGACACCTACAACACGTC <mark>T</mark> ACTCACG |
| CPS-KS_Apal/R | AA <u>GGGCCC</u> CTGACCGGAAATTTACTACAGCGTAGCCTTGGTAAAGTACCCAGCAAGTTCATCCG |

3.5 Caracterização das vias de síntese e sinalização de giberelinas em T. cacao

O conjunto total de proteínas do cacau foi submetido para o KAAS [66] a fim de identificação do kegg ID usando uma abordagem por ortólogos com a opção de

similaridade bidirecional. Este foi escolhido por ser mais indicado para identificação de genes baseado na busca por ortólogos e por ser amplamente utilizado e de fácil reprodutibilidade. Identificamos os genes de *T. cacao* que estão incluidos nas vias de biosintese de diterpenoides (map00904 – selecionando os genes de síntese de giberelinas) e sinalização de hormonio vegetal (map04075 – selecioando os genes de sinalização de GAs).

3.6 Análise da expressão gênica

O grupo de pesquisa de vassoura-de-bruxa do laboratório montou um experimento de time course da progressão da doença em meristemas de plântulas infectadas, tendo como controle plântulas sadias de mesma idade. Foram coletadas amostras de pontos da doença com sintomas bem definidos (vassoura-verde, vassoura no inicio de necrose, vassoura com sintomas claros de necrose e vassoura-seca), assim como estágios assintomáticos, além de bibliotecas de interação com fruto, para a realização de sequenciamento de RNAseg (Illumina Solexa) por Paulo José Teixeira (Fapesp 07-50262-0) e Javier Correa Alvarez no laboratório de genética do Prof. Dr Piotr A. Mieczkowski (University of North Carolina). Os reads gerados foram alinhados com sequências de genes de cacau e *M. perniciosa* utilizando o programa Soap e o Tophat [67]. Os genes analisados foram MpCPS/KS, MpGA4-des e MpGGS do fungo, além de CPS, KS, Ga20ox, Ga3ox, Ga2ox, GID1, XET e amilase da planta. A análise de expressão foi feita a partir da comparação entre os valores de RPKM (número de *reads* alinhados por gene, normalizado pelo tamanho do gene e pelo número de reads gerado na biblioteca), método de normalização que utiliza o tamanho do gene e o tamanho da biblioteca para o cálculo de expressão [68].

3.7 Identificação e quantificação de giberelinas

Para análise de sobrenadantes de fungo os meios foram filtrados, acidificados com HCl até o pH 2,5 e particionados três vezes com igual volume de acetato de etila. Após evaporação do acetato de etila o precipitado foi ressuspendido em etanol 96% e aplicado

em cromatofolhas de sílica para uma análise de cromatografia de camada fina (TLC) com solução de corrida de acetato de etila:clorofórmio:ácido acético (60:40:5). Posteriormente o TLC foi analisado em TLC-EASI-MS segundo Hadda 2008 [77].

Plântulas de cacau de aproximadamente dois meses de idades, após a queda dos cotilédones, tiveram o meristema apical cortado para induzir os lançamentos por gemas laterais, garantindo assim, atividade e uniformidade dos meristemas. As plântulas que em 15 dias apresentavam o meristema ativo e com aproximadamente 1 cm de comprimento foram utilizadas no experimento. Uma parte das plântulas foi tratada com nitrogênio (20 plântulas com 1g/dm³ de ureia e outras 20 plântulas com 2,73g/dm³). Após 5 dias, 10 das plântulas de cada tratamento com nitrogênio e outras 40 plântulas das que foram escolhidas inicialmente, foram inoculadas com 20µl de solução de esporos com concentração de 10⁶ esporos/ml. Dez dias após a inoculação, as 40 plântulas citadas acima foram divididas em dois grupos, um com 20 plântulas que foram tratadas com as mesmas concentrações de nitrogênio citadas acima (10 plântulas com 1g/dm³ de ureia e 10 plântulas com 2,73g/dm³) e outro sem tratamento adicional de nitrogênio. Desta forma o experimento com diferentes concentrações de nitrogênio foi composto de 90 plântulas (Figura 5).



Figura 5: Esquema do experimento de nitrogênio em plântulas de cacau. As caixas abaixo da linha de coleta representam os tipos de amostras obtidas (as caixas em cinza mostram as amostras que foram infectadas e em branco os controles das fontes de nitrogênio).

Os meristemas das plântulas do experimento de nitrogênio foram cortados e congelados imediatamente em nitrogênio liquido. No laboratório foram macerados e liofilizados para envio para o laboratório de química analítica de *Rothamsted Research*, onde as extrações e quantificações foram realizadas.

As amostras maceradas foram pesadas e ressuspendidas em metanol aquoso 80% (100ml), no qual já tinha sido adicionados os padrões de GAs marcados com H² e H³. As amostras foram mantidas em sala fria (4°C) durante 12 hs em agitação de 300 rpm. Os resíduos da filtragem foram lavados com 100 ml de metanol absoluto por uma hora em sala fria e mesma agitação. O metanol foi evaporado dos filtrados combinados em um evaporador rotativo (com banho de água a 40 º C e pressão da bomba de vácuo 200 torr). As amostras foram eluídas com 10 ml com H₂O (pH 8 ajustado com KOH e HCl). As amostras foram passadas pela coluna de troca iônica (QAE Sephanex A-25 (Pharmacia)). A fim de obter os traços de amostras restantes nos frascos após a primeira lavagem, os

frascos foram lavados mais duas vezes com água de pH 8 (10 ml). As colunas QAE Sephanex foram eluídas com 0,2 M de ácido fórmico (20 ml) através de um cartucho set-Pak C18, o qual foi equilibrada anteriormente com metanol (5 ml) e água pH 3 (5 ml). Por último, tanto QAE e colunas C18 foram lavados com água a pH 3 (5 ml) para remover traços das amostras restantes colunas QAE. Posteriormente, o C18 colunas cartucho Sep-Pak foram eluídos com 80% de metanol aquoso (5 ml) em tubos de vidro. Os tubos contendo amostras eluídas foram secos durante a noite no vácuo. As amostras secas foram dissolvidas em 200µl de metanol, metiladas com diazometano etéreo e foram secas com fluxo de gás nitrogênio. Após metiladas e secas, as amostras foram dissolvidas em acetato de etila (1ml), e particionadas com água (1ml). A etapa de partição foi feita 3 vezes. As fases de acetato de etila foram aplicadas sequencialmente em um cartucho de aminopropil de troca iônica (pré-ativado com 2 ml de acetato de etila). O acetato de etila eluído do cartucho foi coletado em tubos de vidro e foi levado à secura a vácuo durante a noite. As amostras secas foram resuspendidas em 400µl de metanol 20% e injetadas na coluna de HPLC de fase reversa C18 (4,9 mm * 250 mm) e eluída com um gradiente linear de metanol (19% de metanol em metanol 100% mais de 50 min), com fluxo de 1mL/min. Frações de 1 ml foram coletadas e agrupadas de acordo com os volumes de eluição dos padrões interno marcados com H3. As frações combinadas foram evaporadas a vácuo e foram convertidas a éteres TMSi por aquecimento com MSTFA (10µl) a 90 º C por 30min. Os éteres foram então, diluídos conforme necessário, com acetato de etila seca, pouco antes da análise de GC-MS.

