

**GLEIDSON SILVA TEIXEIRA**

**“ANÁLISE INTEGRADA DO PAPEL DOS  
HORMÔNIOS VEGETAIS DURANTE A PROGRESSÃO DA  
VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAU”**

**CAMPINAS  
2012**

**GLEIDSON SILVA TEIXEIRA**

**“ANÁLISE INTEGRADA DO PAPEL DOS  
HORMÔNIOS VEGETAIS DURANTE A PROGRESSÃO DA  
VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAU”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
GLEIDSON SILVA TEIXEIRA  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira  
Co-orientadora: Dra. Maria Carolina Scatolin do Rio

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

T235a Teixeira, Gleidson Silva, 1984-  
Análise integrada do papel dos hormônios vegetais durante a progressão da vassoura-de-bruxa do cacau / Gleidson Silva Teixeira. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Vassoura-de-bruxa (Fitopatologia). 2. Cacaueiro.  
3. *Moniliophthora perniciosa*. 4. Hormônios vegetais.  
5. Citocininas. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Integrated analysis of plant hormones role during witches' broom progression in cocoa

**Palavras-chave em Inglês:**

Witche's broom

Cacao

*Moniliophthora perniciosa*

Plant hormones

Cytokinins

**Área de concentração:** Genética de Microorganismos

**Titulação:** Doutor em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Gonçalo Amarante Guimarães Pereira [Orientador]

Maria Helena de Souza Goldman

Carlos Augusto Colombo

Celso Eduardo Benedetti

Renato Vicentini dos Santos

**Data da defesa:** 28-11-2012

**Programa de Pós Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 28 de novembro de 2012.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira  
(Orientador)



---

Assinatura

Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman



---

Assinatura

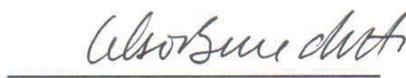
Dr. Carlos Augusto Colombo



---

Assinatura

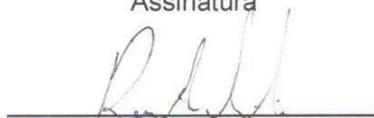
Dr. Celso Eduardo Benedetti



---

Assinatura

Dr. Renato Vicentini dos Santos



---

Assinatura

Profa. Dra. Gisele Monteiro

---

Assinatura

Dra. Luciana LasryBenchimol

---

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Arruda

---

Assinatura

**Aos meus pais, Silvestre e Maria das  
Graças e aos meus irmãos, Lelei e Kennia,  
dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao Projeto Vassoura-de-bruxa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante os quatro anos de doutorado.

Ao professor Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira pela orientação, confiança, oportunidade e por incentivar o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Maria Carolina Scatolin do Rio pela co-orientação, amizade e apoio incondicional.

Aos membros da pré-banca, Dr. Renato Vicentini e Prof. Dr. Fábio Papes pelas valiosas sugestões e questionamentos.

A todos do Laboratório de Genômica e Expressão (LGE), pelo apoio e principalmente pela amizade.

À Mariana Ribeiro pelo carinho e companheirismo.

A todos da minha família, especialmente aos meus pais, pelo incentivo e amor e, principalmente, por idealizarem comigo a conquista deste sonho.

## SUMÁRIO

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIações .....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xii
RESUMO.....	13
ABSTRACT .....	14
INTRODUÇÃO AO MODELO DE ESTUDO .....	15
Generalidades do cacau e impactos gerados pela Vassoura-de-bruxa .....	15
O ciclo de vida do patógeno e os sintomas da Vassoura-de-bruxa.....	17
Estado da arte do Projeto Genoma Vassoura-de-bruxa .....	18
I.  CAPÍTULO 1:.....	21
Análise global da expressão de genes relacionados a hormônios em cacau	
1.  INTRODUÇÃO .....	22
1.1.  Papel dos hormônios no desenvolvimento vegetal.....	22
1.2.  Controle do desenvolvimento do meristema vegetativo apical .....	22
1.3.  A interação hormonal controla a resposta de defesa a diferentes patógenos .....	23
2.  OBJETIVOS .....	26
2.1.  Objetivo geral .....	26
2.2.  Objetivos específicos.....	26
3.  MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1.  Sequências genômicas utilizadas como referência neste trabalho.....	27
3.2.  Manutenção do fungo <i>M. pernicioso</i> <i>in vitro</i> .....	27
3.2.1.  Manutenção da fase necrotrófica .....	27
3.2.2.  Obtenção de basidiósporos .....	28
3.2.3.  Manutenção da fase biotrófica .....	29
3.3.  Adequação das condições para o cultivo de <i>T. cacao</i> em casa de vegetação .....	29
3.4.  Cultivo e inoculação de plântulas de <i>T. cacao</i> para experimentos <i>in vivo</i> .....	30
3.5.  Desenho experimental para o sequenciamento do transcriptoma da interação .....	31
3.6.  Extração de RNA total de <i>T. cacao</i> para o sequenciamento .....	33
3.7.  Transcriptoma: análise de qualidade do RNA e sequenciamento .....	33
3.8.  Transcriptoma: montagem e identificação de genes diferencialmente expressos .....	34
3.9.  Análise de enriquecimento de termos do <i>Gene Ontology</i> .....	35
4.  RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1.  Transcriptoma do desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa.....	37
4.2.  Resposta a defesa é o processo biológico mais representado na Vassoura-de-bruxa ..	40
4.3.  A homeostase de auxinas pode estar alterada durante a fase inicial .....	43
4.4.  O cacau manifesta uma resposta de defesa tardia durante a fase avançada .....	53
4.5.  A indução de CKXs sugere uma resposta ao acúmulo de citocininas .....	55

II. CAPÍTULO 2: .....	57
Análise da expressão de genes relacionados a citocininas em <i>T. cacao</i> e em <i>M. perniciosa</i>	
1. INTRODUÇÃO .....	58
2. OBJETIVOS .....	61
2.1. Objetivo geral .....	61
2.2. Objetivos específicos .....	61
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	62
3.1. Análise microscópica da vassoura verde .....	62
3.2. Vetores de expressão utilizados neste trabalho: p423-TEF e p425-GPD .....	63
3.3. Meios auxotróficos para o cultivo da linhagem TM182 <i>sln1Δ</i> e derivadas .....	64
3.4. Sistema utilizando leveduras para estudo de genes relacionados a citocininas .....	65
3.5. Caracterização <i>in silico</i> de genes similares a <i>IPT</i> em <i>M. perniciosa</i> .....	67
3.6. Tese preliminar para a síntese de citocininas pelo fungo <i>M. perniciosa</i> .....	68
3.7. Extração de RNA total de <i>M. perniciosa</i> para amplificação do gene <i>MpIPT</i> .....	68
3.8. Síntese de cDNA para amplificação e clonagem do gene <i>MpIPT</i> .....	68
3.9. Amplificação do gene <i>MpIPT</i> para clonagem no vetor de expressão p423-TEF .....	69
3.10. Clonagem do gene <i>MpIPT</i> no vetor de expressão p423-TEF .....	69
3.11. Transformação da levedura TM182 <i>sln1Δ AtCRE1</i> com o gene <i>MpIPT</i> .....	70
3.12. Teste de complementação do gene <i>MpIPT</i> .....	71
3.13. Caracterização <i>in silico</i> de proteínas do sistema <i>two-component</i> em <i>T. cacao</i> .....	71
3.14. Extração de RNA e síntese de cDNA para amplificação dos receptores de CKs .....	72
3.15. Amplificação dos receptores de citocininas para clonagem no vetor p425-GPD .....	72
3.16. Clonagem dos receptores de citocininas no vetor p425-GPD .....	73
3.17. Procedimentos para transformação de bactérias .....	75
3.18. Extração de plasmídeos por lise alcalina .....	75
3.19. Sequenciamento do gene <i>MpIPT</i> e dos receptores de citocininas de <i>T. cacao</i> .....	76
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	78
4.1. O intumescimento da vassoura verde é determinado pelo tecido vascular .....	78
4.2. <i>M. perniciosa</i> possui um gene similar a <i>IPT</i> .....	80
4.3. A arquitetura do sistema <i>two-component</i> em cacau é similar a de <i>Arabidopsis sp.</i> .....	84
4.4. Amplificação dos receptores de citocininas e clonagem no vetor p425-GPD .....	96
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	98
ANEXOS .....	105

## LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIações

ABA: ácido abiscísico

AS: ácido salicílico

AUX: auxinas

CKs: citocininas

DAI: dias após a inoculação

ET: etileno

FDR: *fa*lse *d*iscovery *r*ate

GA: ácido giberélico

GO: Gene Ontology

HAI: horas após a inoculação

HK: histidina guinase

HPt: proteínas com atividade fosfo-transferase

HR: resposta hipersensitiva

IAA: *i*ndole-3-acetic acid

*I*PTs: ATP/ADP isopentenil transferases

JA: jasmonato

LGE: Laboratório de Genômica e Expressão

PGVB: Projeto Genoma Vassoura-de-bruxa

PR1: *p*athogenesis-related

RPKM: *r*eads *p*er *k*ilobase *p*er *m*illion mapped reads

RR: regulador de resposta

*t*RNA-*I*PTs: isopentenil transferases (IPTs) dependente de tRNA

VB: Vassoura-de-bruxa

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO AO MODELO DE ESTUDO

Figura 1: Aspectos gerais do cacaueteiro ( <i>Theobroma cacao</i> L.).....	15
Figura 2: Sintomas da doença Vassoura-de-bruxa e as fases do ciclo de vida do fungo <i>M. pernicioso</i> .....	17

### Capítulo I:

Figura I-1: Interações entre as vias de sinalização hormonal relacionadas aos mecanismos de resistência durante a interação planta-patógeno .....	24
Figura I-2: Metodologia utilizada para obtenção de basidiósporos do fungo <i>M. pernicioso</i> .....	29
Figura I-3: Cultivo e procedimentos para inoculação de plântulas de <i>T. cacao</i> com basidiósporos de <i>M. pernicioso</i> .....	31
Figura I-4: Plântulas dos grupos controle e infectado coletadas durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.....	32
Figura I-5: Plântulas de <i>T. cacao</i> analisadas durante as fases inicial e avançada da Vassoura-de-Bruxa.....	37
Figura I-6: Porcentagem de transcritos do fungo detectada durante a progressão da doença. .	39
Figura I-7: Análise de enriquecimento de termos do <i>Gene Ontology</i> (GO). .....	41
Figura I-8: Enriquecimento de termos do <i>Gene Ontology</i> (GO) relacionados a hormônios.....	43
Figura I-9: Perfil da expressão (RPKM) dos genes relacionados a auxinas durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.....	45
Figura I-10: Perfil da expressão (RPKM) do gene <i>PR1</i> durante a progressão da Vassoura-de-bruxa .....	46
Figura I-11: Perfil da expressão (RPKM) do gene <i>ABI2</i> durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. ....	47
Figura I-12: Perfil da expressão (RPKM) de genes relacionados à etileno durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.....	49

Figura I-13: Perfil da expressão (RPKM) de genes <i>PRD</i> durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. ....	50
Figura I-14: Perfil da expressão (RPKM) de genes relacionado a ácido salicílico durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.....	52
Figura I-15: Perfil da expressão (RPKM) de genes relacionados à ácido salicílico e jasmonato durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.....	54
Figura I-16: Perfil da expressão (RPKM) de genes relacionados à degradação de citocininas durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.....	55

## Capítulo II:

Figura II-1: Estrutura das diferentes citocininas.....	58
Figura II-2: Modelo para via de sinalização de citocininas em <i>Arabidopsis sp.</i> ....	59
Figura II-3: Sintomas da vassoura verde em <i>T. cacao</i> .....	60
Figura II-4: Representação esquemática da estrutura dos vetores de expressão p423-TEF e p425-GPD.. ....	63
Figura II-5: Linhagem TM182 <i>sln1Δ</i> .. ....	66
Figura II-6: Linhagem TM182 <i>sln1Δ AtCRE1</i> . ....	66
Figura II-7: Linhagem TM182 <i>sln1Δ AtCRE1 IPT</i> . ....	67
Figura II-8: Análises realizadas para caracterizar <i>in silico</i> o sistema <i>two-component</i> em <i>T. cacao</i> . ....	71
Figura II-9: Método utilizado para clonar os receptores de citocininas no vetor p425-GPD. ....	74
Figura II-10: Secções transversais da base de caules de plântulas de <i>T. cacao</i> sadio e infectado por <i>M. perniciosa</i> aos 45 dias após inoculação (DAI). ....	79
Figura II-11: Detalhe do câmbio vascular em plântulas de <i>T. cacao</i> sadias e infectadas por <i>M. perniciosa</i> .....	80
Figura II-12: Representação esquemática do gene <i>MpIPT</i> . ....	81
Figura II-13: Co-cultivo de <i>M. perniciosa</i> e TM182 <i>sln1Δ AtCRE1</i> . ....	82
Figura II-14: Amplificação e clonagem do gene <i>MpIPT</i> .. ....	83

Figura II-15: Teste funcional do gene <i>MpIPT</i> para síntese de citocininas. ....	83
Figura II-16: Representação esquemática da estrutura primária das proteínas do sistema <i>two-component</i> em <i>T. cacao</i> .....	85
Figura II-17: Alinhamento das proteínas <i>Histidine Kinase</i> (HKs) identificadas em <i>T. cacao</i> . ....	86
Figura II-18: Alinhamento das proteínas com atividade fosfo-transferase (Hpt) identificadas em <i>T. cacao</i> .....	88
Figura II-19: Alinhamento das proteínas reguladoras de resposta (RRs) identificadas em <i>T. cacao</i> .....	89
Figura II-20: Perfil da expressão (RPKM) dos receptores de citocinina em <i>T. cacao</i> ( <i>TcHKs</i> ) durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.....	91
Figura II-21: Perfil da expressão (RPKM) dos genes <i>TcHPs</i> durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. ....	92
Figura II-22: Perfil da expressão (RPKM) dos Reguladores de Resposta do tipo A em <i>T. cacao</i> ( <i>TcRRAs</i> ) durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.....	93
Figura II-23: Perfil da expressão (RPKM) dos Reguladores de Resposta do tipo B em <i>T. cacao</i> ( <i>TcRRBs</i> ) durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.....	94
Figura II-24: Amplificação e clonagem dos receptores de citocininas. ....	96

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I:

Tabela I-1: Número de plântulas coletadas para o sequenciamento do transcriptoma da interação entre <i>T. cacao</i> e <i>M. pernicioso</i> . .....	32
Tabela I-2: Número de sequenciamentos do transcriptoma realizados para cada ponto amostrado durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.....	34
Tabela I-3: Número de amostras sequenciadas durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. Total de <i>reads</i> sequenciados e número de genes expressos em cacau. ....	38

### Capítulo II:

Tabela II-1: Meios de cultura definidos utilizados nos ensaios com a levedura TM182 <i>sln1Δ</i> e derivadas.....	65
Tabela II-2: <i>Primers</i> utilizados na amplificação dos genes preditos como possíveis receptores de citocininas em <i>T. cacao</i> . .....	73
Tabela II-3: <i>Primers</i> utilizados no sequenciamento do gene <i>MpIPT</i> e dos receptores de citocininas identificados em <i>T. cacao</i> . .....	77
Tabela II-4: Teste de complementação do gene <i>MpIPT</i> utilizando meio de cultura suplementado com sobrenadante de culturas biotróficas.....	82
Tabela II-5: Proteínas similares a histidina quinases (HKs) identificadas em <i>T. cacao</i> . ....	87
Tabela II-6: Proteínas com atividade fosfo-transferase (Hpt) identificadas em <i>T. cacao</i> . .....	88
Tabela II-7: Reguladores de resposta (RRs) identificados em <i>T. cacao</i> . .....	90

## RESUMO

A Vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa*, é uma das principais doenças que acometem o cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). Durante a fase biotrófica, o patógeno coloniza o espaço intercelular e estimula a formação de ramos hipertróficos denominados vassoura verde. No estágio avançado da doença, o fungo passa a colonizar também o interior das células e observa-se a morte do tecido originando a vassoura seca. A semelhança destes sintomas aos observados em outras fitopatologias sugere um desequilíbrio hormonal em resposta à infecção. Neste contexto, este trabalho apresenta um estudo integrado dos genes relacionados a diferentes hormônios vegetais e uma caracterização dos genes relacionados às citocininas. A possível participação dos hormônios no estabelecimento e na progressão da Vassoura-de-bruxa do cacauzeiro é discutida. Dados de RNA-seq foram gerados durante as diferentes fases da interação. Em seguida, genes diferencialmente expressos foram classificados de acordo com a terminologia do *Gene Ontology*. Além disso, a capacidade de biossíntese de citocininas pelo fungo *M. perniciosa* foi avaliada através do teste de complementação utilizando a levedura TM128 *sln1Δ*. Em paralelo, foi realizada uma caracterização detalhada dos genes que constituem o mecanismo de percepção de citocininas em cacau, sistema denominado *two-component*. Genes relacionados às respostas hormonais e de defesa foram os mais representados entre o grupo de diferencialmente expressos. Durante a fase assintomática, é observada a indução de genes relacionados a auxinas e etileno. Por outro lado, no estágio avançado, foram identificados genes relacionados à degradação de citocininas e às respostas de defesa mediadas por ácido salicílico e jasmonato/etileno. Paralelamente, foi identificado no *M. perniciosa* um gene para a síntese de citocininas, entretanto, a funcionalidade deste não foi confirmada. Em *T. cacao*, a arquitetura do sistema *two-component* é similar à encontrada em *Arabidopsis sp.*, porém, nenhuma alteração significativa na expressão dos genes que constituem este sistema foi identificada. Por essa razão, não foi possível estabelecer uma relação clara entre as citocininas e os sintomas da Vassoura-de-bruxa. Contudo, o padrão de expressão de genes relacionados à homeostase de auxinas, sugere uma regulação negativa das respostas de defesa contra patógenos biotróficos durante fase inicial da doença.