As frações combinadas das amostras de plantas e as amostras de extração de dos sobrenadantes de fungo foram analisados como ésteres metílicos trimetilsililéteres em um espectrômetro de massa MAT95XP, operado a uma resolução de 1000, acoplado a um GC Trace (ThermoFinnigan, Bremen, Alemanha). As amostras de N-trimetilsililtrifluoroacetamida foram eluídas com 20 µl de acetato de etila, dos quais 2-3 µl foram injetados em uma coluna capilar TR-1 (30 mx 0,25 mm x 0,25 espessura de filme; Thermo Electron Corporation), a 50 ° C. A válvula de separação (50:1) foi aberta depois de 2 min de aumento da temperatura. O programa eleva a temperatura de 20 ° C /min a 200

° C e, em seguida, a 4 ° C min/1 a 300 ° C. O equipamento foi operado em modo de monitoramento seletivo de íons, os íons selecionados para cada GA e seu padrão 2H²-internos foram rotulados como Croker *et al.* 1990. O MS de origem foi a 220 ° C e a energia de elétrons 70eV.

4. Resultados e discussões

4.1 Avaliação do efeito de giberelina em plântulas e flores

As plântulas tratadas com os hormônios em lanolina começaram a apresentar efeito a partir de 10 dias após aplicação, mas os efeitos foram pouco evidentes, enquanto que as plantas que foram tratadas com os hormônios diluídos em álcool responderam bem mais rápido a aplicação e apresentaram sintomas muito claros (Figura 6).



Figura 6: Plantas tratadas com GA3. A e B: plantas tratadas com giberelina diluída em lanolina. C e D: plantas tratadas com giberelina diluída em álcool. A e C: plantas no dia de aplicação do hormônio. B e D: plantas com 10 dias de aplicação do hormônio.

As plantas tratadas com ABA apresentaram o fenótipo no desenvolvimento do meristema semelhante ao controle sem ABA. Porém, quando aplicado juntamente com a giberelina, apresentou um resultado de controle do efeito da GA3, no qual o crescimento do meristema da planta esperado pela aplicação de giberelina foi reprimido. O ABA, como foi citado anteriormente é um hormônio que tem papel antagônico ao de giberelina na degradação das proteínas DELLA, então o resultado obtido com a aplicação de ambos os hormônios pode ser explicado pela possível efeito supressor do ABA sobre do efeito da giberelina , por estabilização das DELLAS ou por estarem em concentrações diferente, estando o ABA em maior quantidade que a giberelina (Figura 7).



Figura 7: Bioensaio com GA3, ABA e GA3/ABA diluídos em lanolina em plântulas de cacau 1, 10 e 20 dias após aplicação (DPA) de hormônio. A, B e C: controle (lanolina). D , E e F: GA3 (10^{-4} M). G, H e I: ABA (50μ M). J, K e L: GA3/ABA.

Os hormônios e os controles de álcool não impediram a infecção das plantas. E infecção de plantas tratadas previamente com paclobutrazol e com giberelina, mostrou a importância desse hormônio no desenvolvimento dos sintomas clássicos de vassoura, como a hipertrofia. As plantas tratadas somente com paclobutrazol foram infectadas, mas

não apresentaram o sintoma de hipertrofia que foi observado no controle, vassoura sem tratamento de hormônio ou inibidor, e nas plantas tratadas com GA3 (Figura 8).



Figura 8: Bioensaio do efeito de GA3, ácido abscisico, paclobutrazol na infecção de plântulas de cacau com *M. perniciosa*. A e B: ácido abscisico (50 μ M). C e D: tratadas com ácido abscisico e infectadas. E e F: GA3 (100 μ M). G e H: GA3 e infectadas. I e J: paclobutrazol (100 mg/planta). K e L: tratadas com paclobutrazol e infectadas. M e N: controle negativo (álcool). O e P: tratadas com álcool e infectadas.

4.2 Análise de expressão gênica em cacau

Para compreender a possível relação entre a giberelina e o desenvolvimento dos sintomas da vassoura de bruxa foram realizadas análises das seguintes bibliotecas de RNAseq da interação *M. perniciosa-T. cacao*: vassoura verde; necrose1 - na qual a planta apresenta sinais inicias de necrose-; necrose2 - na qual a planta já apresenta necrose avançada; e vassoura seca). Para cada biblioteca de interação foi analisada também a biblioteca de planta controle de mesma idade do tratamento. Nesta análise utilizamos as sequencias genômicas disponibilizadas de *T. cacao* e o programa KAAS para identificação dos genes de interesse.

Os genes analisados foram: CPS (copalil difosfato sintase), KS (ent-kaurene sintase), GA3 ent-kaurene oxidase, KAO (acido ent-kaurenoico oxidase), GA20ox (gene que codifica a proteína responsável pela reação de retirada de um carbono para a formação do esqueleto C₁₉-GA), GA3ox (gene que codifica a proteína responsável pela reação de 3β-hidroxilação na produção de GAs ativas), GA2ox (gene que codifica a proteína responsável pela reação de 2β-hidroxilação), GID1, GID2 e DELLA (genes que codificam proteínas da via de sinalização), os genes descritos por serem induzidos por giberelina (XET e α -amilase), como mostrados na tabela 2.

| | Т. сасао | A. thaliana | O. sativa | V. vinifera |
|----------------------------------|----------|-------------|-----------|-------------|
| Síntede de GA | | | | |
| CPS | 1 | 1 | 1 | 2 |
| кѕ | 1 | 1 | 1 | 1 |
| GA3 (ent-kaurene oxidase) | 1 | 1 | 2 | 1 |
| KAO (ent-kaurene hidrolase acid) | 2 | 2 | 1 | 2 |
| GA20ox | 1 | 4 | 1 | 1 |
| GA3ox | 1 | 2 | 1 | 2 |
| GA2ox | 2 | 2 | 1 | 2 |
| Sinalização de GA | | | | |
| GID1 | 2 | 3 | 1 | 2 |
| GID2 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| DELLA | 2 | 5 | 1 | 2 |
| Resposta à GA | | | | |
| ХЕТ | 23 | 32 | 8 | 16 |
| Amylase | 1 | | | |

Tabela 2: Número de genes ortólogos das vias de síntese, sinalização e resposta à GAs em *T. cacao, A. thaliana, O. sativa* e *V. vinifera.*

O gene CPS apresenta uma única cópia no genoma de *T. cacao* e é um gene muito pouco expresso em todas as bibliotecas analisadas. Podemos observar que nas bibliotecas de interação as expressões são ainda menores do que nos controles de plantas sadias (Figura 9).



Figura 9: Análise de expressão do gene CPS da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com *M. perniciosa* **e sadias**. Eixo X representa os dias após a infecção que correspondem aos os quatro estágios da doença (30 – vassoura verde; 47 – necrose 1; 66 – necrose 2 e 111 – vassoura seca) e o eixo Y o RPKM, que é proporcional aos níveis de expressão do gene nas diferentes bibliotecas.

A análise de expressão do gene KS, que também apresenta somente uma cópia no genoma de *T. cacao*, mostra que este varia sua expressão também no controle, mas da mesma forma como gene CPS, a expressão de KS nas bibliotecas de interação apresentam níveis bem menores que os controles e apresentando uma tendência a diminuição de expressão com desenvolvimentos da doença (Figura 10).