## ABSTRACT

The Witches' Broom disease, caused by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*, is the major disease affecting cacao (*Theobroma cacao* L.). During its biotrophic phase, the pathogen colonizes the intercellular space and stimulates the formation of hypertrophic branches called green broom. In the advanced stage of the disease, the fungus starts also to colonize the interior of the cells and it is noted the death of tissue originating the dry broom. The similarity of these symptoms to those observed in other plant diseases suggests a hormonal imbalance in response to the infection. In this context, this work presents an integrated study of plant hormone-related genes and a characterization of cytokinin-related genes. The possible participation of these genes in the establishment and progression of Witches' Broom in cacao is discussed. RNA-seq data regarding different phases of the interaction were generated. After this, differentially expressed genes were classified according to Gene Ontology terminology. Furthermore, the ability of cytokinin biosynthesis by *M. perniciosa* was assessed by a complementation test using the yeast TM128 *sln1Δ*. In parallel, we performed a detailed characterization of genes that constitute the mechanism of perception of cytokinins in cacao, the two-component system. For these, the gene expression values have been accessed through the previously generated RNA-seq data. Defense and hormone-related genes were the most represented among the differentially expressed genes. During asymptomatic phase, we observe the induction of auxin and ethylene-related genes. During the symptomatic stage, genes related to the degradation of cytokinins and defense responses mediated by salicylic acid and jasmonate/ethylene were identified. Simultaneously, a putative gene for the synthesis of cytokinins was identified in *M. perniciosa* genome; however, the participation of this gene in cytokinin synthesis was not confirmed. In *T. cocoa*, the architecture of two-component system is similar to that one found in *Arabidopsis sp.*; however, no significant change in the expression of genes that constitute this system was identified. For this reason, it was not possible to establish a clear relationship between cytokinins and the symptoms of the Witches' Broom disease. Moreover, the expression pattern of homeostasis auxin-related genes suggests a negative regulation of defense responses against biotrophic pathogens during the initial stage of the disease.

## INTRODUÇÃO AO MODELO DE ESTUDO

### Generalidades do cacaeiro e impactos gerados pela Vassoura-de-bruxa

O cacaeiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta pertencente à família Malvaceae e possui como centro de diversidade genética a bacia Amazônica. É originalmente cultivado em regiões de mata atlântica sob a sombra das árvores mais altas, um sistema agroflorestal denominado Cabruca<sup>1</sup>. Este é um organismo diplóide e possui 20 cromossomos<sup>1</sup>. Seu fruto, o cacau, possui em média 30 a 50 sementes ou amêndoas, utilizadas quase que exclusivamente para a produção de chocolate. Os frutos se desenvolvem a partir da polinização de flores que ocorrem como almofadas florais sobre o caule principal e ramos maiores<sup>2</sup> (Figura 1).



**Figura 1: Aspectos gerais do cacaeiro (*Theobroma cacao* L.).** A: Detalhe da copa de árvores de cacau. B: Cacaeiro extremamente produtivo contendo diversos frutos. C: Almofadas florais. D: Detalhe de um fruto maduro.

Com base em suas origens geográficas e morfologias, o cacau é dividido, tradicionalmente, em três grupos genéticos: Criollo, Forastero e Trinitário, sendo este último, resultante do cruzamento entre “Criollo” e “Forastero”<sup>3</sup>. Entretanto, uma nova classificação tem sido discutida. Com base na genotipagem de 1241 variedades de cacau, realizada através da análise de 106 marcadores moleculares (microsatélites), Motamayor e colaboradores<sup>4</sup>

propuseram uma divisão em dez grupos genéticos: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional e Guiana. De acordo com os autores, esta nova classificação reflete uma diversidade genética mais precisa do que a tradicional proposta em 1944<sup>3</sup>.

O cacau é considerado uma das mais importantes culturas tropicais. Como exemplo, em 2001 o mercado mundial de chocolate movimentou 73 bilhões de dólares<sup>5</sup>. Porém, doenças que acometem o cacaueiro chegam a provocar perdas de até 30% na produção mundial, por causarem uma considerável redução na produção de frutos e na qualidade das amêndoas<sup>6</sup>. Entre elas, destaca-se a Vassoura-de-bruxa (VB).

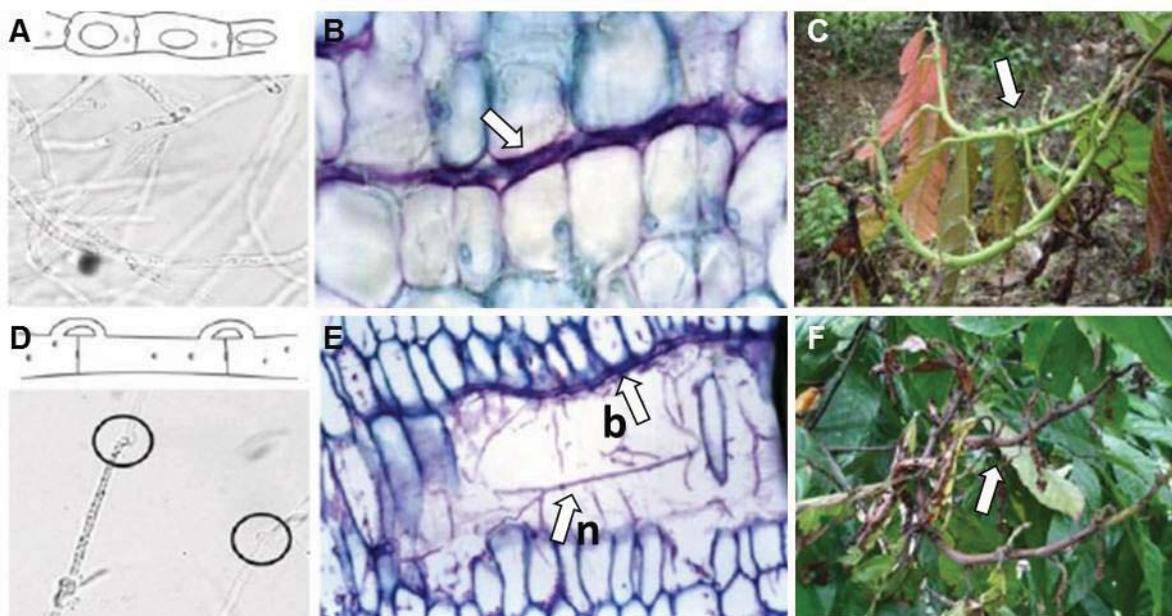
O maior exemplo da magnitude do impacto causado pela VB é a crise da cacauicultura brasileira, iniciada na década de 90. No início daquela década, o Brasil era o principal produtor de cacau das Américas e líder na exportação de cacau inteiro e seus derivados (pasta, manteiga e cacau em pó)<sup>2</sup>. Entretanto, o cultivo brasileiro foi fortemente prejudicado pela introdução da Vassoura-de-bruxa na região sul da Bahia, principal região produtora. A partir de então, a cacauicultura registrou uma queda de aproximadamente 45% em menos de dez anos, diminuindo significativamente a participação do Brasil no mercado mundial de cacau. Com a crise estabelecida, a produção brasileira tornou-se insuficiente para suprir a demanda interna, prejudicando o fornecimento de amêndoas para várias empresas produtoras de chocolate concentradas principalmente no estado de São Paulo, e tornando o país, pela primeira vez, um importador dessa matéria prima.

A crise da cacauicultura também gerou impactos sociais e ambientais, que repercutem até os dias atuais. Somente no sul da Bahia, milhares de pessoas dependem direta ou indiretamente da cacauicultura como fonte de renda, por essa razão, o abandono sistemático de fazendas tomadas pela doença, levaram a um pronunciado êxodo rural e a altos índices de desemprego nas cidades da região (Ilhéus e Itabuna). Impactos ambientais são causados pela

substituição de lavouras por culturas como café e pastagens, que levam ao desmatamento do restante de mata atlântica, até então preservada para o sombreamento empregado no cultivo do cacau.

### O ciclo de vida do patógeno e os sintomas da Vassoura-de-bruxa

A Vassoura-de-bruxa é causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (= *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer)<sup>7</sup>. Este é um basidiomiceto que exibe um ciclo de vida hemibiotrófico, possuindo duas fases de vida distintas: i) a fase biotrófica é caracterizada por um micélio monocariótico e hifas intumescidas sem grampo de conexão (Figura 2a); ii) na fase necrotrófica, o micélio é dicariótico e formado por hifas finas com grampos de conexão (Figura 2d)<sup>8,9</sup>.



**Figura 2: Sintomas da doença Vassoura-de-bruxa e as fases do ciclo de vida do fungo *M. perniciosa*.** A: Hifas do fungo na fase biotrófica *in vitro*. B: Hifa biotrófica colonizando o espaço intercelular de entre células vivas. C: Vassoura verde. D: Hifas do fungo na fase necrotrófica *in vitro*. E: Hifas biotróficas (b) e necrotróficas (n) colonizando o tecido morto. F: Vassoura seca.

Por meio dos basidiósporos, este patógeno possui a habilidade de infectar tecidos meristemáticos em atividade como, por exemplo, lançamentos foliares, almofadas florais e

frutos em desenvolvimento<sup>8,10</sup>. Tipicamente, a infecção de lançamentos foliares inicia-se quando os basidiósporos de *M. perniciosa* germinam sobre o meristema vegetativo. Estes produzem um tubo de germinação que penetra o tecido a partir de aberturas estomáticas. Após a germinação, hifas biotróficas são encontradas colonizando o espaço intercelular do tecido. Nesta fase da doença, observa-se que as células do tecido infectado permanecem vivas (Figura 2b) e não há sinais de respostas de defesa como, por exemplo, resposta hipersensitiva (HR). O ramo infectado perde a dominância apical e cresce de forma desorganizada e excessiva, formando uma estrutura intumescida conhecida como vassoura verde (Figura 2c). Esta parece atuar como um dreno de nutrientes, comprometendo significativamente a produção de frutos<sup>8</sup>.

Posteriormente, as vassouras verdes começam a apresentar necrose a partir das extremidades das folhas e dos meristemas vegetativos. Com o passar do tempo, todo ramo é necrosado e, então, denominado vassoura seca (Figura 2f). Por razões ainda não compreendidas, durante a transição dos sintomas o fungo muda da fase biotrófica para a fase necrotrófica. Nessa fase da doença, o tecido infectado apresenta células mortas com paredes celulares degradadas. Hifas biotróficas e necrotróficas são encontradas em ambos os espaços inter e intracelular (Figura 2e)<sup>8</sup>. Em ramos completamente necrosados, surgem basidiocarpos que, por sua vez, produzem novos esporos reiniciando o ciclo da doença.

### **Estado da arte do Projeto Genoma Vassoura-de-bruxa**

Para auxiliar na compreensão da complexidade desta doença, o Laboratório de Genômica e Expressão (LGE) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) iniciou em 2001 o Projeto Genoma Vassoura-de-bruxa (PGVB) ([www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura](http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura)), com o objetivo de sequenciar o genoma do fungo *M. perniciosa*. O PGVB permitiu a identificação de diversos genes potencialmente importantes para a patogenicidade e, a partir destes, diversos pesquisadores do LGE têm se dedicado a compreender os eventos genéticos e bioquímicos relacionados a esta fitopatologia.

Entre as análises já concluídas destacam-se: i) a avaliação das alterações bioquímicas de plântulas de cacau provocadas pela infecção<sup>11</sup>; a confirmação da produção de cristais de oxalato *in vitro* pelo fungo *M. perniciosus*<sup>12</sup>; ii) a caracterização de proteínas de necrose produzidas pelo patógeno<sup>13,14</sup>; iii) a identificação de genes diferencialmente expressos entre as duas fases de seu ciclo de vida<sup>15</sup>; iv) o sequenciamento, montagem e análise funcional do genoma de *M. perniciosus*<sup>16,17</sup>. Recentemente, a função de um gene codificante para uma Oxidase Alternativa (AOX) foi demonstrada, sugerindo o papel desta como um fator de patogenicidade<sup>18</sup>; foi caracterizada, também, uma família gênica similar a *PR1* (*p*athogenesis-*r*elated) de plantas, possivelmente relacionada a um mecanismo de supressão das respostas de defesa do cacau durante a interação planta-patógeno<sup>19</sup>. Além disso, um modelo foi proposto para o metabolismo de metanol, envolvendo a atividade de uma Metanol oxidase extracelular (MOX) e a de-esterificação de pectinas da parede celular primária do cacau<sup>20</sup>.

Atualmente, estão em andamento trabalhos dedicados à compreensão de vários aspectos da interação planta-patógeno, incluindo: i) compreensão do metabolismo de carbono e nitrogênio na interação; ii) o estudo do metabolismo oxidativo e peroxissomal do fungo; iii) a caracterização de enzimas que degradam a parede celular. Além disso, o grupo iniciou em 2009 o projeto de construção de um “Atlas Transcriptômico” da Vassoura-de-bruxa, composto por dados de sequenciamento do transcriptoma do patógeno e do cacau durante a interação.

Devido à semelhança dos sintomas da VB aos fenótipos causados pelo desequilíbrio hormonal observado em outras fitopatologias, o grupo de pesquisa também se dedica a compreender as possíveis alterações hormonais causadas em resposta à infecção pelo patógeno, bem como, a capacidade deste de produzir hormônios vegetais. Recentemente, foi demonstrado que o fungo *M. perniciosus* possui a habilidade de produzir IAA\* (*i*ndole-3-*a*cetic *a*cid), o membro mais importante da família das auxinas, reforçando a hipótese de um

---

\*Dados gerados por Javier C. Alvaréz, aluno de doutorado do LGE e membro do grupo pesquisa da Vassoura-de-bruxa (manuscrito em preparação).

desequilíbrio hormonal nesta fitopatologia e, ampliando as possibilidades de IAA e outros hormônios estarem direta ou indiretamente relacionados aos sintomas observados. Neste contexto, este trabalho apresenta um estudo integrado dos genes relacionados a diferentes hormônios vegetais e, especialmente, uma caracterização dos genes relacionados às citocininas, discutindo a possível participação destes no estabelecimento e na progressão da Vassoura-de-bruxa do cacauero.

I. CAPÍTULO 1:

**Análise global da expressão de genes relacionados a  
hormônios em cacau**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Papel dos hormônios no desenvolvimento vegetal

Os hormônios vegetais constituem um grupo de pequenas moléculas não relacionadas. Coletivamente atuam em todos os aspectos da vida das plantas, regulando o desenvolvimento e integrando uma infinidade de estímulos ambientais ao programa genético de cada célula. Auxinas (AUX), ácido abiscísico (ABA), citocininas (CKs), ácido giberélico (GA) e etileno (ET) são exemplos de hormônios vegetais clássicos, identificados na primeira metade do século XX. Mais recentemente, brassinosteróides (BR), jasmonato (JA), ácido salicílico (AS), óxido nítrico (ON) e estrigolactonas (EG) foram incluídos a este grupo<sup>21,22</sup>.

Geralmente é considerado que os hormônios vegetais desencadeiam diferentes papéis regulatórios, porém, é importante considerar que diferentes hormônios podem atuar juntos na modulação do mesmo processo biológico. Tal interação pode ocorrer em pelo menos três níveis. A interação em nível de expressão gênica, por exemplo, pode ser representada por sobreposições entre vias de sinalização, onde as vias de biossíntese ou sinalização de dois ou mais hormônios compartilham genes ou fatores de transcrição<sup>23</sup>. Diferentes hormônios também podem regular um processo comum compartilhando uma rede regulatória interconectada pela interação proteína-proteína, e não necessariamente pelos mesmos genes<sup>24</sup>. Existe ainda a possibilidade de regulação em nível metabólico, onde um hormônio regula o metabolismo e a concentração de outro. Neste caso, a complexa rede de interação sugere efeitos em longo prazo que redefinem muitos sistemas dentro da planta<sup>25</sup>.

### 1.2. Controle do desenvolvimento do meristema vegetativo apical

Citocininas e auxinas são reconhecidas há muito tempo como moléculas sinalizadoras cruciais, que se interagem antagonicamente para controlar o desenvolvimento vegetal, sendo este um dos primeiros exemplos de interação hormonal. Em cultura de tecidos de tabaco, foi

demonstrado que o desenvolvimento do caule e da raiz dependem da proporção citocinina:auxina. Maiores concentrações de AUX ou de CKs estimulam a formação da raiz ou do caule respectivamente. Em quantidades equivalentes o tecido cresce de forma desorganizada<sup>26</sup>.

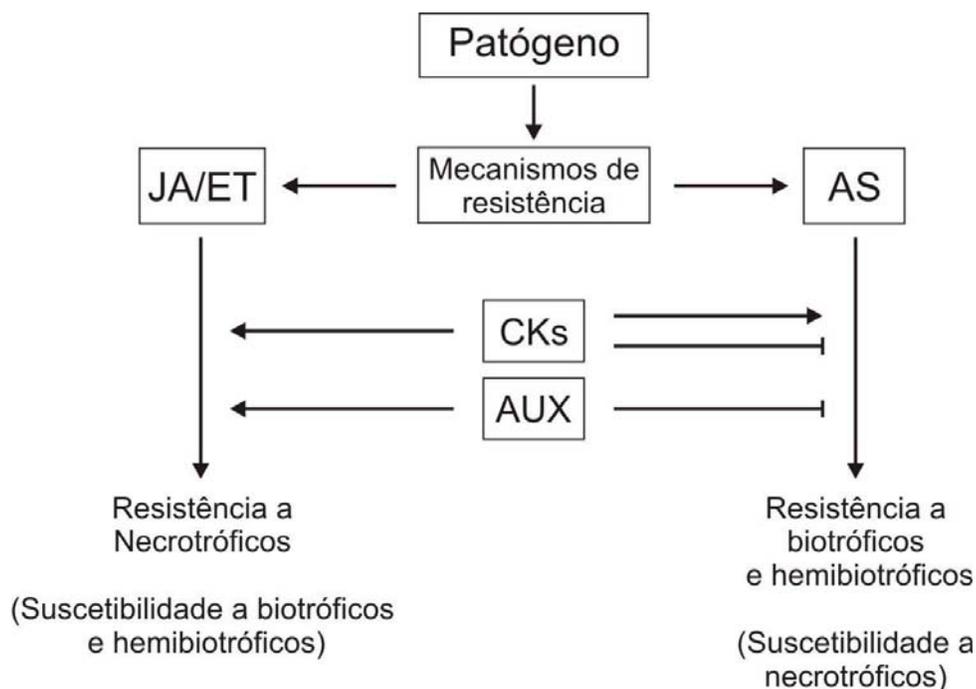
Evidências mais recentes demonstram a fundamental importância da interação AUX-CKs para o desenvolvimento do meristema vegetativo apical (MVA). Este é formado durante a embriogênese e dá origem a praticamente todas as partes aéreas da planta. Porém, é necessário uma regulação fina entre a atividade de divisão e de diferenciação celular para controlar o tamanho e a estrutura do meristema. Em relação ao controle da dominância apical, auxinas possuem um papel antagônico ao das citocininas, o acúmulo de AUX regula negativamente a biossíntese de CKs<sup>27,28</sup> e, conseqüentemente, a redução dos níveis de CKs inibi o brotamento de ramos laterais mantendo a dominância apical<sup>29,30</sup>.