Figura 10: Análise de expressão do gene KS da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com *M. perniciosa* e sadias. Eixo X representa os dias após a infecção que correspondem aos os quatro estágios da doença (30 – vassoura verde; 47 – necrose 1; 66 – necrose 2 e 111 – vassoura seca) e o eixo Y o RPKM, que é proporcional aos níveis de expressão do gene nas diferentes bibliotecas.

O gene GA3 ent-kaurene oxidase codifica uma proteína que participa da via de síntese posteriormente a formação do ent-kaureno e em cacau essa proteína é codificada por uma única cópia gênica. Nas bibliotecas de *T. cacao* as tendências de expressão deste gene são parecidas entre as amostras de interação e controles, mas com nível de expressão bastante aumentado biblioteca de necrose 1 (Figura 11).



Figura 11: Análise de expressão do gene GA3 (ent-kaureno oxidase) da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com *M. perniciosa* e sadias. Eixo X representa os dias após a infecção que correspondem aos os quatro estágios da doença (30 – vassoura verde; 47 – necrose 1; 66 – necrose 2 e 111 – vassoura seca) e o eixo Y o RPKM, que é proporcional aos níveis de expressão do gene nas diferentes bibliotecas.

O gene KAO (acido kauernoico oxidase) está presente em duas cópias no genoma do cacau. As duas cópias do gene variam a expressão dentre as amostras dos controles e das de interação e apresentam tendências de expressão diferentes entre as duas cópias (Figura 12 e 13). A cópia 1 varia muito pouco dentre as amostras de mesmo tratamento (Infectadas e sadias), mas os níveis de expressão nas bibliotecas de interação são bem maiores do que as plantas controles (Figura 12).



Figura 12: Análise de expressão da cópia 1 do gene KAO da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com *M. perniciosa* **e sadias.** Eixo X representa os dias após a infecção que correspondem aos os quatro estágios da doença (30 – vassoura verde; 47 – necrose 1; 66 – necrose 2 e 111 – vassoura seca) e o eixo Y o RPKM, que é proporcional aos níveis de expressão do gene nas diferentes bibliotecas.



Figura 13: Análise de expressão da cópia2 do gene KAO da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com *M. perniciosa* e sadias. Eixo X representa os dias após a infecção que

correspondem aos os quatro estágios da doença (30 – vassoura verde; 47 – necrose 1; 66 – necrose 2 e 111 – vassoura seca) e o eixo Y o RPKM, que é proporcional aos níveis de expressão do gene nas diferentes bibliotecas.

A cópia 2 do gene KAO apresenta variação de expressão maior que a copia 1, só que diferente desta os níveis de expressão são maiores nos controles do que na maioria das bibliotecas de interação (Figura 13).

O gene GA20ox codifica uma proteína muito importante na via de síntese de giberelinas e pode ser utilizada como "sinalizadora" da indução da via síntese de GAs, pois realiza a reação de retirada de um átomo de carbono da molécula com 20 carbonos, que é uma forma que não tem atividade e que muitas vezes é a forma que é transportada pela planta, para a formação do esqueleto C₁₉-GA, que é a estrutura básica das giberelinas ativas [69]. Nessa nova abordagem de identificação de genes encontramos no genoma de *T. cacao* uma cópia do gene GA20ox. O gene GA20ox apresenta tendências de expressão parecidas entre as amostras dos controles e infectadas no decorrer dos pontos de análise, porém os níveis de expressão nas amostras controles são sempre maiores que as amostras infectadas (Figura 14).



Figura 14: Análise de expressão do gene GA20oxi da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com *M. perniciosa* e sadias. Eixo X representa os dias após a infecção que correspondem aos os

quatro estágios da doença (30 – vassoura verde; 47 – necrose 1; 66 – necrose 2 e 111 – vassoura seca) e o eixo Y o RPKM, que é proporcional aos níveis de expressão do gene nas diferentes bibliotecas.

O gene GA3oxi codifica uma proteína responsável por fazer a conversão de giberelinas inativas (GA₉ e GA₂₀) em ativas (GA₁ e GA₄) [69]. No genoma foi identificada uma cópia a qual é muito pouco expressa nas bibliotecas de interação, apresentando uma tendência à diminuição da expressão com o decorrer do desenvolvimento da doença (Figura 15).



Figura 15: Análise de expressão do gene GA3oxi da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com *M. perniciosa* **e sadias.** Eixo X representa os dias após a infecção que correspondem aos os quatro estágios da doença (30 – vassoura verde; 47 – necrose 1; 66 – necrose 2 e 111 – vassoura seca) e o eixo Y o RPKM, que é proporcional aos níveis de expressão do gene nas diferentes bibliotecas.

O gene GA2ox codifica uma importante proteína que está envolvida na regulação dos níveis de giberelina ativas na planta. Esta proteína realiza a reação de 2β-hidroxilação que inativa irreversivelmente as giberelinas. Este gene está presente em duas cópias. As duas cópias estão bastante expressas nos estágios iniciais da doença quando compradas

com os controles. Dentre as amostras sadias a expressão varia muito pouco e estão quase sempre menos expressos do que nas plantas infectadas (Figura 16 e 17).



GA2oxi1

Figura 16: Análise de expressão da cópia1 do gene GA2oxi da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com *M. perniciosa* e sadias. Eixo X representa os dias após a infecção que correspondem aos os quatro estágios da doença (30 – vassoura verde; 47 – necrose 1; 66 – necrose 2 e 111 – vassoura seca) e o eixo Y o RPKM, que é proporcional aos níveis de expressão do gene nas diferentes bibliotecas.



Figura 17: Análise de expressão da cópia2 do gene GA2oxi da planta nas bibliotecas de plantas infectadas com *M. perniciosa* **e sadias**. Eixo X representa os dias após a infecção que correspondem aos os quatro estágios da doença (30 – vassoura verde; 47 – necrose 1; 66 –

necrose 2 e 111 – vassoura seca) e o eixo Y o RPKM, que é proporcional aos níveis de expressão do gene nas diferentes bibliotecas.

A partir dessas análises montamos um esquema simplificado da via de síntese de giberelinas *em T. cacao*, que facilita o entendimento do comportamento dos genes dessa via no estagio de vassoura verde, estágio em que aparece a maior parte dos sintomas relacionados a hôrmonio, no qual verificamos que a maior expressão é detectada para genes que participam da inativação das giberelinas, enquanto que os genes de síntese estão menos expressos que os controles ou sem diferença significativa (Figura 18).



Figura 18: Comparação da expressão gênica da via de síntese de GAs entre vassoura verde e planta sadia. Os círculos representam os genes e ao numero de cópias. As setas representam as reações e apontam para um produto da via. As caixas verde representam giberelinas ativas e as caixas cinza representam giberelinas inativas. Em vermelho os genes que estão mais expressos em vassoura verde. Em azul os genes que estão mais expressos no controle. Em preto os genes que não apresentam diferença significativa de expressão entre a vassoura verde e o controle. Em branco os genes considerados não expressos nas bibliotecas (RPKM < 1).