Os mecanismos moleculares pelos quais os hormônios interagem dependem, frequentemente, da espécie e do órgão estudado, dificultando a elaboração de modelos gerais de interação<sup>31</sup>. No entanto, recentemente têm-se mostrado possível acessar a complexidade de problemas semelhantes utilizando uma abordagem de biologia de sistemas<sup>32,33</sup>, integrando em modelos preditivos, dados de transcriptoma, proteoma e metaboloma aliados a dados mais específicos como a cinética e atividades enzimáticas, estudo de genes reguladores centrais e identificação e quantificação de precursores, hormônios e metabólitos das vias envolvidas<sup>34-36</sup>.

### **1.3. A interação hormonal controla a resposta de defesa a diferentes patógenos**

Os hormônios também se interagem para ativar mecanismos de respostas contra patógenos. Diferentes interações podem induzir ou suprimir a imunidade a microorganismos patogênicos com diferentes estilos de vida. De forma clássica, AS ativa a defesa contra patógenos biotróficos e hemibiotróficos enquanto a combinação de JA e ET protegem a planta contra patógenos necrotróficos. As duas vias são antagônicas, de forma que a ativação da resposta contra fungos necrotróficos, por exemplo, favorece a suscetibilidade a patógenos biotróficos/

hemibiotróficos e vice-versa. Adicionalmente, auxina é antagonista à sinalização dependente de AS e, dessa forma, promove a patogenicidade de fungos biotróficos. AUX atua como regulador negativo da resposta de defesa dependente AS e induz a imunidade dependente de JA/ET (Figura I-1)<sup>37-39</sup>.



**Figura I-1: Interações entre as vias de sinalização hormonal relacionadas aos mecanismos de resistência durante a interação planta-patógeno.** JA: jasmonato. ET: etileno. CKs: citocinina. AUX: auxina. AS: ácido salicílico.  $\longrightarrow$ : interação positiva.  $\longleftarrow$ : interação negativa. Adaptado do modelo proposto por Robert-Seilaniantz e colaboradores<sup>37</sup>.

Da mesma forma que as auxinas, as citocininas induzem a resposta de defesa dependente de JA/ET, ativando a resistência do hospedeiro contra a infecção por patógenos necrotróficos e aumentando a suscetibilidade a biotróficos/hemibiotróficos<sup>37-39</sup> (Figura I-1). Muitos patógenos biotróficos induzem a formação de “ilhas verdes” ou a de-diferenciação de células infectadas em de estruturas semelhantes a galhas, estas possuem uma forte atividade de “dreno” de nutrientes sendo, dessa forma, indispensáveis para a patogenicidade. Em *Agrobacterium tumefaciens* ou *Rhodococcus fascian*, a de-diferenciação do tecido infectado é resultante do desbalanço na regulação do metabolismo deste hormônio, demonstrando que as citocininas

favorecem a suscetibilidade a patógenos biotróficos/hemibiotróficos<sup>40-42</sup> (Figura I-1). Entretanto, estudos recentes demonstram que altas concentrações de CKs podem ativar a resposta de defesa contra estes patógenos. Hwang e colaboradores<sup>43</sup> demonstraram que as CKs ativam a resposta de defesa em *Arabidopsis sp.* infectadas com *Pseudomonas syringae*. Neste sistema, CKs endógenas ativam a resposta de defesa dependente de AS, induzindo a expressão de efetores da resposta imune como: *PR1*, *SID2* (*SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2*) e *PAD4* (*PHYTOALEXIN DEFICIENT 4*) (Figura I-1). Independentemente, Argueso e colaboradores<sup>44</sup> demonstraram que as CKs induzem a imunidade contra *Hyaloperonospora arabidopsidis*, um patógeno obrigatoriamente biotrófico. De uma maneira dose-dependente, CKs elevam a resposta de defesa dependente de AS e impedem a progressão da doença neste modelo.

Os sintomas da Vassoura-de-bruxa há muito sugerem o envolvimento de hormônios vegetais. A perda da dominância apical, o crescimento desordenado e intumescimento do ramo infectado podem empiricamente ser atribuído a auxinas, citocininas e/ou giberelinas, levantando as seguintes questões: i) o estabelecimento e a progressão da Vassoura-de-bruxa estaria diretamente ligado a um desequilíbrio hormonal? ii) este desequilíbrio seria provocado direta ou indiretamente pelo patógeno? Neste contexto, este capítulo apresenta os resultados da análise global da expressão gênica do cacau, direcionada a compreender o papel de diferentes hormônios vegetais na interação entre *M. perniciosa* e *T. cacao*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Identificar, a nível transcricional, evidências que indiquem um desbalanço hormonal em cacau durante o estabelecimento e a progressão da Vassoura-de-bruxa.

### 2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer os procedimentos adequados para gerar e analisar dados de expressão gênica durante a fase assintomática e sintomática da Vassoura-de-bruxa;
- Gerar dados de sequenciamento do transcriptoma de plântulas de *T. cacao* saudáveis e infectadas por *M. pernicioso*;
- Analisar a expressão de genes relacionados ao metabolismo e/ou sinalização de hormônios vegetais.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Sequências genômicas utilizadas como referência neste trabalho

A análise das sequências de genes do cacau e do fungo foram realizadas com base em dois bancos de dados: i) *Cacao Genome Database* (CGD) (<http://www.cacaogenomedb.org/>) e ii) *Witches' Broom Project* (WBP) (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>). O primeiro é constituído por dados obtidos através do sequenciamento do genoma do cacau, cujo projeto foi coordenado pela empresa Mars Incorporated. Neste projeto, foi sequenciado o genótipo Matina 1-6 que, por sua vez, é altamente homozigoto e predominante em produções de diversos países. Além disso, este possui uma alta similaridade com a variedade comum (tipo Catongo) utilizada neste trabalho (seção 3.4; página 30). O segundo banco de dados é constituído por dados obtidos através do sequenciamento genômico do fungo *M. pernicioso*, linhagem CP02. Iniciado em 2000, o projeto é coordenado pelo LGE. Um *draft* dos resultados obtidos foi publicado em 2008<sup>16</sup>.

Dados do CGD e do WBP foram utilizados independentemente na montagem do transcriptoma da Vassoura-de-bruxa (seção 3.8; página 34). Em análises mais específicas, os dados do CGD foram utilizados para caracterizar o sistema *two-component* em *T. cacao* (seção 3.13; página 71), enquanto os dados do WBP foram utilizados para buscar genes similares a *IPT* em *M. pernicioso* (detalhe na seção 3.5; página 67).

#### 3.2. Manutenção do fungo *M. pernicioso* *in vitro*

Todos os experimentos que envolveram o cultivo de *M. pernicioso* foram realizados com a linhagem CP02. Diferentes procedimentos pré-estabelecidos no laboratório foram utilizados para obter basidiósporos e para manter as fases biotrófica e necrotrófica do patógeno.

##### 3.2.1. Manutenção da fase necrotrófica

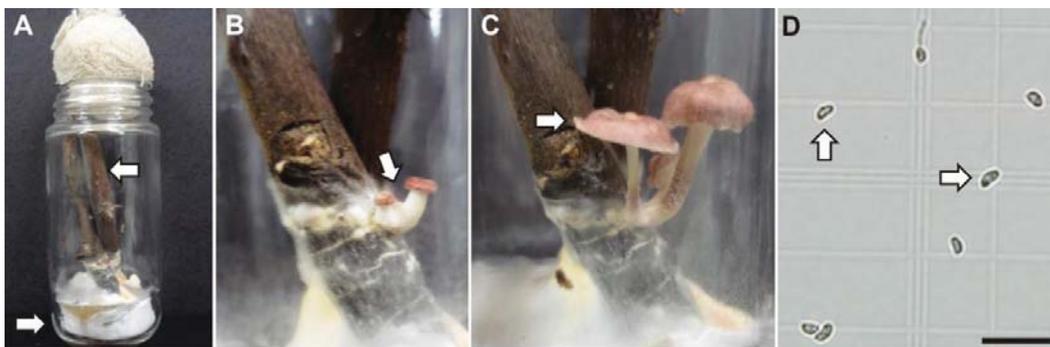
A fase necrotrófica é mantida constantemente a 28°C em placas de Petri contendo meio de cultura "*Malt light*" (20 g/L extrato de malte; g/L extrato de levedura; 20g/L ágar). Quando

necessário, culturas líquidas ou placas foram inoculadas com *plugs* de *Malt Light* contendo hifas necrotróficas.

### 3.2.2. Obtenção de basidiósporos

Os esporos foram coletados a partir de cogumelos cultivados *in vitro*. Para isto, galhos secos de cacau com aproximadamente 10 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro foram colocados em frascos de vidro contendo a base preenchida com aproximadamente 25mL de ágar-água (2% p/v) (Figura I-2a). Estes foram autoclavados e, durante este procedimento, os compostos presentes nos galhos são transferidos para a base de ágar-água, gerando um meio rico em nutrientes. Em seguida, a base de cada galho foi inoculada com *plugs* de meio *Malt light* contendo hifas necrotróficas. Para induzir a formação de cogumelos, os frascos foram mantidos em ambientes com variações na temperatura (25-30°C) e com alta taxa de humidade (rega diária dos galhos).

Primórdios de cogumelos foram observados aproximadamente 60 dias após inoculação (Figura I-2b). Estes foram destacados dos galhos após a abertura do píleo (chapéu) (Figura I-2c) e fixados na tampa de frascos do tipo *Becker* (5mL) contendo 500µL de solução de coleta (16% Glicerol; 0,01% *Tween* 20; 0,01M MES pH 6.0), apropriada para impedir a germinação e possibilitar o congelamento sem perda da viabilidade. O *Becker* foi mantido no escuro a 28° por 14-16 horas (*overnight*). Os esporos foram quantificados em câmara de Neubauer (Figura I-2d), congelados instantaneamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.



**Figura I-2: Metodologia utilizada para obtenção de basidiósporos do fungo *M. perniciosus*.** **A:** Método de cultivo de hifas do necrotroficas do fungo utilizando frascos contendo galhos de cacau em ágar-água (2% p/v). **B:** Primórdios de cogumelos de *M. perniciosus*. **C:** Cogumelo com píleo (chapéu) aberto, período ideal para coleta. **D:** Esporos do fungo *M. perniciosus* em câmara de Neubauer, observados em microscópio de luz. Escala=50µm.

### 3.2.3. Manutenção da fase biotrófica

Para obter culturas biotróficas foram utilizados os procedimentos previamente estabelecidos por Meinhardt e colaboradores<sup>45</sup>. Esporos devidamente coletados foram transferidos para o meio LMCpL+ (5g/L extrato de levedura; 50 ml/L glicerol; 5mg/L; 50mg/mL cafeína, 10 mg/L auxina; 2,5 g/L  $K_2HPO_4$ ; 1 ml/L elementos traços). As culturas foram mantidas em agitação (120 rpm) a 28°C por até 10 dias, quando já se observa a mudança de fase.

### 3.3. Adequação das condições para o cultivo de *T. cacao* em casa de vegetação

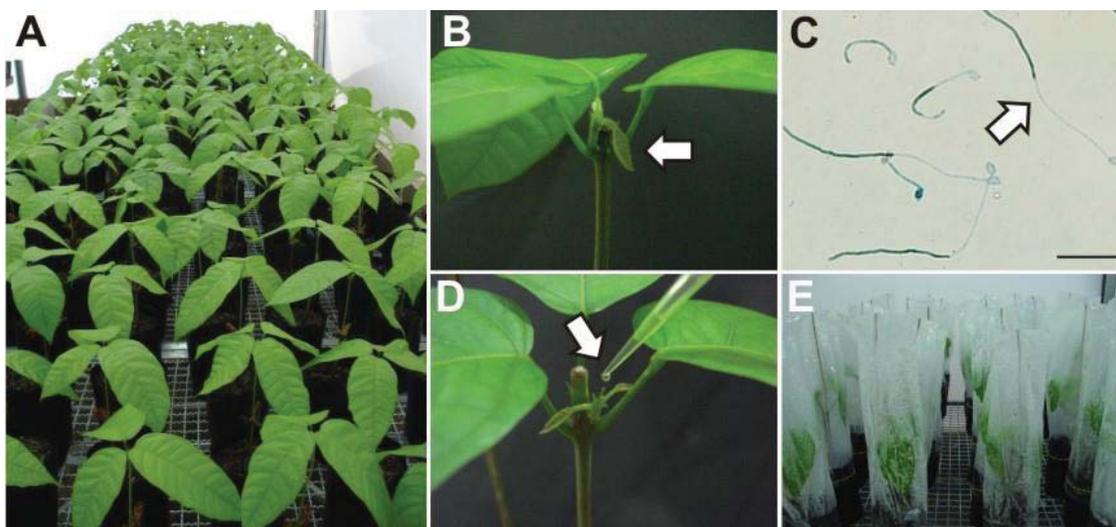
Uma série de cuidados foram tomados para se obter uma condição de cultivo adequada para plântulas de cacau. A hipersensibilidade a baixas temperaturas (<21°C) e ao excesso de luminosidade foi o principal problema encontrado. Estes fatores provocam queimaduras e queda das folhas, impossibilitando o cultivo dessa espécie em estufas convencionais. Para isso, laterais e teto da casa de vegetação foram revestidos com plástico e tela de sombreamento reduzindo a luminosidade interior para 20%. A temperatura interna foi monitorada periodicamente utilizando *Temprecord™ Reader Interface*. Com base nos dados coletados, aquecedores e equipamentos de refrigeração foram ajustados para manter a temperatura entre 25-30°C, evitando picos de altas

temperaturas durante o dia (45°C no verão) e de baixas temperaturas durante a noite (-10°C no inverno).

### **3.4. Cultivo e inoculação de plântulas de *T. cacao* para experimentos *in vivo***

Plântulas de *T. cacao* da variedade comum (tipo Catongo) foram obtidas a partir do plantio de sementes de frutos de uma mesma árvore. Catongo é uma variedade de cacau altamente homozigótica e seu *background* genético representa a maioria dos clones cultivados no Brasil.

Aproximadamente 250 plântulas foram mantidas em casa de vegetação em condições previamente estabelecidas (seção 3.3, página 29): temperatura entre 25-30°C, umidade acima de 50%, fotoperíodo de 12 horas e rega manual diária. 200 plântulas jovens (60 dias após a germinação) foram selecionadas e divididas igualmente em dois grupos: grupo controle e grupo infectado. Para induzir e sincronizar o brotamento de ramos laterais, as plântulas foram podadas mantendo sempre 3-4 folhas (Figura I-3a). Lançamento foliar com aproximadamente 0,5mm indica o ponto ideal para a inoculação (Figura I-3b). Plântulas do grupo infectado foram inoculadas com 20µL de suspensão de basidiósporos em uma concentração de  $1,7 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ , de acordo com os procedimentos propostos por Frias e colaboradores<sup>46</sup>. Plântulas do grupo controle foram inoculadas com 20µL de solução de coleta de esporos (Figura I-3c). Para garantir a utilização de esporos sempre viáveis, uma alíquota de basidiósporos foi utilizada para avaliar, em placa (ágar-água 2%; 5 horas a 28°C), a viabilidade dos mesmos (Figura I-3d). Para estimular a abertura de estômatos e aumentar a eficiência da infecção, as plântulas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas antes da inoculação e por 48 horas após (Figura I-3e). Normalmente a taxa de infecção obtida por estes procedimentos é maior que 60%.



**Figura I-3: Cultivo e procedimentos para inoculação de plântulas de *T. cacao* com basidiósporos de *M. pernicioso*.** **A:** Homogeneidade das plantas cultivadas em condições adequadas. As plântulas foram podadas para estimular e sincronizar o brotamento de ramos laterais. **B:** Ramo lateral contendo lançamento foliar com aproximadamente 5mm, ponto ideal para inoculação. **C:** Teste de viabilidade de esporos antes da inoculação. Esporos viáveis germinando em ágar-água 2% (p/v) após 5 horas. **D:** Inoculação do meristema com solução de esporos ou controle. **E:** Câmara úmida para estimular a abertura de estômatos. Escala=50µm. Método proposto por Frias e colaboradores<sup>46</sup>.

### 3.5. Desenho experimental para o sequenciamento do transcriptoma da interação

Ramos inoculados e respectivos controles foram coletados durante a progressão da doença. Duas fases de coleta foram previamente definidas: i) assintomática e ii) sintomática. 130 plântulas (40 controles e 90 do grupo infectado) foram coletadas em sete pontos definidos arbitrariamente para a primeira fase: 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (HAI); 4, 8 e 16 dias após a inoculação (DAI) (Tabela I-1). A coleta excessiva de amostras foi realizada com dois objetivos: i) padronização da extração de RNA de pequenas quantidades de tecido sadios e infectados (20-50mg de tecido) e; ii) aumentar a probabilidade de se obter pelo menos três amostras infectadas para cada ponto da fase assintomática.

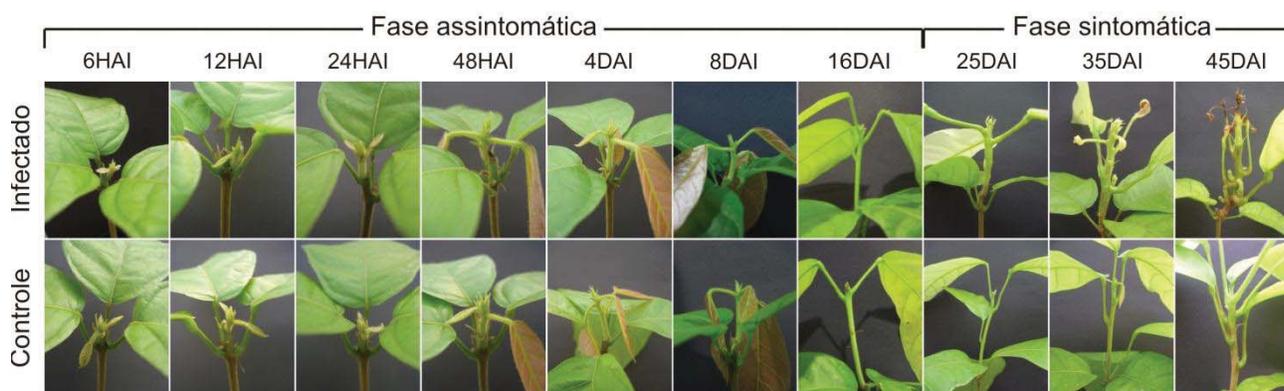
Durante a fase sintomática, 18 plântulas (9 controles e 9 do grupo infectado) foram coletadas 25, 35 e 45 DAI (Tabela I-1). Respectivamente, os pontos de coleta representam os sintomas: vassoura-verde, vassoura-verde com necrose distal das folhas e vassoura-verde com

necrose das folha e meristema vegetativo (Figura I-4). Todas as amostras foram congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a extração de RNA total.

**Tabela I-1:** Número de plântulas coletadas para o sequenciamento do transcriptoma da interação entre *T. cacao* e *M. perniciosa*.

Ponto de coleta	Grupo controle	Grupo Infectado	Subtotal
<b>Fase assintomática</b>			
6 HAI	6	14	20
12 HAI	6	14	20
24 HAI	6	14	20
48 HAI	6	14	20
4 DAI	6	14	20
8 DAI	6	14	20
16 DAI	4	6	10
<b>Subtotal</b>	<b>40</b>	<b>90</b>	<b>130</b>
<b>Fase sintomática</b>			
25 DAI	3	3	6
35 DAI	3	3	6
45 DAI	3	3	6
<b>Subtotal</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>18</b>
<b>Total de amostras</b>			<b>148</b>

HAI: horas após a inoculação. DAI: dias após a inoculação



**Figura I-4:** Plântulas dos grupos controle e infectado coletadas durante a progressão da **Vassoura-de-bruxa**. Plântulas foram coletadas durante sete pontos da fase assintomática: 6, 12, 24 e 48 HAI e 4, 8 e 16 DAI. Durante a fase sintomática, três pontos foram amostrados: vassoura verde (25 DAI), vassoura verde com necrose distal das folhas (35 DAI) e vassoura verde com necrose das folhas e ápice (45 DAI). HAI: horas após a inoculação. DAI: dias após a inoculação.

### 3.6. Extração de RNA total de *T. cacao* para o sequenciamento

As amostras coletadas 6, 12, 24 e 48 HAI, 4 e 8 DAI foram transferidas para tubos de 2mL do tipo *ependorf*. 4-5 *beads* de metal (2 mm) foram adicionadas aos tubos e cada material foi pulverizado utilizando *Mini-BeadBeater* (BioSpec Products) por 30 segundos. Todo material foi utilizado na extração (aproximadamente 20-50 mg de tecido congelado). Amostras coletadas 16, 25, 35 e 45 DAI foram pulverizadas em almofariz e pistilo de porcelana utilizando nitrogênio líquido. ~200mg de tecido congelado foram utilizadas para extração. Após a pulverização, cada material foi homogeneizado vigorosamente (vórtex) em tampão de extração (1mL x 100mg<sup>-1</sup> de tecido) contendo: 2% PVP-40; 100mM Tris-HCl pH 8,0; 30mM EDTA; 2M NaCl; 10% β-Mercaptoetanol; 2% CTAB. *Debris* celulares foram precipitados por centrifugação a 20.000xg por 15min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos de 1,5mL (do tipo *ependorf*) e duas purificações foram feitas utilizando 500μL de clorofórmio (centrifugações a 20.000xg por 15min a 4°C). As amostras foram precipitadas com 3M LiCl a 4°C por 14-16 horas (*overnight*) seguida de uma centrifugação a 20.000xg por 45min a 4°C. O *pellet* foi lavado com 500μL 3M LiCl, 700μL de etanol 70% e posteriormente ressuspenso em 15-30μL H<sub>2</sub>O-DEPC.

O RNAs foram quantificados e a pureza foi confirmada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific). Em seguida, as amostras foram enviadas para a *High Throughput Sequencing Facility* da Universidade da Carolina do Norte, Chapel Hill – EUA (HTSF-UNC) (<https://sites.google.com/site/htsfunc/>).

### 3.7. Transcriptoma: análise de qualidade do RNA e sequenciamento

O sequenciamento foi realizado pela HTSF-UNC sob a forma de prestação de serviço (terceirizado). A qualidade dos RNAs foi avaliada utilizando Bioanalyzer (BioRad) e um total de trinta bibliotecas foram sequenciadas. 10 amostras do grupo controle e 20 amostras do grupo infectado (Tabela I-2). Estes procedimentos foram conduzidos pelo integrante do grupo de pesquisa da Vassoura-de-bruxa Javier C. Alvaréz, durante seu estágio (do tipo sanduíche) na

UNC. RNAs de amostras infectadas e respectivos controles foram utilizados na construção de bibliotecas de transcriptoma. Resumidamente, a preparação destas foi realizada com o *TruSeq™ RNA Sample Preparation Kit v2* (Illumina®) seguindo as instruções do fabricante. Foram realizados sequenciamentos do tipo *Solexa Single End x 50 base pair*, utilizando o sequenciador de nova geração HiSeq 2000 versão 3.0 (Illumina®).

**Tabela I-2:** Número de sequenciamentos do transcriptoma realizados para cada ponto amostrado durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.

Período amostrado	Grupo controle	Grupo infectado
Fase assintomática		
6 HAI	1	1
12 HAI	1	3
24 HAI	1	4
48 HAI	1	3
4 DAI	1	2
8 DAI	1	2
16 DAI	1	2
Fase sintomática		
25 DAI	1	1
35 DAI	1	1
45 DAI	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>20</b>

HAI: horas após a inoculação. DAI: dias após a inoculação

### 3.8. Transcriptoma: montagem e identificação de genes diferencialmente expressos

As análises dos resultados obtidos pelo sequenciamento foram conduzidas no LGE e orientadas pelo bioinformata Leandro Costa do Nascimento. Diversas ferramentas computacionais, *scripts* e *pipelines* previamente desenvolvidos foram utilizados para a montagem do transcriptoma e análises estatísticas.

O primeiro passo foi realizar a montagem do transcriptoma utilizando o *software Bowtie Build*<sup>47</sup>. Este procedimento consiste em alinhar os dados brutos (*reads*) ao conjunto de genes preditos nos genomas do *T. cacao* e do *M. pernicioso* (genomas de referência) (detalhes na seção 3.1, página 27). Em seguida, foi calculado o valor da expressão gênica dado pelo método de RPKM (*reads per kilobase per million mapped reads*). Este método consiste na quantificação da

expressão gênica a partir de dados de um sequenciamento de RNA. O valor da expressão é dado pelo número de *reads* alinhados a cada gene, normalizado pelo número total de *reads* mapeados no genoma de referência e pelo tamanho do gene<sup>48</sup>.

O segundo passo foi identificar genes diferencialmente expressos. Cada amostra do grupo infectado foi comparada com seu respectivo controle a cada ponto de coleta. O número de *reads* mapeados foi empregado no teste estatístico utilizando o algoritmo *DEseq* proposto por Anders e Huber<sup>49</sup>. O método consiste na análise de variância corrigida pelo método de Benjamini e Hochberg. Valores com  $FDR \leq 15\%$  (*false discovery rate*) foram considerados estatisticamente significativos.

### **3.9. Análise de enriquecimento de termos do *Gene Ontology***

Esta análise consiste na identificação de processos biológicos mais representados durante em um transcriptoma. O primeiro passo realizado foi a identificação de processos biológicos no cacau, representados pelos produtos dos genes que constituem seu genoma. Para isto, as proteínas (~35.000) foram classificadas quanto a terminologia do *Gene Ontology* (GO)<sup>50</sup> e, dessa forma, foi obtida a frequência de termos do GO para os processos biológicos do cacau. Nesta etapa, foi utilizada a ferramenta Blast2GO<sup>51</sup> para comparar as proteínas do cacau com as proteínas do UniProt<sup>52</sup>, um banco de dados com informações de alta qualidade a respeito da função biológica de proteínas descritas na literatura.

Em posse da frequência de termos do GO do cacau, foi realizada a análise de enriquecimento propriamente dita. Esta consiste na quantificação de termos do GO de um grupo de genes diferencialmente expressos e a comparação desta com a frequência de cada processo obtida no genoma de referência. Dessa forma, a frequência de termos do GO foi calculada para todos os genes diferencialmente expressos, identificados previamente para cada ponto analisado (seção 3.8; página 34). Genes regulados de forma *up* ou *down* foram independentemente analisados. Para o cálculo de enriquecimento, foi aplicado o teste estatístico Hipergeométrico com

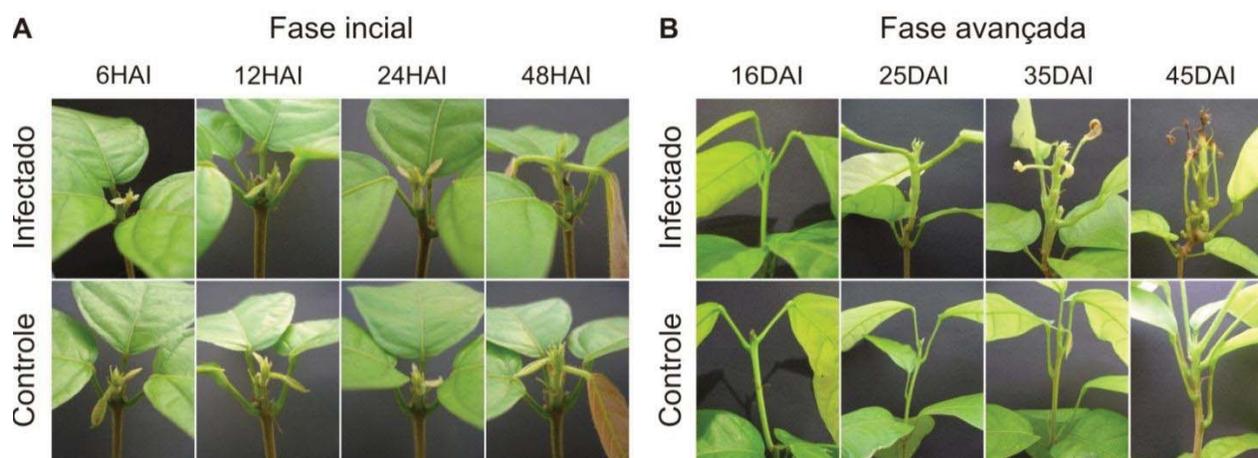
correção pelo método de Benjamini e Hochberg. Valores com  $FDR \leq 15\%$  foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram visualizados no Cytoscape<sup>53</sup> e gerados pelo *plug-in* BiNGO versão 2.44<sup>54</sup>.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Transcriptoma do desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa

Para avaliar a expressão de genes potencialmente relacionados ao estabelecimento e a progressão dos sintomas da Vassoura-de-bruxa, um total de 30 sequenciamentos do transcriptoma foram realizados. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela I-3.

Durante a fase sintomática, é possível identificar a plântula infectada e acompanhar a evolução dos sintomas. Entretanto, para a fase assintomática dois problemas intrínsecos ao modelo de estudo foram considerados: i) o modelo de infecção não é 100% efetivo e ii) os sintomas aparecem normalmente entre 15-25 dias após a inoculação, mas não ocorrem de forma sincronizada. Por essas razões, entre as plântulas infectadas coletadas no período assintomático, foram selecionadas as que continham a maior representação de *reads* do fungo. Oito dos dez pontos coletados foram analisados e redistribuídos em dois períodos: fase inicial (6-48 horas após a inoculação) e fase avançada (16-45 dias após a inoculação) (Figura I-5).



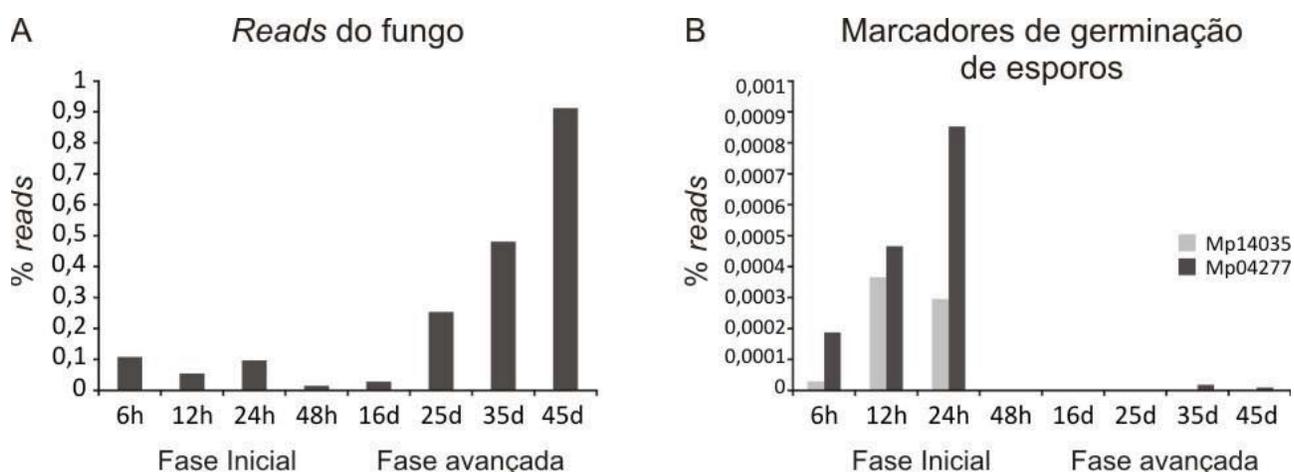
**Figura I-5: Plântulas de *T. cacao* analisadas durante as fases inicial e avançada da Vassoura-de-Bruxa. A:** Fase inicial. Composta por plântulas saudáveis e infectadas coletadas durante a fase assintomática da doença (6, 12, 24, ou 48 HAI). **B:** Fase avançada. Composta por plântulas saudáveis e infectadas coletadas nas fases sintomáticas (16, 25, 35, ou 45 DAI). 25 DAI: vassoura-verde. 35 DAI: vassoura verde com necrose distal das folhas. 45 DAI: vassoura verde com necrose das folhas e ápice. HAI: horas após a inoculação. DAI: dias após a inoculação.

**Tabela I-3:** Número de amostras sequenciadas durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. Total de *reads* sequenciados e número de genes expressos em cacau.

	ID	Período amostrado	Total de <i>reads</i> sequenciados	Total de <i>reads</i> do fungo detectados	Número de genes do cacau expressos*	
<b>Fase assintomática</b>						
<b>Grupo Controle</b>	<b>1</b>	<b>6 HAI</b>	<b>53.526.658</b>	-	<b>17.187</b>	
	<b>2</b>	<b>12 HAI</b>	<b>28.615.808</b>	-	<b>17.034</b>	
	<b>3</b>	<b>24 HAI</b>	<b>32.180.935</b>	-	<b>16.727</b>	
	<b>4</b>	<b>48 HAI</b>	<b>25.659.553</b>	-	<b>16.752</b>	
	5	4 DAI	32.624.785	-	16.794	
	6	8 DAI	27.051.679	-	16.794	
	<b>7</b>	<b>16 DAI</b>	<b>18.870.720</b>	-	<b>16.451</b>	
	<b>Fase sintomática</b>					
	<b>8</b>	<b>25 DAI</b>	<b>25.057.605</b>	-	<b>16.313</b>	
	<b>9</b>	<b>35 DAI</b>	<b>21.003.955</b>	-	<b>16.341</b>	
<b>10</b>	<b>45 DAI</b>	<b>12.082.458</b>	-	<b>15.917</b>		
<b>Fase assintomática</b>						
<b>Grupo infectado</b>	<b>11</b>	<b>6 HAI</b>	<b>30.685.039</b>	<b>33.344</b>	<b>17.154</b>	
	12	12 HAI_R1	21.850.814	4.225	17.052	
	13	12 HAI_R2	36.825.014	3.335	17.049	
	<b>14</b>	<b>12 HAI_R3</b>	<b>28.953.394</b>	<b>15.829</b>	<b>17.389</b>	
	15	24 HAI_R1	19.395.752	2.020	17.077	
	16	24 HAI_R2	22.029.502	3.296	17.100	
	17	24 HAI_R3	9.777.332	8.522	17.005	
	<b>18</b>	<b>24 HAI_R4</b>	<b>15.642.184</b>	<b>15.201</b>	<b>16.976</b>	
	19	48 HAI_R1	21.623.533	657	16.985	
	<b>20</b>	<b>48 HAI_R2</b>	<b>27.086.764</b>	<b>1.228</b>	<b>17.506</b>	
	21	48 HAI_R3	102.649.229	742	16.766	
	22	4 DAI_R1	24.604.261	34	17.018	
	23	4 DAI_R2	41.842.601	215	16.980	
	24	8 DAI_R1	57.040.366	1.570	16.970	
	25	8 DAI_R2	20.836.604	124	17.003	
	26	16 DAI_R1	27.957.415	1.912	16.135	
	<b>27</b>	<b>16 DAI_R2</b>	<b>56.105.545</b>	<b>6.828</b>	<b>16.963</b>	
	<b>Fase sintomática</b>					
	<b>28</b>	<b>25 DAI</b>	<b>35.262.303</b>	<b>89.709</b>	<b>17.616</b>	
	<b>29</b>	<b>35 DAI</b>	<b>14.230.758</b>	<b>68.793</b>	<b>17.292</b>	
<b>30</b>	<b>45 DAI</b>	<b>17.174.011</b>	<b>158.148</b>	<b>16.691</b>		

\*RPKM $\geq$ 1. R: réplicas. HAI: horas após a inoculação. DAI: dias após a inoculação. Apenas as amostras apresentadas em negrito foram selecionadas para as análises.

A densidade de micélios do patógeno nas plântulas infectadas é muito baixa, dificultando a detecção de transcritos do fungo. Durante a fase inicial, a porcentagem de transcritos de *M. perniciosus* detectada foi menor que 0,1%, apresentando o menor valor 48 horas após a inoculação. Na fase avançada, a porcentagem é menor que 0,1% 16 DAI e próximo de 1% 45 DAI. Entre 16-45 DAI, a quantidade de transcritos do fungo aumenta a medida que os sintomas avançam (Figura I-6a). Os valores baixos observados 48 horas e 16 dias após a inoculação são, provavelmente, um efeito de diluição do sequenciamento, devido a rápida expansão das folhas das plântulas (Figura I-5; página 37).



**Figura I-6: Porcentagem de transcritos do fungo detectada durante a progressão da doença. A:** Porcentagem de transcritos totais. **B:** Porcentagem de transcritos de dois genes de *M. perniciosus* expressos apenas durante a germinação de esporos\*. Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 16, 25, 35, ou 45 DAI.

Transcritos de Mp14035 e Mp04277, dois genes do fungo cuja expressão é ativada apenas em esporos germinando\*, são detectados apenas nos primeiros pontos (6-24h), demonstrando que o fungo encontra-se na fase de estabelecimento da infecção (Figura I-6b).