Análises de expressão dos genes da via de sinalização nas bibliotecas de RNA-Seq de amostras de vassoura-verde em relação ao controle mostraram que os genes que codificam os receptores de giberelinas (GID1) tem maior expressão em amostras de plantas infectadas, enquanto que os genes que codificam a proteínas DELLA (repressor de resposta de giberelina) tem sua expressão diminuída (Figura 19).



Figura 19: Perfil de expressão dos genes da via de sinalização de GAs. Expressão das duas cópias do gene que codifica o receptore de giberelinas (GID1), do GID2 e as duas cópias do gene da proteína DELLA em bibliotecas de RNA-Seq de amostras de plântula com sintomas de vassoura-verde e plântula controle.

A análise dos genes de resposta de giberelinas também mostrou uma tendência ao aumento de expressão em plântulas infectadas em relação ao controle quando comparadas amostras de vassoura-verde e plântulas sadias. Dentre os 24 genes que respondem a giberelinas 12 apresentam expressão aumentada em vassoura-verde em relação ao controle, enquanto que 6 estão mais expressos no controle e outros 6 apresentam RPKM menor do que 1, sendo considerados não expressos em nenhuma das duas bibliotecas (Figuras 20).



Figura 20: Expressão de genes que respondem a GAs em bibliotecas de RNA-Seq. Expressão de cópias do gene XET e amilase que apresentaram RPKM maior que 1. A: Genes que apresentaram expressão com RPKM maior que 10 em pelo menos uma das bibliotecas. B: Genes que apresentaram expressão com RPKM menor do que 10 e maior do que 1 em pelo menos uma das bibliotecas.

Estudos recentes têm demonstrado que os sinais ambientais, tais como sal, luz, e fitormônios como etileno, auxina e ácido abscísico (ABA), regulam o crescimento da planta por desestabilizar as proteínas DELLA por alterar o metabolismos de giberelinas [70, 71]. E vários genes da via de síntese de giberelinas são regulados por DELLAs. Os genes GA200x e GA30x são induzidos por DELLA e reprimidos por GA [72].

A homeostase de GA é obtida por um mecanismo de feedback que aparece para coordenar as atividades no GA e vias metabólicas de resposta. Sob condições de baixos níveis de GA ou em mutantes com reduzida GA sinalização, níveis de transcrição de genes da biossíntese GA, tais como GA20ox e GA3ox, são regulada positivamente, enquanto que a expressão do gene da inativação GA2ox é regulado negativamente. Inversamente, aplicação de GAs ou mutações que levam ao aumento da sinalização de GA, causam a redução da expressão de GA3ox e GA20ox e elevada expressão de GA2ox [42].

Os resultados obtidos a partir da análise de expressão em bibliotecas de RNA-Seq no curso da doença mostram que há a indução da expressão dos genes de resposta a giberelina durante a vassoura-verde, mas esse aumento não é encontrado no genes de síntese. Além de ter sido demonstrado que a alta expressão dos genes de inativação de giberelinas (GA2ox) na vassoura-verde em relação ao controle, sugerindo que a possível produção de giberelinas pela planta aconteceria em pontos anteriores aos analisados. E como, após a análises desses dados, foram obtidos novos dados de RNA-Seq, agora de amostras infectadas em estágios assintomáticos, novas análises foram feitas. Foram analisadas bibliotecas de RNA-Seq de amostras com 4, 8, 12, 24, 48 horas e 16 dias após a infecção, além de amostras controle de mesma idade, nas quais genes chaves da via de síntese de giberelina tiveram as expressões avaliadas (CPS, KS, GA3ox e GA2ox).

A análise dos dados das bibliotecas assintomáticas e seus controles mostraram que o gene CPS, como na bibliotecas sintomáticas, apresenta expressões baixas e pouco variáveis. O gene KS apresenta expressão pouco variável entre os infectados e os controles, com diferença considerável entre eles somente no ponto de 48 horas após a infecção, quando observa-se uma maior expressão desse gene no controle. O gene GA3ox, como o gene KS, apresenta diferença entre as bibliotecas infectadas e controle somente no ponto de 48 horas após a infecção, no qual a expressão deste gene é maior no controle (Figura 21).



Figura 21: Análise de expressão de genes da via de síntese de giberelinas da planta em bibliotecas de plantas infectadas com *M. perniciosa* e sadias. Expressão dos genes CPS, KS, GA3ox e GA2ox nos tempos após a infecção, além da vassou-verde como único estágio com síntomas (6, 12, 24, 48 horas e 16 dias após a infecção e vassoura-verde).

Sabendo-se do mecanismo de regulação dos níveis de GAs em plantas ocorre por *feedback*, os dados indicam que existe aumento nos níveis de giberelina durante a vassoura-verde, mas que a síntese desse hormônio não é promovido pela planta, sugerindo que o fungo poderia estar produzindo GAs durante a interação.

4.3 Quantificação de giberelina em plântulas

Relatos de produtores de cacau da região de Ilhéus mostraram que a aplicação de ureia diminui a quantidade de árvores infectadas na lavoura. Experimentos preliminares realizados pelo aluno de doutorado Paulo José Teixeira em plântulas de cacau mostraram que a utilização de 1g/dm³ de ureia e 2,73 g/dm³ de NaNO₃ pode causar a diminuição da taxa de infecção em até 70% - verificada pelo aparecimento dos sintomas da doença- sem ser tóxico para a plântula.

Uma vez que a nossa hipótese de trabalho relaciona à giberelina diretamente com a indução dos sintomas observados na vassoura de bruxa e que estes sintomas não se verificam em determinadas concentrações de nitrogênio, foram desenhados experimentos na tentativa de entender a relação do nitrogênio com a regulação dos genes de síntese de giberelina do fungo, como descrito na seção 3.7.

A relação entre as fontes de nitrogênio e o desenvolvimento da doença foi avaliada mediante dois recursos: (i) observação do aparecimento de sintomas nas plantas infectadas e (ii) quantificação de giberelinas nos meristemas das plantas infectadas e não infectadas.

(i) Observação de sintomas: Assim como relatado anteriormente foi constatada a diminuição da infecção – verificada pelo aparecimento dos sintomas- nas plantas tratadas com nitrogênio quando a fonte utilizada foi a ureia independente do momento da aplicação comparadas com as não tratadas. Plantas tratadas com ureia cinco dias antes da inoculação com esporos do fungo tiveram a taxa de infecção de 10%, enquanto que as plantas não tratadas tiveram 70% de infecção. A taxa de infecção passa de 10% para 50% quando tratamento com ureia aconteceu 10 dias após a inoculação com o fungo, sugerindo que o nitrogênio pode atuar na proteção das plantas em estágios iniciais da infecção (Figura 22). O tratamento com NaNO₃ não alterou significativamente a taxa de infecção das plantas, sugerindo que a possível regulação da infecção ou do aparecimento dos sintomas está relacionado com o tipo de fonte de nitrogênio. Esta observação poderia estar relacionada com a forma de assimilação dos diferentes tipos de nitrogênio pela planta ou com os efeitos destes na regulação da via de síntese de giberelina do fungo caso a nossa hipótese seja confirmada.



Figura 22: Avaliação do aparecimento de sintomas em plantas infectadas e tratadas com nitrogênio.

(ii) Quantificação de giberelinas em amostras de plantas por GC-MS: Os resultados disponíveis até o presente momento são preliminares e incompletos já que parte das amostras processadas está ainda em fase de identificação e quantificação. Entretanto, os resultados parciais obtidos até agora sugerem diferenças nos padrões de GA detectados – tipo e quantidades – entre as amostras que mostraram sintomas comparadas com aquelas sem sintomas. Também foram identificadas diferenças nas amostras dependendo da fonte de nitrogênio.

Não foi detectada GA3 em nenhuma amostra analisada, sugerindo que *T. cacao* não produz GA3, como giberelina ativa, nos meristemas apicais (tabela 3).

Em relação ao tratamento com NaNO₃, observou-se que a GA1 (giberelina ativa) está presente em maior quantidade na amostra de planta sem sintomas. Este resultado é diferente do esperado já que a hipótese de trabalho é que o aumento da giberelina ativa em plantas infectadas poderia causar o desenvolvimento dos sintomas. Entretanto, este resultado pode ser explicado pelo ponto de coleta das amostras. Como as amostras já apresentavam sintomas quando coletadas, detectamos somente o efeito das giberelinas ativas, que possivelmente tinham os níveis mais altos em períodos anteriores ao analisado. Outra possível explicação para este resultado é que, como já tínhamos sugerido
a fonte de nitrogênio (NaNO₃) pode estar alterando o metabolismo do fungo diminuindo a possível produção de giberelinas ativas pelo patógeno. Essa possibilidade poderá ser comprovada com a obtenção dos resultados dos controles não infectados desses mesmos tratamentos ainda em fase de medição.

Já o tratamento com ureia parece ter alterado mais fortemente o metabolismo de giberelina da planta, no qual direcionou a síntese se giberelina ativa para somente GA4, mesmo em plântula não infectada (tabela 3).

| Sample | Tratamentos | GA1 | GA3 | GA4 |
|---------------|-------------|-----------------|-----|-----|
| | | ng/g dry weight | | |
| Sem sintomas | А | 3,7 | 0 | 2,6 |
| Vassoura | А | 1,3 | 0 | 1,3 |
| Sem sintomas | С | 5 | 0 | 3,4 |
| Vassoura | С | 2,2 | 0 | 0 |
| Sem sintomas | D | 2,7 | 0 | 0 |
| Vassoura | D | 3,4 | 0 | 0 |
| Não infectada | U | 4,2 | 0 | 0 |

| Tabela 3: Quantificaçã | o de giberelinas | ativas em | amostras de | e plântulas | tratadas com | nitrogênio |
|------------------------|------------------|-----------|-------------|-------------|--------------|------------|
| de infectadas com M. | perniciosa. | | | | | |

A: NaNO3+infecção C: infecção+NaNO3 D: infecção+ureia U: ureia

A partir de todos os resultados da a avaliação do metabolismo de giberelinas da planta sugerem que esta tem seu metabolismo alterado direcionando para a inativação das giberelinas, que deve ser causado pelo aumento dos níveis de giberelina em estágios iniciais da doença, e que esse aumento deve-se possivelmente pela produção do hormônio pelo fungo.

4.4 Caracterização da via de síntese de giberelina em M. perniciosa e do gene MpCPS/KS

Foram identificados no genoma de *M. perniciosa* todos os possíveis genes para a via de síntese de giberelina como é descrita pra fungos. Entretanto, somente os genes GGS, CPS/KS e GA-desaturase tiveram o número de cópias identificados, 4, 1 e 4 respectivamente (Figura 23).



Figura 23: Esquema simplificado da via de síntese de giberelinas em fungos. As caixas verdes representam giberelinas ativas em plantas. () Número de cópias de genes em *M. perniciosa*. * Número de cópias desconhecido em *M. perniciosa*.

As cópias dos 3 possíveis genes da via de síntese de giberelinas em *M. perniciosa* foi avaliado quanto a expressão em bibliotecas de RNA-Seq de plântulas infectadas, mas

não foi possível detectar a expressão de nenhuma das cópias desses genes durante a interação do fungo com em plântula, possivelmente pela pouca amostragem de RNAs do fungo em relação a amostra total (plântula infectada), possibilitando somente a detecção de genes muito expressos. Por conta disso, bibliotecas de interação do fungo com o fruto foram avaliadas, já que neste caso a densidade de fungo é muito maior.

Nas bibliotecas de desenvolvimento da doença em fruto observou-se que em todos os estágios pelo menos uma cópia de cada gene está expresso e que há alteração da expressão destes a depender no estágio da doença (Figura 24).



Figura 24: Expressão de possíveis genes de síntese de GAs *de M. perniciosa* **em bibliotecas de RNA-Seq.** Perfil de expressão das cópias dos genes GGS, CPS/KS e GA4-des em 3 diferentes estágios de desenvolvimento da interação de *M. perniciosa* em fruto (infc_fruit1: início da ingecção; inf_fruit2: infecção avançada; inf_fruit3: fruto podre).

Como o gene CPS/KS apresenta papel chave na via de síntese de giberelinas em fungos, sendo o gene responsável por codificar uma proteína bifuncional que cataliza os primeiros passos específicos da via de giberelina [59], foi feita a caracterização do gene CPS/KS de *M. perniciosa* (MpCPS/KS) a partir da caracterização de MOTIFs e comparação com outros genes CPS/KS identificados em outros fungos.

A análise do gene MpCPS/KS mostrou que este codifica uma proteína de 566 aminoácidos e tem 1876 pb de tamanho no genoma. Em fungos ascomicetos o gene codificante desta proteína geralmente tem mais de 2800 pb (exemplo: 2856 bases em *G. fujikuroi* [59]).

A figura 25 mostra a identificação de MOTIFs nas sequencias de CPS/KS de *M. perniciosa, G. fujikuroi, S. manihoticola* e *N. crassa.* O domínio CPS é caracterizado pela sequência DxDD [73], e este foi identificado em todas as sequências analisadas. O domínio KS é identificado pela sequência DDxxD [73]. As proteínas bifuncionais apresentam os dois domínios CPS e KS [74]. Porém, o fungo *N. crassa*, que foi demonstrado que possui capacidade de produzir GA3 [75], possui em seu geneoma um único gene candidato para codificar uma CPS/KS, e este não apresenta o domínio DDxxD (Figura 19) sugerindo que esse domínio não seria essencial para a proteína. Outros dois domínios foram identificados nas sequencias de CPS/KS analisadas: YDTWA e um domínio que se repete na sequencia QxxxxXW, que são caracteristicos de diterpeno ciclases desde bactérias até plantas [40, 74].



Figura 25: Identificação de MOTIFs nas sequências de CPS/KS dos fungos *G. fujikuroi*, *S. manihoticola*, *N. crassa* e *M. perniciosa*.

A sequência da proteína MpCPS-KS tem similaridade com a região N-terminal de CPS/KS de fungos ascomicetos e com as duas proteínas (CPS e KS) de plantas sugerindo que as duas funções devem estar presentes na proteína de *M. perniciosa*. Uma aprovável explicação para essas diferenças no tamanho e em relação aos domínios é que esta

proteína bifuncional foi identificada somente em fungos ascomicetos por tanto não dispomos de nenhuma sequência de basidiomiceto para compararmos.