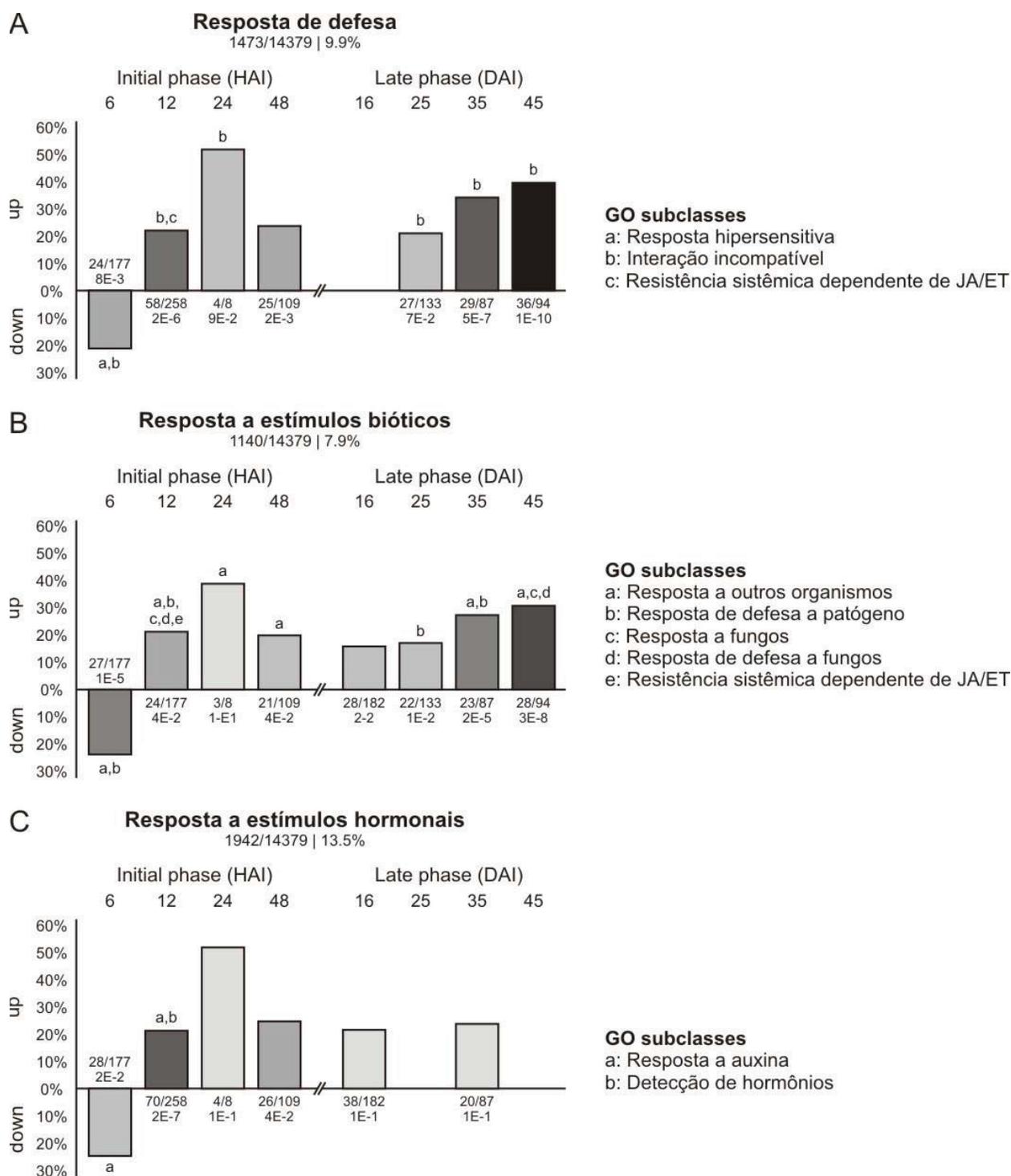
\*Dados preliminares obtidos por Paulo J. Teixeira, aluno de doutorado do LGE e membro do grupo pesquisa da Vassoura-de-bruxa. Responsável pela construção do "Atlas do Transcriptoma" da Vassoura-de-bruxa (manuscrito em preparação).

#### 4.2. Resposta a defesa é o processo biológico mais representado na Vassoura-de-bruxa

Utilizando a terminologia do *Gene Ontology* para processos biológicos, foi atribuída uma função hipotética para os genes do cacau diferencialmente expressos durante o desenvolvimento da Vassoura-de-bruxa. Aproximadamente 57% das proteínas preditas foram anotadas com pelo menos um termo do GO, o restante possui similaridade com proteínas com funções não conhecidas.

Em seguida, para detectar processos biológicos significativamente mais representadas em cada ponto da doença, foi realizada um análise de enriquecimento de termos do GO. Curiosamente, esta análise demonstrou que os termos i) “resposta de defesa”, ii) “resposta a estímulos bióticos” e iii) “resposta a estímulos hormonais” são os mais representados, ocorrendo em praticamente todos os pontos analisados (Figura I-7). É importante notar que 6 horas após a inoculação o enriquecimento das três categorias é representado por genes cuja expressão encontra-se reprimida na plântula infectada em relação ao controle.

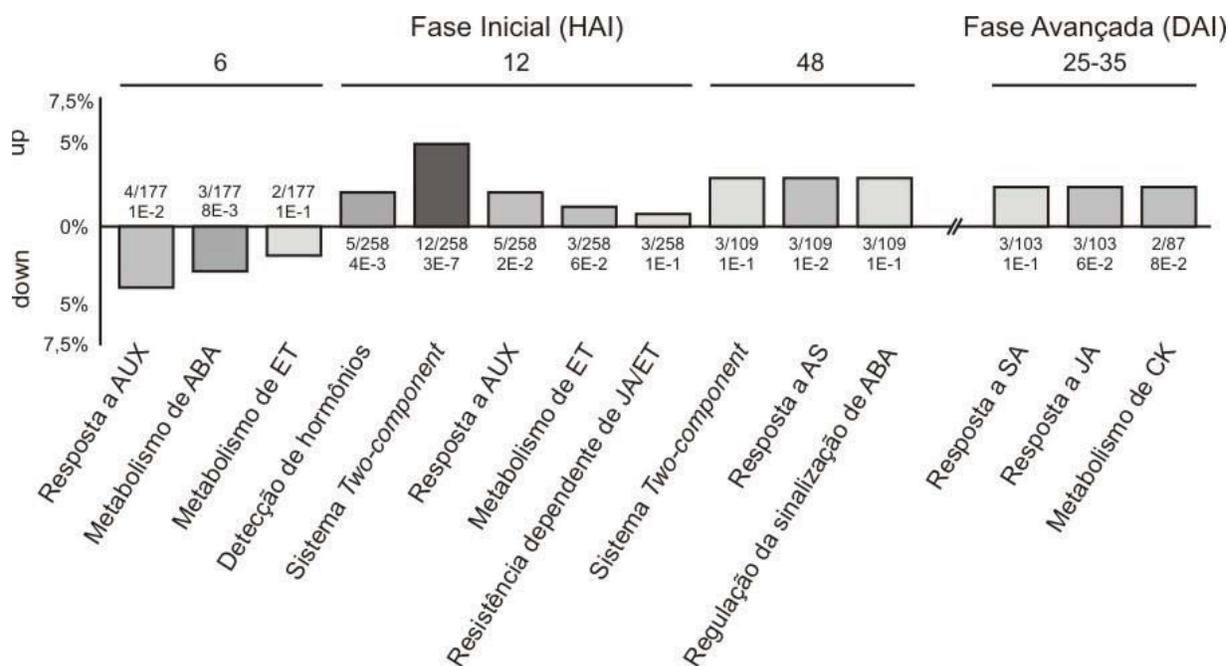
Mesmo preliminar, este resultado é a primeira evidência a nível transcricional de que: i) o fungo pode possuir mecanismos que inibem a resposta de defesa durante as primeiras horas, período necessário para germinação de esporos e estabelecimento da infecção; ii) a planta manifesta uma resposta de defesa ineficaz durante as fases assintomática e sintomática, sendo incapaz de conter a doença. Até o aparecimento dos sintomas da vassoura verde não é observada nenhuma evidência de resposta de defesa ao patógeno como HR<sup>55</sup>, resposta clássica para contenção da infecção por patógenos biotróficos<sup>56</sup>. Pontos de necrose são observados apenas durante a transição dos sintomas, entre 35 a 45 dias após inoculação.



**Figura I-7: Análise de enriquecimento de termos do *Gene Ontology* (GO).** Resposta de defesa (A), resposta estímulos bióticos (B) e resposta estímulos hormonais (C) foram os termos significativamente mais representados durante a progressão da doença. Valores abaixo do termo do GO representam a frequência deste em relação ao genoma do cacau. Valores próximos as barras representam a frequência do GO em relação grupo de genes diferencialmente expresso. O enriquecimento é apresentado em %. Letras minúsculas representam subclasses dentro dos GOs apresentados. Maior intensidade das barras representa maior significância estatística. *Up* e *Down*: termos do GO enriquecidos com genes induzidos ou reprimidos, respectivamente. Todos os valores apresentam  $FDR \leq 15\%$  (detalhes na seção 3.9; página 35).

Em fitopatologias causadas por outros fungos hemibiotróficos como, por exemplo, *Colletotrichum ssp*, a fase biotrófica também é transitória e assintomática, sendo esta uma etapa crítica para o sucesso da infecção<sup>57</sup>. Recentemente, foi demonstrado que no oomiceto hemibiotrófico *Phytophthora infestans*, a fase biotrófica é mantida por uma supressão inicial da resposta de defesa por uma proteína efetora secretada, SNE1 (SUPPRESSOR OF NECROSIS 1), nesta interação planta-patógeno, a HR é observada de forma sincronizada com a mudança de fase patógeno<sup>58</sup>.

Por outro lado, os termos de GO diretamente relacionadas a hormônios ocorrem em pontos mais específicos (Figura I-8), sugerindo que estes possam desempenhar diferentes papéis ao longo da progressão da doença. Para compreender melhor este resultado, todos os genes constituintes de cada categoria foram analisados. A sequência em aminoácidos foi comparada com proteínas de *Arabidopsis sp.* e, baseado na similaridade proteica, uma função hipotética foi atribuída a cada gene. O potencial papel destes durante a interação *M. pernicioso*/*T. cacao* é apresentado a seguir.



**Termos do GO relacionados a hormônios**

**Figura I-8: Enriquecimento de termos do Gene Ontology (GO) relacionados a hormônios.** Valores próximos as barras representam a frequência do GO em relação grupo de genes diferencialmente expresso. O enriquecimento é apresentado em %. Maior intensidade das barras representa mais significância. Maior intensidade das barras representa maior significância estatística. *Up* e *Down*: termos do GO enriquecidos com genes induzidos ou reprimidos, respectivamente. AUX: auxina. ABA: ácido abscísico. ET: etileno. JA: jasmonato. AS: ácido salicílico. CK: citocininas. Todos os valores apresentam  $FDR \leq 15\%$  (detalhes na seção 3.9; página 35).

#### 4.3. A homeostase de auxinas pode estar alterada durante a fase inicial

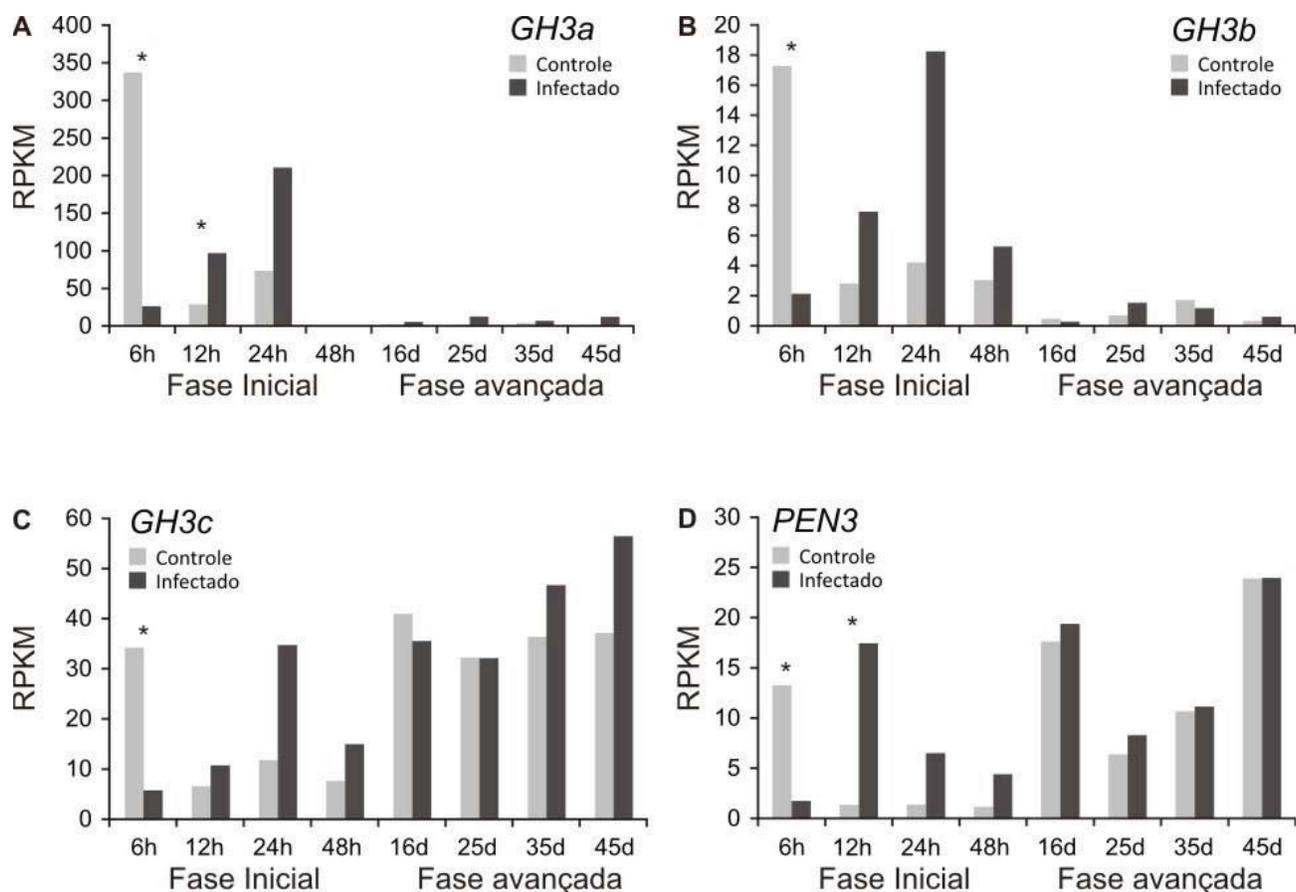
No primeiro ponto amostrado, 6 horas após a inoculação, o GO “resposta a AUX” agrupa 3 genes similares a *GH3* (IAA-amino sintase) e 1 gene similar a *PNE3* (*PENETRATION 3*). Os termos “metabolismo de ABA” e “metabolismo de ET” são representados, por proteínas que catalisam a síntese de ácido abscísico (*ABI2* - *ABA INSENSITIVE 2*<sup>59,60</sup>) e de etileno (*ACC oxidase*<sup>61</sup> - *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*), respectivamente.

*GH3* é uma família gênica que, assim como, *SUARs* [*Small Auxin-Up RNAs*] e *Aux/IAAs*, é constituída pelos genes de resposta a auxina melhor caracterizados. Estes exibem um rápido e específico aumento da expressão em resposta a tratamentos com auxinas exógenas<sup>62</sup>. *GH3*

codificam para proteínas com atividade IAA-amino sintase, que promovem a inativação de auxinas através da conjugação destas com aminoácidos, um mecanismo que plantas possuem para lidar com quantidades excessivas de auxina e manter a homeostase<sup>63</sup>. Em *Arabidopsis sp.* e em arroz, a atividade de GH3 específicas potencializa a imunidade contra patógenos biotróficos, ativando as vias de resposta a defesa dependente de AS, que por sua vez, induzem a expressão do gene *PR1*<sup>64-67</sup>.

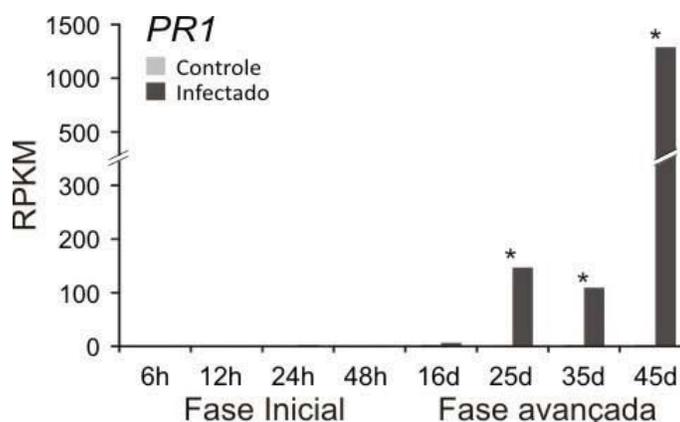
*PEN3* codifica um transportador do tipo ABC, que auxilia no controle do fluxo de IAA, e conseqüentemente na manutenção da homeostase deste hormônio<sup>68</sup>. Além disso, este gene contribui para a resistência do tipo *nonhost*<sup>67</sup> a patógenos inapropriados em *Arabidopsis sp.* Neste caso, o mutante nulo *pen3* é incapaz de conter a infecção dos fungos biotróficos *Erysiphe pisi* e *P. infestans*. Assim como demonstrado para *GH3*, a resistência por este mecanismo também é dependente de AS<sup>69</sup>.

Assumindo que pela similaridade com *Arabidopsis sp.* as proteínas GH3 e PEN3 de cacau controlar a homeostase de IAA, a repressão dos 3 genes *GH3* (Figura I-9a-c) e do gene *PEN3* (Figura I-9d) em plântulas infectadas, poderia resultar em um desbalanço na homeostase de IAA, promovendo seu acúmulo. Como descrito anteriormente (seção 1.3; página 23), auxina inibem a sinalização dependente de AS e, dessa forma, aumenta a suscetibilidade do hospedeiro a infecção por fungos biotróficos e hemibiotróficos<sup>37-39</sup>.