O gene MpCPS/KS também foi avaliado quanto a expressão em amostras de plântulas com vassoura-verde de forma qualitativa por PCR. O gene foi amplificado em cDNA de vassoura-verde com primers que amplificam um fragmento de 100 pb (tabela 4). A partir desse teste foi identificada a expressão de MpCPS/KS durante a interação com plântulas com sintomas de vassoura-verde (Figura 26)

Tabela 4: Sequências de primers para amplificação de fragmento de MpCPS/KS

| Primers | Sequência |
|-------------|----------------------------|
| CPS-KS_RT_F | AAGAGGAAGGCATCTCTTTCG (21) |
| CPS-KS_RT_R | TGCATCCGATAGACCAAATTC (21) |



Figura 26: Avaliação qualitativa de expressão do gene MpCPS/KS. CPS/KS amplificação feita com os primers específicos para este gene de *M. perniciosa*. Tubulina: específico de *M. perniciosa* utilizado com controle da infecção. VV: reação de amplificação com cDNA de vassoura-verde. CT: reação de amplificação com cDNA de plântula sadia. +: reação com cDNA do fungo *M. perniciosa*. - : reação de amplificação sem amostra molde.

Afim de avaliar a atividade de bifuncional do gene MpCPS/KS foram feitos testes funcionais por complementação de mutante de *G. fujikuroi* e avaliação da recuperação do

fenótipo (capacidade de produzir giberelina). Como resultado, os transformantes obtidos da complementação não recuperaram o fenótipo esperado. Este resultado, porém, não é conclusivo pois, devido a dificuldade de amplificação do cDNA inteiro do gene MpCPS/KS, a transformação foi feita com o fragmento de DNA. E como se trata de organismos distintos e afastados filogenéticamente é possível que o processamento do RNA para retirada dos introns não tenha ocorrido corretamente, impedindo a produção de uma proteína funcional.

Avaliação da produção de giberelina (GA3) por M. perniciosa

Na tentativa de demonstrar a capacidade do fungo de produzir giberelinas diversos meios de culturas foram testados. Inicialmente foram testadas amostras do fungo nas fases biotrófica-like (a partir da germinação de esporos em meio de cultura descrito como favorável para manter as caracteristicas de micélio biotrófico), necrotrófica e esporos foram analisadas quanto à produção de giberelina por TLC-EASI-MS. O resultado dessa análise mostrou que o sobrenadante de fungo na fase biotrófica-like apresentou um pico (345,2957 m/z) semelhante ao encontrado no padrão (ácido giberélico 345,1647 m/z), que apresenta massa de 346 m/z, e que não foi detectado na solução controle (meio de cultura estéril). A presença deste pico indica a presença de um composto com o mesmo perfil da giberelina, sugerindo a presença desse composto na amostra (Figura 27). As outras amostras não apresentaram semelhança significante, provavelmente por serem coletas de grandes quantidades de soluções em relação à massa de fungo, devendo então, estar bastante diluídas, já que análises de expressão preliminares mostraram que provavelmente os genes estudados da via de síntese de giberelina estão expressos em ambas as fases do ciclo de vida do fungo. Outro ponto importante é que por se tratar de uma amostra complexa tornou-se difícil a identificação precisa da substância. Os resultados da espectrometria, dão indícios de que o fungo poderia estar produzindo uma substância semelhante à giberelina, mas não conseguimos um resultado conclusivo.



Figura 27: Espectro de MS de amostras de sobrenadante do fungo. 1 Ácido giberélico comercial (GA3). 2 Meio de cultura para fase *biotrófica-like* como controle negativo. 3 Sobrenadante de fungo na fase *biotrófico-like*.

Durante o desenvolvimento do trabalho utilizamos dois meios de cultura que se mostraram indutores da produção de giberelinas por fungos. (i) Sabendo-se que em *G. fujikuroi* (organismo modelo para estudo de produção de giberelinas em fungos), no período de crescimento exponencial, onde o consumo de glucose, nitrogênio e fosfato são constantes, nenhuma GA é produzida. Altas concentrações de nitrogênio são utilizadas durante o crescimento exponencial de *G. fujikuroi* e somente após o consumo desse nitrogênio e a consequente diminuição no meio – a partir de 10% da concentração de nitrogênio inicial (0,48g/L) - a produção de giberelina é induzida por este fungo [76]. (ii) Utilizamos o meio descrito por Rademacher [46] contendo componentes vegetais (OPM) que induziu a produção de giberelinas em *Fusarium moniliforme, G. fujikuroi* e *Sphaceloma manihoticola*. O fungo *M. perniciosa* foi inoculado nos meios (i) e (ii) e foram incubados por 15 dias para a verificação da produção de giberelinas por TLC. Um ponto

crítico para a identificação de giberelinas por fungos é o tempo de coleta da amostra. Durante o período de trabalho no laboratório da Prof. Dr. Bettina Tudzynski Molecular Biology and Biotechnology of Fungi na Alemanha observei que algumas linhagens de *G. fujikuroi* só produziam giberelinas após o total esgotamento das fontes de nitrogênio - o que levava dois dias nas condições utilizadas - enquanto outras linhagens só começam a produzir algumas giberelinas a partir do 7° dia de incubação em meio pobre em nitrogênio. Nas condições utilizadas para o crescimento de *M. perniciosa* não conhecemos o tempo ótimo para a possível indução de giberelinas pelo que optamos por crescer o fungo por um período prolongado (15 dias) para tentar garantir a coleta da amostra (sobrenadante da cultura) após a possível produção deste hormônio. Isso porque não foram identificadas em fungos vias de degradação ou utilização de giberelinas.

A análise dos sobrenadantes citados acima por TLC mostraram a presença de um composto com RF semelhante ao RF do ácido giberélico utilizado como padrão (GA3), sugerindo que possivelmente este composto está presente nas amostras analisadas (Figura 28). As amostras também apresentaram um perfil de corrida característico de amostras complexas, mas com padrão de cor característico de giberelinas, podendo ser um indicio da presença de outras GAs.

Os resultados obtidos para essas amostras citadas anteriormente não se mostraram reprodutíveis, mostrando que estes não são conclusivos e sim um indicativo a possível produção de hormônio (GA) pelo fungo. A dificuldade encontrada para conclusão dessa etapa do trabalho era esperada devido dificuldade da manipulação de fungo em algumas fases de crescimento, como basiomas e biotrófico e a prórpia dificuldade de análises de hormônios, que normalmente são produzidos em quantidades mínimas mesmo por organismos conhecidos pela sua produção. Além disso, esta etapa tinha como ponto limitante a detecção do hormônio em condições *in vitro*, que pelos dados obtidos em todas bibliotecas de RNA-Seq tem se mostrado muito diferente das condições *in planta*.



Figura 28: TLC de detecção de giberelina. GA3: ácido giberélico aplicado como padrão. S1 e S2: Fungo crescido em meio ICI. S3 e S4: fungo crescido em meio OPM.

5. Conclusões

• Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a giberelina desempenha papel importante no desenvolvimento da doença vassoura-de-bruxa contribuindo para o a aparecimento dos sintomas clássicos de vassoura-verde;

• A doença vassoura-de-bruxa altera o metabolismo de giberelina em cacau induzindo os genes de inativação de giberelinas, indicando que tem um aumento de giberelina nos estágios iniciais da doença, mas que o aumento não é causado pela síntese desse hormônio pela planta, sugerindo que o fungo seria o responsável;

• *T. cacao* parece não produzir giberelina GA3 como giberelina ativa nos meristemas apicais;

• Fontes de nitrogênio podem alterar o metabolismo de giberelinas em cacau;

• *M. perniciosa* possui genes candidatos para toda a via de síntese de giberelina em fungos e estes estão expressos durante a interação com cacau.

6. Referências

- 1. Rangel J: **Desenvolvimento institucional**. In., vol. 16. Brasília, Distrito Federal, Brasil: Ceplac/Cacau 1982: 1–11.
- Pereira JL, Ram, A., Figuereido, J.M. & L.C. de Almeida: "La primera aparición de la "Escoba de Bruja" en la principal región productora de cacao del Brasil". . *Turrialba* 1989, 36(4):459-461.
- 3. Stahel G: Marasmius perniciosus nov. spec., the cause of the krulloten disease of cacao in Suriname. *Bull* 1915, **33**:1-27.
- 4. Singer R: A monographic study of the genera Crinipellis and Chaetocalathus. *Lilloa* 1942, **8**: 441-534.
- 5. 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.
- 6. Bastos CN: Epifitiologia, hospedeiros e controle de vassoura-de-bruxa (Crinipellis perniciosa (Stahel) Singer); 1990.
- 7. Trevisan SDP: Mudanças no Sul da Bahia associadas à vassoura-de-bruxa do cacau. Actas Lagos, Cocoa Producer's Alliance 1996.
- 8. Anderbrhan T, Figueira, A., Yamada, M.M., Cascardo, J. and Furtek, D.B. : Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (Crinipellis perniciosa) of Theobroma cacao in Bahia, Brazil. . Eur J Plant Pathology 1999, 105:167–175.
- 9. Bastos CN: Potencial de Trichoderma viride no controle da vassoura-de-bruxa (Crinipellis perniciosa) do cacaueiro. *Fitopatologia Brasileira* 1996b, **21**(4):509-512.
- 10. Oliveira J. E. H. K: In Informe Técnico 1992-1997. In. Edited by CEPEC/CEPLAC I, Brasil.; 1999.
- 11. Pereira JL: Management of Witches' Broom Disease of Cocoa: A Contemporary Restrospective. "Cocoa Producer" Alliance, Lagos 2000
- 12. Bastos CN: Mycoparasitic nature of the antagonism between Trichoderma viride and Crinipellis perniciosa. *Fitopatologia Brasileira* 1996a, **21**(1):40-54.
- 13. Baker REDaH, P. : Witches' broom disease of cocoa (Marasmius perniciosus Stahel). Richmond, Commonwealth Mycological Institute 1957.
- 14. 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.
- 15. Rincones J, Meinhardt LW, Vidal BC, Pereira GA: Electrophoretic karyotype analysis of Crinipellis perniciosa, the causal agent of witches' broom disease of Theobroma cacao. *Mycological research* 2003, **107**(Pt 4):452-458.
- 16. 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. *Mycological research* 2009, **113**(Pt 1):61-72.

- 17. 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 ethyleneinducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in Theobroma cacao. *Mycological research* 2007, 111(Pt 4):443-455.
- 18. Rio MC, de Oliveira BV, de Tomazella DP, Silva JA, Pereira GA: Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of Cacao. *Current microbiology* 2008, 56(4):363-370.
- 19. Bastos CN, Evans HC: A New Pathotype of Crinipellis-Perniciosa (Witches Broom Disease) on Solanaceous Hosts. *Plant Pathology* 1985, **34**(2):306-312.
- 20. Bastos CNaA, T: Urucu Bixa orellana a new host of witches' broom disease Crinipellis perniciosa of cocoa. *Fitopatologia Brasileira* 1986, **11**:963–965.
- 21. Hedger JN, Pickering V, Aragundi J: Variability of Populations of the Witches-Broom Disease of Cocoa (Crinipellis-Perniciosa). Transactions of the British Mycological Society 1987, **88**:533-546.
- 22. Thorold CA: Airborne dispersal of Phytophthora palmivora, causing blackpod disease of Theobroma cacao. *Nature* 1952, **170**(4330):718-719.
- 23. Evans HC: Witches' broom disease: a case study. . Cocoa Growers' Bulletin 1981, 32:5-19.
- 24. Orchard JaH, K. : Photosynthesis, carbohydrate translocation and metabolism and fungal tissues in cacao seedlings infected with Crinipellis perniciosa. Actas, Cocoa Producers' Alliance 1988: 325-330.
- 25. Sreenivasan TN, Dabydeen S: Modes of Penetration of Young Cocoa Leaves by Crinipellis-Perniciosa. *Plant Disease* 1989, **73**(6):478-481.
- 26. Evans HC, and Bastos, C. N. : **Uma avaliação do ciclo de vida da vassoura de bruxa (Crinipellis perniciosa) do cacaueiro.** . *Fitopatologia Brasileira* 1979, **4**(1):515-523.
- 27. Calle H, Cook, A. A. and Fernando, S. Y.: Histology of witches' broom caused in cacao (Theobroma cacao) by Crinipellis perniciosa. *Phytopathology* 1982, 72(11):1479-1481.
- 28. 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.
- 29. Purdy LH, Schmidt RA: **STATUS OF CACAO WITCHES' BROOM: biology**, epidemiology, and management. *Annual review of phytopathology* 1996, **34**:573-594.
- 30. 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.
- 31. Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella AW, Schiavinato MA, Cascardo JC, Pereira GA: Biochemical changes during the development of witches' broom:

the most important disease of cocoa in Brazil caused by Crinipellis perniciosa. *Journal of experimental botany* 2005, **56**(413):865-877.

- 32. Grant MR, Jones JD: Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 2009, **324**(5928):750-752.
- 33. Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD: **Pathological hormone imbalances**. *Current opinion in plant biology* 2007, **10**(4):372-379.
- 34. Robinette D, Matthysse AG: Inhibition by Agrobacterium tumefaciens and Pseudomonas savastanoi of development of the hypersensitive response elicited by Pseudomonas syringae pv. phaseolicola. *Journal of bacteriology* 1990, 172(10):5742-5749.
- Yang S, Zhang Q, Guo J, Charkowski AO, Glick BR, Ibekwe AM, Cooksey DA, Yang C H: Global Effect of Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis on Multiple Virulence
 Factors of Erwinia chrysanthemi 3937. Applied and environmental microbiology 2007, 73(4):1079-1088.
- 36. Vandeputte O, Öden S, Mol A, Vereecke D, Goethals K, El Jaziri M, Prinsen E: Biosynthesis of Auxin by the Gram-Positive Phytopathogen Rhodococcus fascians Is Controlled by Compounds Specific to Infected Plant Tissues. Applied and environmental microbiology 2005, **71**(3):1169-1177.
- 37. Tudzynski B: Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology* 2005, 66(6):597-611.
- 38. Taiz L: Fisiologia vegetal. 2004.
- 39. Navarro L, Bari R, Achard P, Lison P, Nemri A, Harberd NP, Jones JD: **DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling**. *Current biology : CB* 2008, **18**(9):650-655.
- 40. Kawaide H: **Biochemical and molecular analyses of gibberellin biosynthesis in fungi**. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2006, **70**(3):583-590.
- 41. Biemelt S, Tschiersch H, Sonnewald U: Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant physiology* 2004, **135**(1):254-265.
- 42. Hedden P, Thomas SG: **Gibberellin biosynthesis and its regulation**. *The Biochemical journal* 2012, **444**(1):11-25.
- 43. Arteca RN, Arteca JM: Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in Arabidopsis thaliana plants. *Journal of experimental botany* 2008, 59(11):3019-3026.
- 44. Harada H, Lang A: Effect of some (2-chloroethyl) trimethylammonium chloride analogs and other growth retardants on gibberellin biosynthesis in Fusarium moniliforme. *Plant physiology* 1965, **40**(1):176-183.
- 45. Hasan HA: Gibberellin and auxin-indole production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. Acta microbiologica et immunologica Hungarica 2002, **49**(1):105-118.
- 46. Rademacher W: Inhibition of Gibberellin Production in the Fungi Gibberella fujikuroi and Sphaceloma manihoticola by Plant Growth Retardants. *Plant physiology* 1992, **100**(2):625-629.