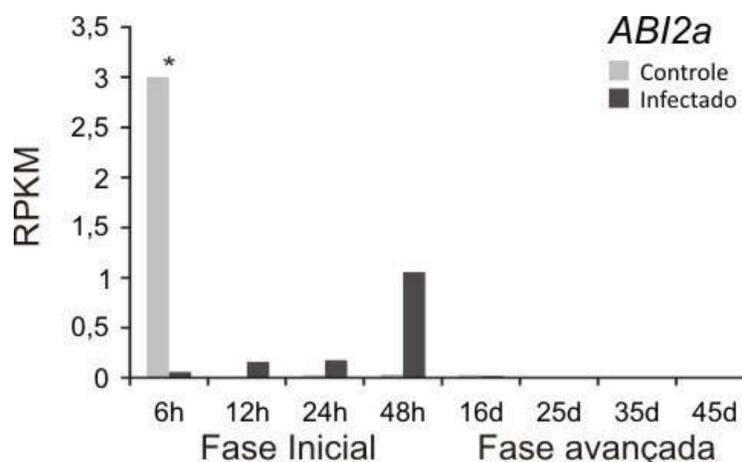
**Figura I-9: Perfil da expressão (RPKM) dos genes relacionados a auxinas durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. A-C: GH3: IAA-amino sintase. D: PEN3: *PENETRATION 3*. \*Diferenças estatisticamente significativas (FDR≤15%). Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 16, 25, 35, ou 45 DAI.**

Recentemente foi confirmado em nosso laboratório que o fungo *M. perniciosa* é capaz de secretar auxinas em meio de cultura suplementado com triptofano. A secreção de IAA *in vivo* poderia contribuir para o acúmulo de auxinas e, dessa forma, inibir a resposta imune dependente de AS. Adicionalmente, um gene similar a *PR1* não apresenta expressão durante os primeiros pontos da doença (Figura I-10). *PR1* é uma proteína relacionada a defesa dependente de AS e sua expressão é reprimida em tratamentos com IAA<sup>70</sup>. Juntos, estes resultados sugerem que a sinalização dependente de AS poderia estar sendo regulada negativamente por auxinas favorecendo a patogenicidade.



**Figura I-10: Perfil da expressão (RPKM) do gene *PR1* durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.** *PR1*: *Pathogenesis-related 1*. \*Diferenças estatisticamente significativas (FDR≤15%). Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 16, 25, 35, ou 45 DAI.

Um gene similar a *ABI2* de *Arabidopsis*, também encontra-se reprimido (Figura I-11), sugerindo uma regulação negativa da sinalização mediada por ABA neste ponto da infecção. ABA também regula a resposta de defesa, atuando possivelmente durante a fase biotrófica de fungos hemibiotróficos<sup>37-39</sup>. Se confirmada, a ausência de ABA poderia adicionalmente favorecer a patogenicidade. Em *Arabidopsis sp.*, mutantes deficientes em ABA possuem uma maior suscetibilidade a fungos como, por exemplo, ao fungo *Leptosphaeria maculans*<sup>71</sup>. Curiosamente, ABA regula positivamente a defesa em *Arabidopsis sp.* contra *P. syringae*, induzindo o fechamento de estômatos para impedir a penetração passiva do patógeno. Por outro lado, *M. pernicioso* e diversos fungos patogênicos secretam cristais de oxalato<sup>12</sup> que, por sua vez, inibem o mecanismo de fechamento de estômatos dependente de ABA<sup>72</sup>. Assumindo que este sistema regulado por ABA seja equivalente em cacau, a deficiência na produção deste hormônio poderia favorecer a infecção por *M. pernicioso*, uma vez que este infecta o cacau penetrando através dos estômatos<sup>8,55,73</sup>.



**Figura I-11: Perfil da expressão (RPKM) do gene ABI2 durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. ABI2: *ABA INSENSITIVE 2*. \*Diferenças estatisticamente significativas (FDR≤15%). Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 16, 25, 35, ou 45 DAI.**

No segundo ponto analisado, 12 horas após a inoculação, cinco termos de GO são representadas por genes induzidos na plântula infectada em relação a planta sadia (Figura I-8; página 43). O termos “detecção de hormônios”, “sistema *two-component*”, “metabolismo de ET” e “resistência sistêmica dependente de JA/ET” incluem genes com funções relacionadas. Entre eles encontram-se: 2 receptores de etileno sendo 1 do tipo *ETR* (*ETHYLENE RESPONSE*) e 1 *ERS* (*ETHYLENE RESPONSE SENSOR*); pelo menos 4 fatores de resposta a etileno *ERF1* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1*); 3 genes similares a *ACC Oxidases 1*; um ativador da defesa associada a etileno (*GLIP1*)<sup>74</sup>. O termo “resposta a Auxina” inclui um gene similar a *GH3* e dois genes da família *PDR* (*PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE*) que assim como *PEN3*, codificam transportadores do tipo ABC que auxiliam no controle do fluxo e IAA.

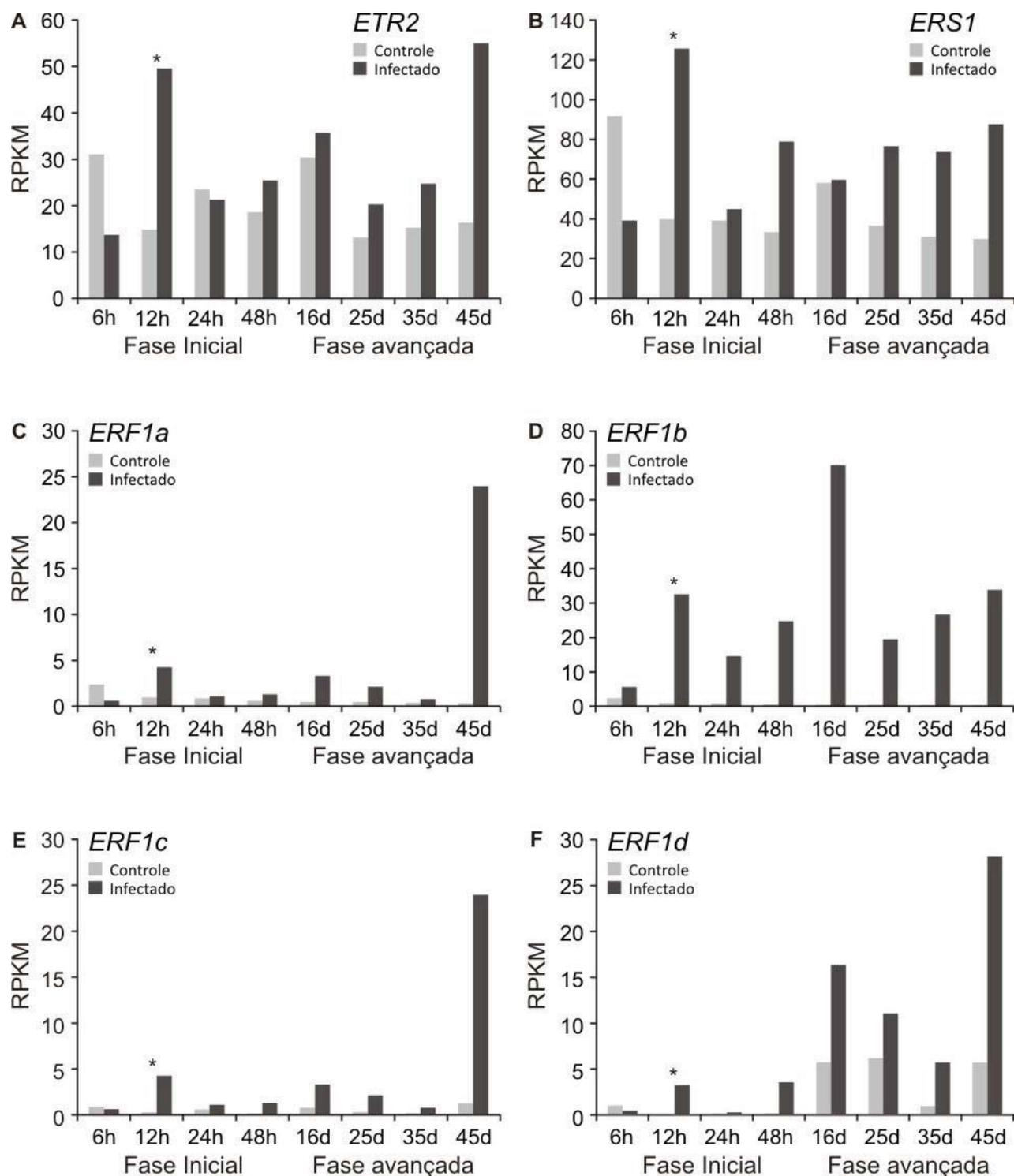
*ETR* e *ERS* são proteínas relacionadas a histidina quinase que atuam como receptores de etileno. Estes atuam como reguladores negativos da sinalização por ET. Na ausência deste hormônio, regulares positivos da resposta a etileno são reprimidos. Na presença, estes receptores assumem uma conformação inativa e liberam a repressão de reguladores de resposta que, por sua vez, ativam expressão de *ERF1s*<sup>75,76</sup>. Em *Arabidopsis sp.*, *ERF1s* regulam positivamente a

resposta de defesa dependente de jasmonato<sup>77</sup>, de forma que o aumento da expressão destes fatores potencializa a defesa contra patógenos necrotróficos<sup>39</sup>.

Neste momento da interação, o cacau aparentemente manifesta uma resposta dependente de JA/ET contra patógenos necrotróficos, representada principalmente pela indução da expressão de receptores (Figura I-12a-b) e de fatores de resposta a etileno (Figura I-12c-f). Curiosamente, nesta etapa da progressão da doença o fungo encontra-se na fase biotrófica de seu ciclo de vida<sup>8,55,73</sup>, levantando a hipótese de que este patógeno possua a habilidade modular a interação entre diferentes hormônios para favorecer a suscetibilidade a patógenos biotróficos e hemibiotróficos.

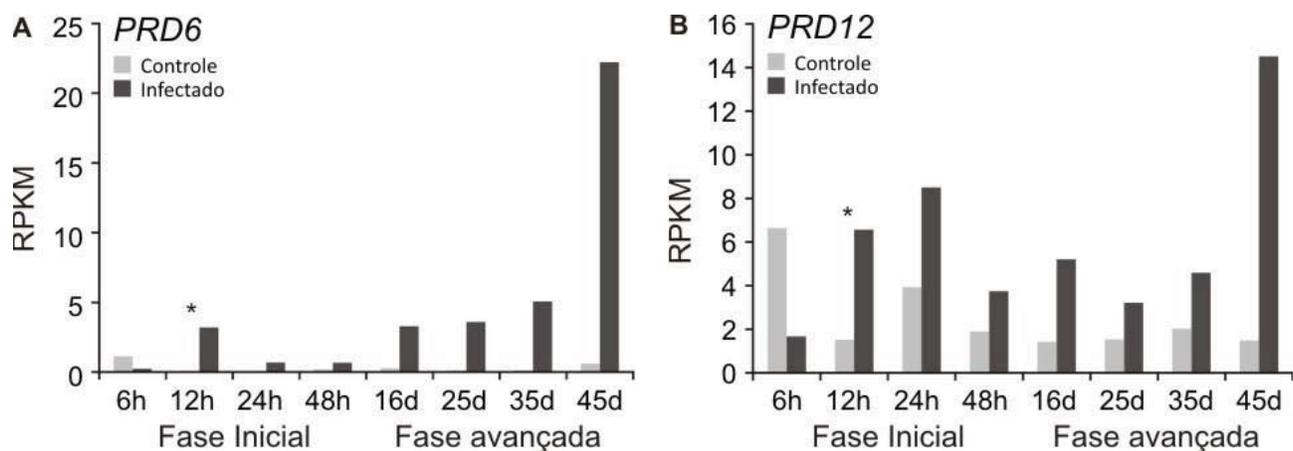
O melhor exemplo de modulação hormonal de uma planta por um patógeno é a formação de galhas em plantas infectadas por *A. tumefaciens*. Neste mecanismo, o gene *Tmr* cuja proteína catalisa a síntese de citocininas, é inserido via plasmídeo Ti no genoma do hospedeiro, alterando o metabolismo deste hormônio<sup>40</sup>.

Assim como *Agrobacterium sp.*, diversos fungos biotróficos e necrotróficos possuem a habilidade de produzir hormônios vegetais: *Cladosporium fulvum*, *Ustilago maydis*, *Pyrenopeziza brassicae* e *Venturia inaequalis* produzem citocininas; *Botrytis cinerea* produz ácido abscísico e citocininas, enquanto *Fusarium oxysporum* produz apenas ácido abscísico<sup>37,39</sup>. Recentemente, foi demonstrado que o fungo hemibiotrófico *Colletotrichum graminicola* produz diferentes isoformas de citocininas e modula a fisiologia do hospedeiro, o resultado é a formação de “ilhas verdes” que garantem sucesso da infecção<sup>78</sup>.



**Figura I-12: Perfil da expressão (RPKM) de genes relacionados à etileno durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. A: *ETR2*: *ETHYLENE RESPONSE 2*. B: *ERS1*: *ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1*. C-F: *ERF1*: *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1*. \*Diferenças estatisticamente significativas (FDR≤15%). Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 16, 25, 35, ou 45 DAI.**

Em resumo, auxinas regula positivamente a síntese de etileno<sup>38,79</sup> e negativamente imunidade a patógenos hemibiotrófico e biotróficos, mecanismo dependente de AS<sup>37,38</sup>. Assumindo que o fungo estaria produzindo IAA durante este ponto da interação, esta poderia regular positivamente a síntese de etileno, o que explicaria a indução da expressão de receptores e de genes de resposta a este hormônio neste ponto da interação. Por outro lado, IAA também atuaria na repressão da resposta de defesa dependente de AS, favorecendo novamente o estabelecimento da infecção. Curiosamente, a expressão do gene *PR1* também não é detectada neste ponto da interação (Figura I-10; página 46). Por outro lado, a indução dos genes *GH3a*, *PEN3* (Figura I-9a,d; página 45), *PDR6* e *PDR12* (Figura I-13) neste ponto poderia representar uma tentativa de controle do excesso de IAA para estabelecer a homeostase.



**Figura I-13: Perfil da expressão (RPKM) de genes *PRD* durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. A: *PRD6*: *PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 6*. B: *PRD12*: *PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 12*. \*Diferenças estatisticamente significativas (FDR≤15%). Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 16, 25, 35, ou 45 DAI.**

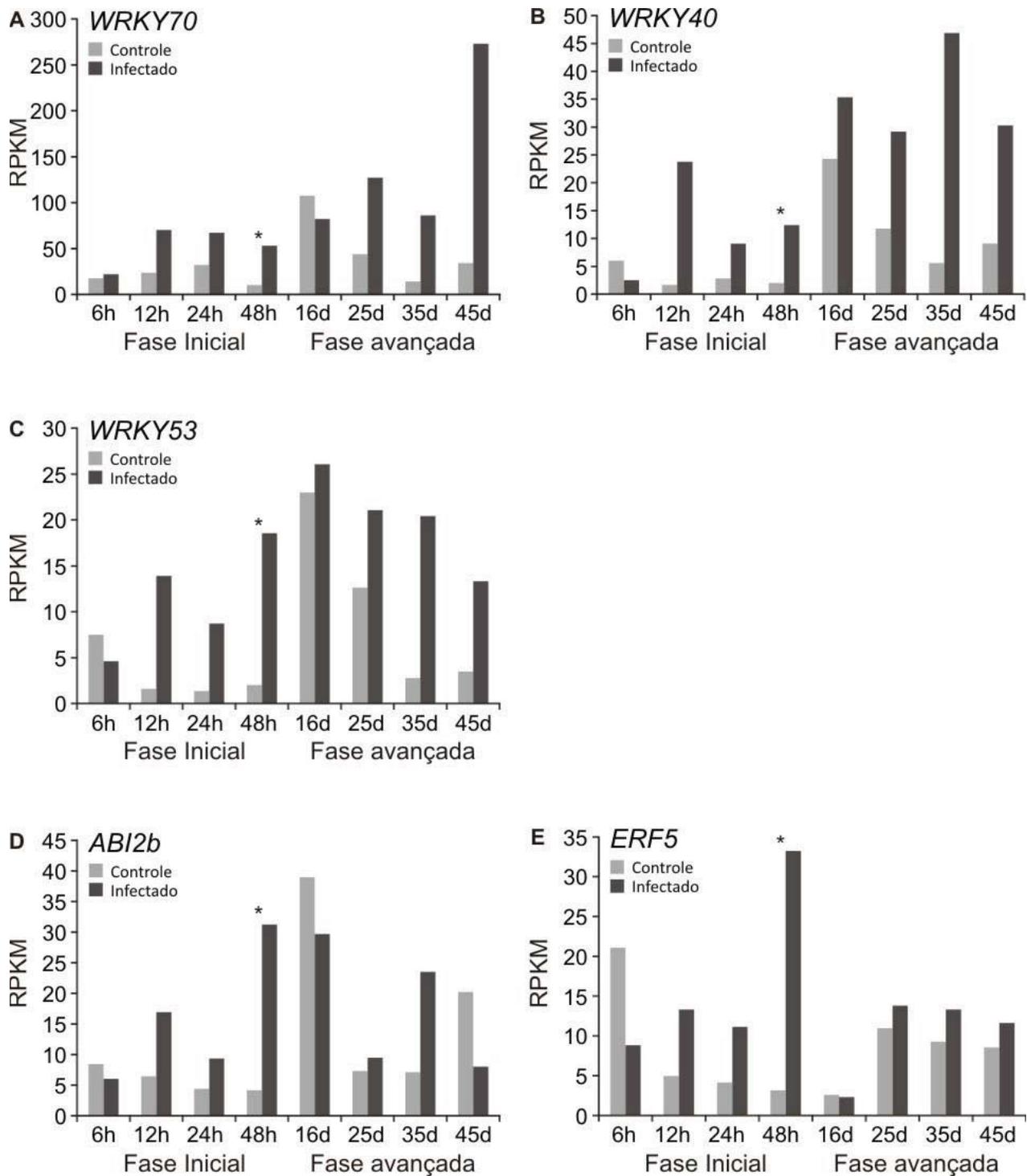
Nas amostras coletadas 48 horas após a inoculação, é observada a ocorrência de enriquecimento de termos do GO relacionados a: “resposta a AS”, “regulação da sinalização por ABA” e “sistema *two-component*”. Na categoria “resposta a AS” aparecem dois genes similares aos fatores de transcrição *WRKY70* e *WRKY40*; “regulação de ABA” apresenta um gene *ABI2*,

componente da via de transdução de sinal em resposta a ABA<sup>59</sup>; em “sistema *two-component*” aparece um fator de resposta a etileno (*ERF5*).

*WRKY70* e *WRKY40* e uma adicional *WRKY53* identificada na categoria “resposta a defesa” (Figura I-7a; página 41) codificam fatores de transcrição que, de forma sinérgica, determinam o balanço entre as respostas de defesa dependentes de JA/ET e AS. Mutantes de ganho ou perda de função causam efeitos opostos sobre a sinalização de defesa. A ausência da expressão em *wrky70,40,53* resulta no aumento da resistência ao fungo necrotófico *Alternaria brassicicola* e na suscetibilidade a ao fungo biotrófico *Erysiphe cichoracearum*. Em contra partida, o aumento da expressão resulta no aumento da resistência contra *E. cichoracearum* e na suscetibilidade a *A. brassicicola*<sup>80,81</sup>.

Moffat e colaboradores<sup>82</sup> demonstraram recentemente que a proteína *ERF5* desempenha um papel importante na regulação positiva da resposta de defesa dependente de ET/JA. A redução da expressão de *ERF5* e *ERF6* resulta na supressão da sinalização mediada por AS. Por outro lado, o aumento favorece a suscetibilidade ao patógeno biotrófico *P. syringae*.

Neste ponto da infecção (48 HAI) pode estar havendo uma regulação positiva da resposta do cacau ao fungo biotrófico, representada pela indução da expressão de *WRKY70*, *WRKY40* e *WRKY53* em plântulas infectas (Figura I-14a-c). Entretanto, a indução de *ABI2* (Figura I-14d) e *ERF5* (Figura I-14e) sugerem uma regulação negativa da resposta mediada por AS, ativando a defesa via JA/ET. Embora os resultados neste ponto não sejam conclusivos, parece ocorrer uma tentativa de resposta de defesa contra patógenos biotróficos. Entretanto, a expressão do *PR1* não é detectada novamente (Figura I-10; página 46).



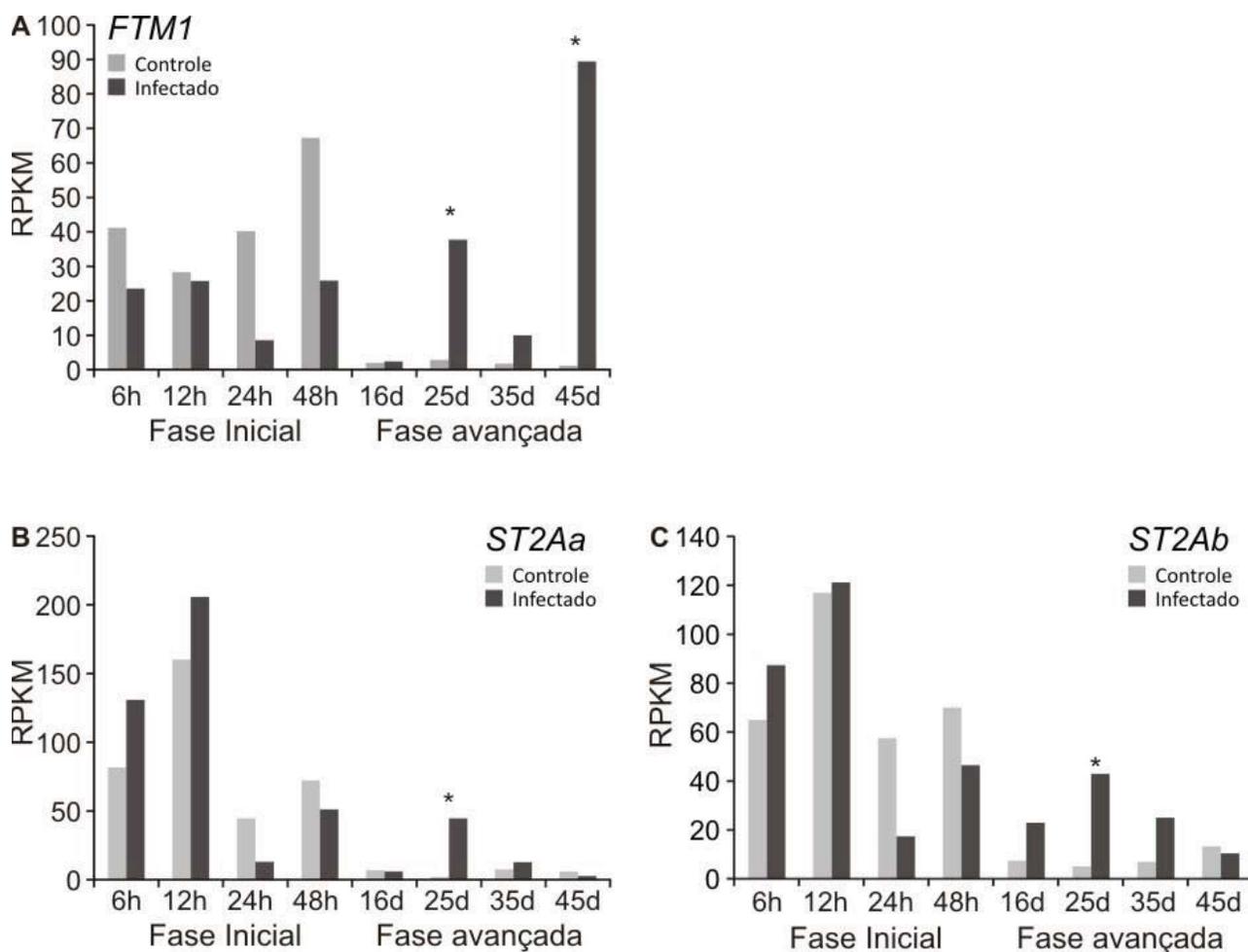
**Figura I-14: Perfil da expressão (RPKM) de genes relacionado a ácido salicílico durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. A-C: *WRKY70;40;53*: fatores de transcrição que ativam a resposta de defesa dependente de AS e reprimem genes regulados por JA. D: *ABI2*: *ABA INSENSITIVE 2*. E: *ERF1*: *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 5*. \*Diferenças estatisticamente significativas ( $FDR \leq 15\%$ ). Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 16, 25, 35, ou 45 DAI. AS: ácido salicílico. JA: jasmonato.**

#### 4.4. O cacau manifesta uma resposta de defesa tardia durante a fase avançada

No período entre 25 e 35 dias após a inoculação inicia-se a transição dos sintomas da Vassoura-de-bruxa, caracterizada pelo início da necrose distal de folhas e do meristema vegetativo do ramo infectado (Figura I-5; página 37). Embora não se compreenda exatamente a causa, o fungo muda da fase biotrófica para a necrotrófica neste momento<sup>73</sup>. A transição de fase acompanha a dinâmica da mudança dos sintomas e, por essa razão, são observadas hifas biotróficas e necrotróficas colonizando o ramo infectado<sup>16</sup>.

No período que compreende a fase avançada, ou seja, 16 a 45 dias após a inoculação, são observadas respostas a AS, JA e CKs. Na classe “resposta a AS” encontra-se um gene semelhante a *FTM1* (*FLORAL TRANSITION AT THE MERISTEM 1*). O termo “resposta a JA” e “Metabolismo de CK” são representados, respectivamente, por dois genes similares a *ST2A* (*SULFOTRANSFERASE 2A*) e dois similares a *CKXs* (*CYTOKININ OXIDASE*).

*FTM1* é um gene relacionado a resistência adquirida mediada por AS<sup>83</sup>, enquanto *ST2A* participa do processo de biosíntese de jasmonato<sup>84</sup>. A indução da expressão destes genes na plântua infectada (Figura I-15), sugere que a resposta de defesa dependente de AS e de JA/ET estariam contraditoriamente ativadas na fase sintomática da doença. Apartir de 25 dias, a expressão do gene *PR1* encontra-se altamente induzida (Figura I-10; página 46), reforçando a possibilidade de haver uma resposta imune mediada por AS. Além disso, a concentração de AS é 10 vezes maior em folhas de cacau infectadas por *M. perniciosa* em relação ao controle, como demonstrado por Kilaru e colaboradores<sup>85</sup>. Por outro lado, há também uma maior concentração de IAA em folhas de cacau infectadas. Auxinas podem induzir a síntese de etileno<sup>38</sup> e de acordo com Scarpari e colaboradores<sup>11</sup>, a partir de 21 dias após a inoculação a emissão de etileno é significativamente mais alta em plântuas de cacau infectadas em relação aos controles.

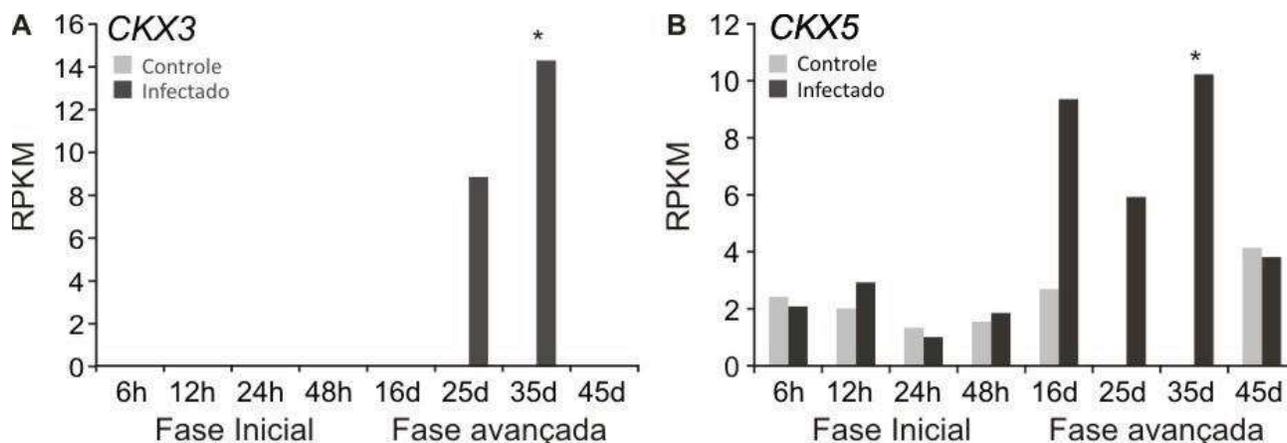


**Figura I-15: Perfil da expressão (RPKM) de genes relacionados à ácido salicílico e jasmonato durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. A: *FTM1*: *FLORAL TRANSITION AT THE MERISTEM 1*, B-C: *ST2A*: *SULFOTRANSFERASE 2A*. \*Diferenças estatisticamente significativas (FDR≤15%). Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 16, 25, 35, ou 45 DAI.**

Apesar de diversos trabalhos demonstrarem o antagonismo entre os mecanismos de defesa dependente de AS e ET/JA<sup>37,38</sup>, em alguns casos estas podem atuar de forma sinérgica. Thomma e colaboradores<sup>86</sup> demonstraram a ausência de antagonismo em *Arabidopsis sp.* na defesa contra fungos necrotróficos. Adicionalmente, van Wees<sup>87</sup> e colaboradores demonstraram que em *Arabidopsis sp.* infectada com *P. syringae*, as respostas dependente de AS e de JA/ET foram complementares, resultando em um efeito aditivo na proteção do hospedeiro.

#### 4.5. A indução de CKXs sugere uma resposta ao acúmulo de citocininas

Dois genes similares a CKX encontram-se induzidos na fase avançada da Vassoura-de-bruxa (Figura I-16). Estes genes codificam enzimas que catalisam a degradação irreversível de citocininas e, dessa forma, controlam o nível de citocininas ativas nas células<sup>88</sup>.



**Figura I-16: Perfil da expressão (RPKM) de genes relacionados à degradação de citocininas durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. A: CKX3: *CYTOKININ OXIDASE 3*. B: CKX5: *CYTOKININ OXIDASE 5*. \*Diferenças estatisticamente significativas (FDR≤15%). Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 16, 25, 35, ou 45 DAI.**

Em relação à resposta de defesa, o papel das CKs é redundante. Na infecção de *Arabidopsis sp.* por *Plasmodiophora brassicae*, a indução da expressão de CKXs aumenta a resistência contra o patógeno. Nesta interação, a progressão da doença é controlada por uma regulação fina da expressão de CKXs. Durante a progressão da doença a expressão destes genes encontra-se reprimida, disponibilizando mais citocininas ativas que provocam um intumescimento constante da raiz infectada, formando estruturas semelhantes a galhas. Em contra partida, o aumento da expressão de CKXs diminui os níveis de citocininas livres e, nesta condição, a progressão dos sintomas é interrompida<sup>89</sup>.

Por outro lado, Choi e colaboradores<sup>43</sup> demonstraram uma correlação direta entre altas quantidades de CKs e o aumento da resistência de *Arabidopsis sp.* a *P. syringae*, através de um mecanismo que induz a biossíntese de AS e a expressão do gene *PR1*. Além disso, Argueso e

colaboradores<sup>44</sup> comprovaram que a resposta de defesa mediada por citocininas é dose-dependente. Altas concentrações induzem a resistência do hospedeiro, enquanto baixas concentrações induzem a suscetibilidade ao patógeno.

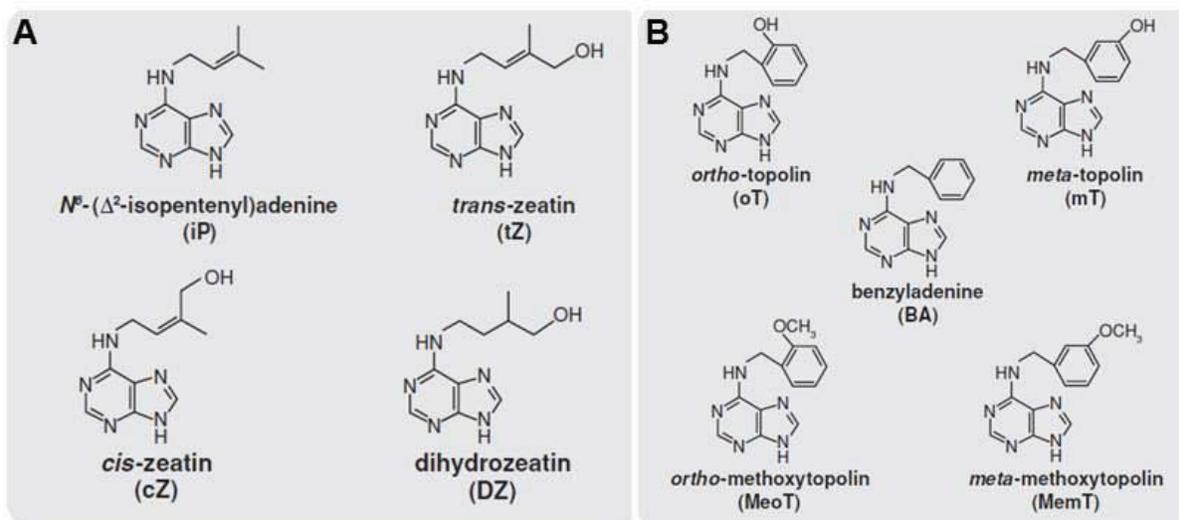
A indução da expressão de *CKX3* e *CKX5* também pode representar um *feedback* negativo para controlar um acúmulo de citocininas durante a fase avançada da doença. Se isto ocorre de fato, entender os mecanismos de síntese e de sinalização media por citocininas durante a interação podem auxiliar na compreensão do papel deste hormônio nessa fitopatologia. Por essa razão, este trabalho apresenta uma análise detalhada da expressão de genes relacionados às citocininas durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.

## II. CAPÍTULO 2:

### **Análise da expressão de genes relacionados a citocininas em *T. cacao* e em *M. pernicioso***

## 1. INTRODUÇÃO

As citocininas constituem um grupo de hormônios estruturalmente diverso, onde todas as formas nativas são moléculas derivadas da adenina. A diferença é determinada pela presença de cadeias laterais ligadas ao  $N^6$  e a conjugação de CKs com diferentes açúcares e aminoácidos. As cadeias laterais podem ser do tipo isoprenóide ou aromática, e variam quanto a ausência ou presença de grupos hidroxila e suas posições estereoisoméricas. Isopenteniladenina (iP), trans-zeatina (tZ), cis-zeatina (cZ) e di-hidrozeatina (DZ) são exemplos de CKs que possuem isoprenóides na cadeia lateral (Figura II-1a). O grupo das citocininas aromáticas inclui: ortho-topolina (oT), meta-topolina (mT), benziladenina (BA), ortho-metoxitopolina (MeoT) e meta-metoxitopolina (MemT) (Figura II-1b)<sup>88</sup>.

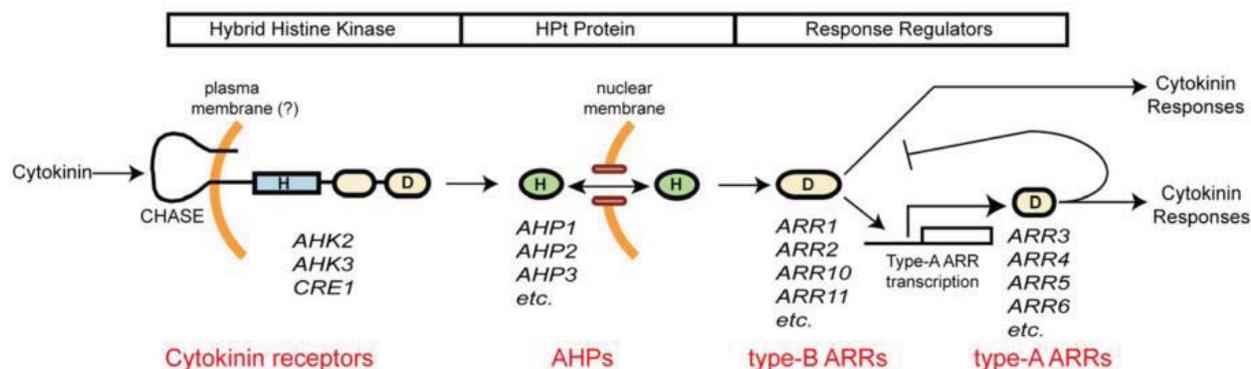


**Figura II-1: Estrutura das diferentes citocininas. A:** Citocininas isoprenóides. **B:** Citocininas aromáticas. Abreviações utilizadas comumente são apresentadas entre parênteses. Adaptado de Sakakibara H.<sup>88</sup>.

Este grupo hormônios é frequentemente referido como importante regulador da divisão celular. Durante o desenvolvimento vegetal, as citocininas exercem funções relacionadas à formação de órgãos, expansão foliar e germinação de sementes<sup>90</sup>. Foi demonstrado também que estes hormônios são reguladores centrais da atividade do cambium vascular. Por essa razão, controlam a formação dos feixes vasculares<sup>91,92</sup>.