- 47. Nakamura C, Van Telgen HJ, Mennes AM, Ono H, Libbenga KR: Correlation between Auxin Resistance and the Lack of a Membrane-Bound Auxin Binding Protein and a Root-Specific Peroxidase in Nicotiana tabacum. *Plant physiology* 1988, **88**(3):845-849.
- 48. Hedden P, Phillips AL, Rojas MC, Carrera E, Tudzynski B: **Gibberellin Biosynthesis in Plants and Fungi: A Case of Convergent Evolution?** *Journal of plant growth regulation* 2001, **20**(4):319-331.
- 49. Ward DA, MacMillan J, Gong F, Phillips AL, Hedden P: **Gibberellin 3-oxidases in developing embryos of the southern wild cucumber, Marah macrocarpus**. *Phytochemistry* 2010, **71**(17-18):2010-2018.
- 50. Munoz GA, Agosin E: Glutamine Involvement in Nitrogen Control of Gibberellic Acid Production in Gibberella fujikuroi. *Applied and environmental microbiology* 1993, **59**(12):4317-4322.
- 51. Tudzynski B: **Biosynthesis of gibberellins in Gibberella fujikuroi: biomolecular aspects**. *Applied microbiology and biotechnology* 1999, **52**(3):298-310.
- 52. Gesteira Ada S, Micheli F, Ferreira CF, Cascardo JC: Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen Crinipellis perniciosa. *BioTechniques* 2003, **35**(3):494-496, 498-500.
- 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. *Current microbiology* 2006, 52(3):191-196.
- 54. 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**. *The New phytologist* 2012, **194**(4):1025-1034.
- 55. Zaparoli G, Barsottini MR, de Oliveira JF, Dyszy F, Teixeira PJ, Barau JG, Garcia O, Costa-Filho AJ, Ambrosio AL, Pereira GA *et al*: **The crystal structure of necrosisand ethylene-inducing protein 2 from the causal agent of cacao's Witches' Broom disease reveals key elements for its activity**. *Biochemistry* 2011, **50**(45):9901-9910.
- 56. Gonzalezcandelas L, Kolattukudy PE: Isolation and Analysis of a Novel Inducible Pectate Lyase Gene from the Phytopathogenic Fungus Fusarium-Solani F-Sp Pisi (Nectria-Haematococca, Mating Population-Vi). Journal of bacteriology 1992, 174(20):6343-6349.
- 57. Amselem J, Cuomo CA, van Kan JA, Viaud M, Benito EP, Couloux A, Coutinho PM, de Vries RP, Dyer PS, Fillinger S *et al*: Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens Sclerotinia sclerotiorum and Botrytis cinerea. *PLoS genetics* 2011, 7(8):e1002230.
- 58. Xavier-Santos S, Carvalho CC, Bonfa M, Silva R, Capelari M, Gomes E: Screening for pectinolytic activity of wood-rotting Basidiomycetes and characterization of the enzymes. *Folia microbiologica* 2004, **49**(1):46-52.

- 59. Tudzynski B, Kawaide H, Kamiya Y: Gibberellin biosynthesis in Gibberella fujikuroi: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene. *Current genetics* 1998, **34**(3):234-240.
- 60. Kilaru A, Bailey BA, Hasenstein KH: *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS microbiology letters* 2007, **274**(2):238-244.
- 61. Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Kerckhoffs LH, Elliott RC: **Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea**. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2000, **21**(6):547-552.
- 62. 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.
- 63. Lana TG, Azevedo JL, Pomella AW, Monteiro RT, Silva CB, Araujo WL: Endophytic and pathogenic isolates of the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Tricholomataceae) are indistinguishable based on genetic and physiological analysis. *Genetics and molecular research : GMR* 2011, **10**(1):326-334.
- 64. Bruckner B: **Regulation of gibberellin formation by the fungus Gibberella fujikuroi**. *Ciba Foundation symposium* 1992, **171**:129-137; discussion 137-143.
- 65. Malonek S, Rojas MC, Hedden P, Hopkins P, Tudzynski B: **Restoration of gibberellin** production in Fusarium proliferatum by functional complementation of enzymatic blocks. *Applied and environmental microbiology* 2005, **71**(10):6014-6025.
- 66. Moriya Y, Itoh M, Okuda S, Yoshizawa AC, Kanehisa M: **KAAS: an automatic** genome annotation and pathway reconstruction server. *Nucleic acids research* 2007, **35**(suppl 2):W182-W185.
- 67. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL: **TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq**. *Bioinformatics* 2009, **25**(9):1105-1111.
- 68. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B: **Mapping and quantifying** mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods* 2008, **5**(7):621-628.
- 69. Wilkinson S, Kudoyarova GR, Veselov DS, Arkhipova TN, Davies WJ: **Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management**. *Journal of experimental botany* 2012, **63**(9):3499-3509.
- 70. Achard P, Vriezen WH, Van Der Straeten D, Harberd NP: Ethylene regulates arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *The Plant cell* 2003, **15**(12):2816-2825.
- 71. Fu X, Harberd NP: Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 2003, **421**(6924):740-743.
- 72. Zentella R, Zhang ZL, Park M, Thomas SG, Endo A, Murase K, Fleet CM, Jikumaru Y, Nambara E, Kamiya Y *et al*: **Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis**. *The Plant cell* 2007, **19**(10):3037-3057.
- 73. Hayashi K-i, Kawaide H, Notomi M, Sakigi Y, Matsuo A, Nozaki H: Identification and functional analysis of bifunctional ent-kaurene synthase from the moss Physcomitrella patens. *FEBS letters* 2006, **580**(26):6175-6181.

- 74. Chen F, Tholl D, Bohlmann J, Pichersky E: The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal* 2011, 66(1):212-229.
- 75. Tomita K, Murayama T, Nakamura T: Effects of Auxin and Gibberellin on Elongation of Young Hyphae in Neurospora crassa. *Plant and Cell Physiology* 1984, 25(2):355-358.
- 76. Tudzynski B, Liu S, Kelly JM: Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: isolation and characterization of the Gibberella fujikuroi and Botrytis cinerea creA genes. *FEMS microbiology letters* 2000, **184**(1):9-15.
- 77. Haddad R, Milagre HMS, Catharino, RR, Eberlin, MN: Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry Combined with Thin-Layer Chromatography. *Anal. Chem.* 2008, **80**, 2744-2750