A atividade deste hormônio é controlada por um balanço fino entre síntese e catabolismo. A biossíntese é catalisada por duas classes de enzimas com atividade isopentenil transferases: ATP/ADP isopentenil transferases (IPTs) e tRNA IPTs (tRNA-IPTs)<sup>93</sup>. IPTs são responsáveis pela síntese da maior parte de CKs, enquanto tRNA-IPTs sintetizam exclusivamente *cis*-zeatina, cuja relevância funcional em plantas é questionável e, em alguns casos, espécie-dependente<sup>94</sup>. Por outro lado, a enzima CKX (*CYTOKININ OXIDASE*) catalisa a degradação irreversível deste hormônio, controlando sua homeostase nas células<sup>88</sup>.

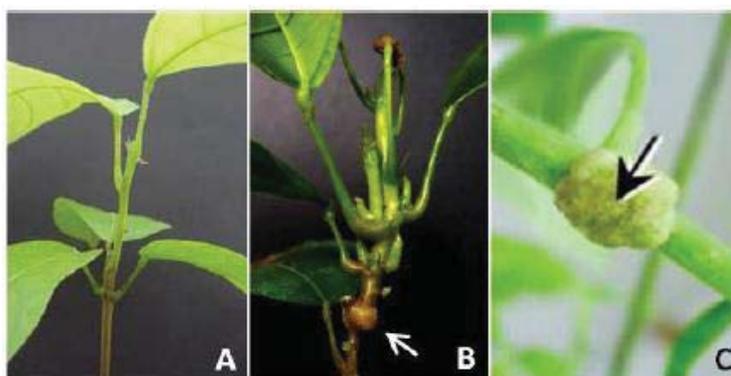
Em plantas, a sinalização por citocininas ocorre através de um mecanismo conhecido como sistema *two-component*, este é constituído tipicamente de três módulos funcionais: CKs são percebidas por (i) receptores de membrana com atividade histidina quinase (HK); em seguida, (ii) proteínas com atividade fosfo-transferase (HPt) transferem o sinal para (iii) reguladores de resposta (RRs) que ativam ou reprimem a transcrição de genes alvos<sup>90,95-97</sup> (Figura II-2). Entre os eucariotos multicelulares, esse sistema é exclusivo de plantas superiores<sup>94</sup>. Em *Arabidopsis sp.* é bem caracterizado e similaridades na arquitetura já foram descritas também em arroz<sup>98-100</sup>.



**Figura II-2: Modelo para via de sinalização de citocininas em *Arabidopsis sp.*** Citocininas se ligam ao domínio extracelular CHASE do receptor, iniciando a sinalização que resulta na fosforilação reguladores de resposta (ARRs), tendo proteínas com atividade fosfo-transferase (HPt) como intermediárias. Resíduos de histidina (H) e aspartato (D) que participam do sistema de fosforilações são indicados em cada proteína. Adaptado de Kieber e colaboradores<sup>97</sup>.

Muitos microorganismos possuem o gene *IPT*, o que lhes confere a habilidade de produzir CKs, sendo este um fator que atribui vantagem para a sua virulência em plantas<sup>40-42,101,102</sup>. O melhor exemplo é a *A. tumefaciens*, que possui uma cópia do gene *IPT* (denominado como *Tmr*) indispensável para sua patogenicidade. Ao infectar diferentes plantas, este gene é inserido via plasmídeo Ti no genoma do hospedeiro, alterando o metabolismo de citocininas e induzindo a formação de estruturas conhecidas como galhas<sup>40</sup>.

Entre os sintomas da Vassoura-de-bruxa, o intumescimento do ramo infectado e a formação do “calo” nas base deste, sugerem que as citocininas possam apresentar um papel importante nesta interação planta-patógeno (Figura II-3). De forma direta, o patógeno poderia alterar os níveis de citocininas através da síntese ativa deste hormônio. Por outro lado, as respostas mediadas por CKs poderiam estar alteradas apenas em resposta à infecção, sem a síntese ativa de CKs pelo patógeno. Por essas razões, o estudo de possíveis genes relacionados ao metabolismo de citocininas em *M. perniciosa*, aliado a caracterização e compreensão do mecanismo de sinalização em *T. cacao*, pode auxiliar a responder se há uma efetiva participação deste hormônio no desenvolvimento da doença.



**Figura II-3: Sintomas da vassoura verde em *T. cacao*.** **A:** Plântula de cacau sadia. **B:** Ramo infectado em estágio de vassoura verde. Notar o calo formado na base do ramo. **C:** Galha formada pela infecção de *Arabidopsis sp.* por *A. tumefaciens*<sup>40</sup>. Notar a semelhança entre calos formados na Vassoura-de-bruxa e a galha formada em *Arabidopsis sp.* após a infecção por *Agrobacterium sp.*

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a participação das citocininas no estabelecimento da infecção e na progressão da doença Vassoura-de-bruxa do cacauero.

### 2.2. Objetivos específicos

- Analisar a morfologia da vassoura verde por microscopia ótica;
- Avaliar *in vitro* se o fungo *M. pernicioso* possui a habilidade de produzir citocininas;
- Caracterizar *in silico* os genes relacionados a sinalização por citocininas em *T. cacao*;
- Avaliar a expressão dos genes relacionados a CKs durante a progressão da doença e a possível relações destes com os sintomas observados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Análise microscópica da vassoura verde

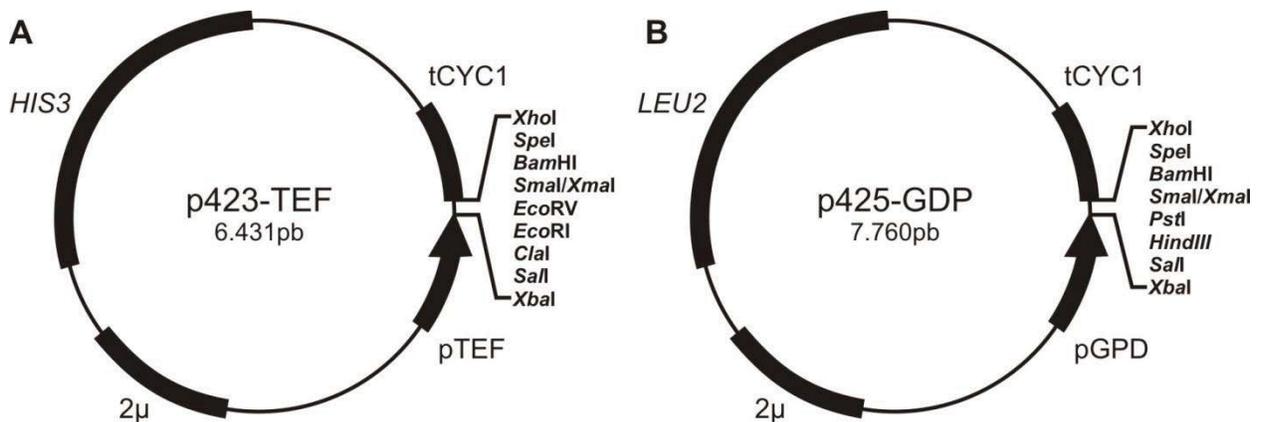
Plântulas sadias e infectadas foram coletadas 35 e 45 DAI (Figura I-4; página 32) para um estudo anatômico destes sintomas (detalhes dos procedimentos de cultivo e inoculação são apresentados na seção 3.4, página 30). Os procedimentos necessários para a confecção de lâminas histológicas foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP, seguindo o protocolo proposto por Johansen<sup>103</sup>.

Após a coleta, o material foi seccionado em pequenos fragmentos com aproximadamente 0,5 milímetros. Um fragmento do caule intumescido, assim como um fragmento do caule da plântula sadia foram fixados por 48 horas em FAA (formaldeído: ácido acético: etanol 50% - 1:1:18v/v). Após a fixação, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de ABT:EtOH (álcool butílico terciário:etanol) (70, 85, 95 e 100%), sendo mantidas por pelo menos 4 horas em cada solução. Após a desidratação, as amostras foram invertidas em recipientes contendo parafina (Paraplast<sup>®</sup> Plus - Merck). Estes foram mantidos em estufa a 60°C até a evaporação do álcool. Três trocas de parafina foram realizadas em intervalos de 12 horas e, após a última troca, as amostras foram montadas em cubos de parafina sólida para microtomia.

Fragmentos foram seccionados transversalmente em micrótomo rotativo (Leica) com 10-12µm de espessura. Os cortes foram distendidos em lâminas de vidro sobre placa aquecedora a 55°C. A parafina foi retirada do material após três lavagens com Xilol por 15min cada. Em seguida, as amostras foram hidratadas em uma série decrescente de etanol (100, 95, 85 e 70%) e coradas com Azul de Toluidina. Lâminas permanentes foram montadas com Permout<sup>®</sup> (Fisher), estas foram observadas em microscópio de luz (Olympus BX51 - Olympus) e fotografadas com câmara digital (DP21 - Olympus) acoplada ao equipamento.

### 3.2. Vetores de expressão utilizados neste trabalho: p423-TEF e p425-GPD

p423-TEF e p425-GPD são dois plasmídeos de um conjunto de vetores compactos desenhados para clonagem e expressão heteróloga constitutiva em *Saccharomyces cerevisiae*<sup>104</sup> (Figura II-4). Nestes plasmídeos, “2” refere-se à origem de replicação de alta cópia 2 $\mu$  (200-300 cópias por célula); “3 e 5” indicam, respectivamente, o gene marcador *HIS3* (histidina) e *LEU2* (leucina); “TEF” refere-se ao promotor do gene *translation elongation factor 1 $\alpha$*  e; “GPD” refere-se ao promotor do gene *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Entre os sítios de restrição únicos, encontram-se *EcoRI* e *XhoI* (Figura II-4). Ambos os vetores possuem a região terminadora do gene *CYC1* (*cytochrome-c oxidase 1*). Para realização deste trabalho, p423-TEF e p425-GPD foram gentilmente enviados pela Dra. Chandra Tucker da Universidade de Duke, EUA (<http://biology.duke.edu/model-system/ymsg/index.html>).



**Figura II-4: Representação esquemática do mapa dos vetores de expressão p423-TEF e p425-GPD.** Estes pertencem a um conjunto de vetores com diferentes promotores, marcadores auxotróficos e origens de replicação. Todos foram desenhados para expressão constitutiva em *S. cerevisiae*<sup>104</sup>. **A:** Mapa do vetor p423-TEF apresentando o gene marcador *HIS3* e o promotor *TEF* (pTEF). **B:** Mapa do vetor p425-GPD demonstrando gene marcador *LEU2* e o promotor *GPD* (pGPD). “2” refere-se a origem de replicação de alta cópia 2 $\mu$ . “3 e 5” indicam, respectivamente, o gene marcador *HIS3* e *LEU2*. Sítios únicos para clonagem para cada plasmídeo são apresentados entre o promotor e terminador. Ambos os vetores possuem a mesma região terminadora, *CYC1* (tCYC).

### 3.3. Meios auxotróficos para o cultivo da linhagem TM182 *sln1*Δ e derivadas

A auxotrofia é uma ferramenta amplamente utilizada para a expressão de genes heterólogos em leveduras. Linhagens de laboratório possuem deleções em genes específicos que as tornam incapazes de crescer na ausência de um composto específico. Isto permite que diferentes plasmídeos, contendo genes complementares aos deletados, possam ser utilizados como vetores para expressar genes de interesse. Dessa forma, meios auxotróficos foram utilizados para: i) selecionar transformantes que contenham o plasmídeo de interesse; ii) proporcionar uma condição seletiva na qual as células mantêm o vetor por todas as gerações.

A linhagem TM182 *sln1*Δ possui o genótipo: *MATα leu2 ura3 his3 sln1::hisG+* pSSP25<sup>105</sup>, onde “*leu2 ura3 his3*” (letras minúsculas) indica que estes não são funcionais nesta linhagem. Estas modificação possuem duas implicações: i) a levedura é incapaz de crescer na ausência de leucina, uracila ou histidina; ii) até três plasmídeos contendo genes marcadores auxotróficos (*LEU2*, *URA3* ou *HIS3*) pode ser utilizados como vetores para expressar genes de interesse. Entretanto, a linhagem TM182 *sln1*Δ possui o plasmídeo pSSP25 que, por sua vez, contém o gene marcador *URA3* (detalhes na seção 3.4; página 65). Por essa razão, os vetores p423-TEF e p425-GPD que possuem, respectivamente, os genes marcadores *HIS3* e *LEU2* (Figura II-4) foram selecionados para este estudo.

Devido a utilização das três marcas, foi imprescindível utilizar meios de culturas com diferentes auxotrofas em todos os procedimentos que envolveram a transformação e cultivo destas linhagens. Neste trabalho, o meio padrão é referido como Gal/YNB/SDO ou Glic/YNB/SDO e é constituído por: 20g/L dextrose (Galactose ou Glicose); 6,7 g/L Yeast Nitrogen base w/o amino acids (Difco) e; 0,67 g/L Synthetic Drop-out Supplements (Sigma)<sup>106</sup>. É importante notar que a composição do SDO pode variar: SDO sem os aminoácido leucina e histidina, por exemplo, é referido como SDO leu-/his-. Quando necessário, alguns meios foram suplementados com citocinina exógena, foi utilizando sempre 10μM de BA (6-

*Benzylaminopurine*). Todos os meios utilizados nos diferentes ensaios com TM182 *sln1Δ* e derivadas são resumidos na tTabela II-1.

**Tabela II-1:** Meios de cultura definidos utilizados nos ensaios com a levedura TM182 *sln1Δ* e derivadas.

Linagem	Plasmídeo (marca auxotrófica)	Meios utilizados
TM182 <i>sln1Δ</i> *	pSSP25 ( <i>URA3</i> )*	Gal/YNB/SDO ura- Glic/YNB/SDO ura-
TM182 <i>sln1Δ AtCRE1</i>	pSSP25 ( <i>URA3</i> ) p415-CYC1- <i>AtCRE1</i> ( <i>LEU2</i> )*	Gal/YNB/SDO ura-/leu- Glic/YNB/SDO ura-/leu- Glic/YNB/SDO ura-/leu- BA
TM182 <i>sln1Δ TchKs/CKIs</i> <sup>+</sup>	pSSP25 ( <i>URA3</i> ) p425-GPD- <i>TchKs/CKIs</i> ( <i>LEU2</i> ) <sup>+</sup>	Gal/YNB/SDO ura-/leu- Glic/YNB/SDO ura-/leu- Glic/YNB/SDO ura-/leu- BA
TM182 <i>sln1Δ AtCRE1 MpIPT</i> <sup>+</sup>	pSSP25 ( <i>URA3</i> ) p415-CYC1- <i>AtCRE1</i> ( <i>LEU2</i> ) p423-TEF- <i>MpIPT</i> ( <i>HIS3</i> ) <sup>+</sup>	Gal/YNB/SDO ura-/leu-/his- Glic/YNB/SDO ura-/leu-/his-

\* Linagem e construções gentilmente enviadas pelo Prof. Tatsuo Kakimoto (*Osaka University*).

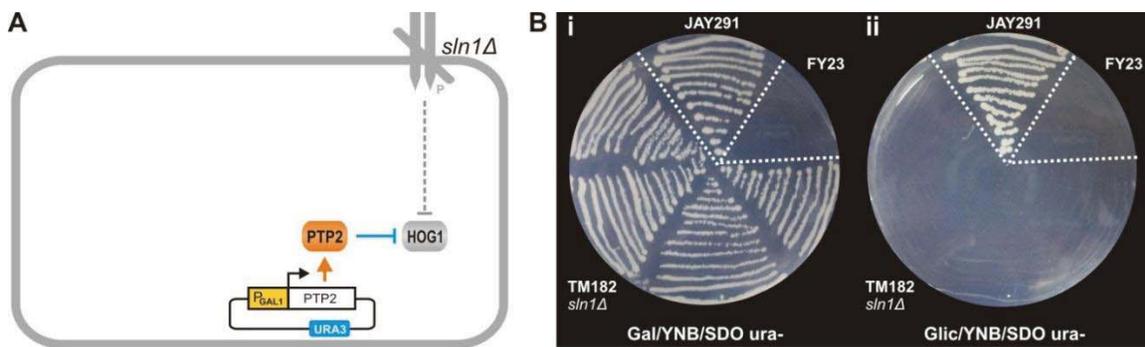
<sup>+</sup> Linhagens e construções desenvolvidas neste trabalho.

Glic: Glicose. Gal: Galactose. YNB: Yeast Nitrogen base w/o amino acids. SDO: Synthetic Drop-out Supplements. ura-: uracila. leu-: leucina. his-: histidina. BA: 6-Benzylaminopurine.

### 3.4. Sistema utilizando leveduras para estudo de genes relacionados a citocininas

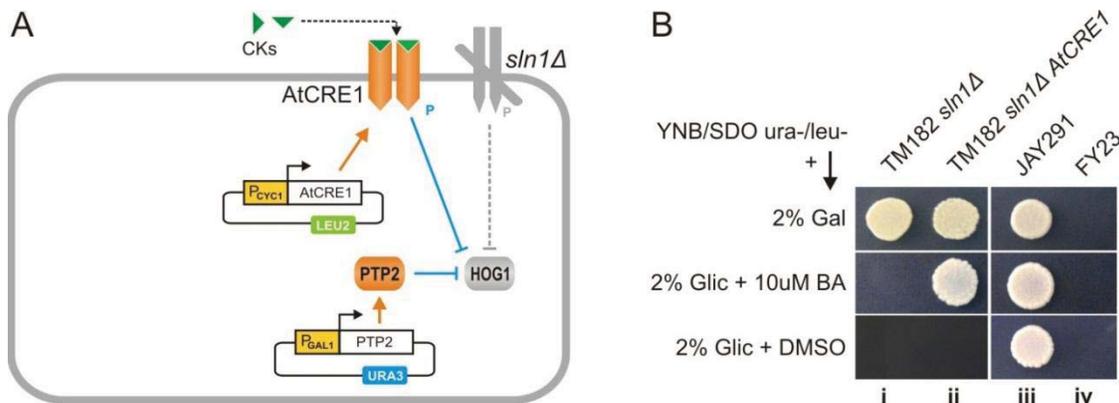
O sistema de complementação utilizando a linhagem TM182 *sln1Δ* (MAT $\alpha$  leu2 ura3 his3 *sln1::hisG*<sup>+</sup> pSSP25)<sup>105</sup> tem sido amplamente utilizado para o estudo de receptores de citocininas<sup>95,106,107</sup> ou genes de síntese<sup>41,108</sup>.

Nesta linhagem, a interrupção do gene *Sln1* (*Histidine kinase osmosensor*) é letal para a levedura, por não ativar a cascata de sinalização que reprime a expressão do gene *HOG1* (*Mitogen-activated protein kinase*). Contudo, a inserção do plasmídeo pSSP25 contendo a construção pGal1-*PTP2*, possibilita que esta linhagem cresça em galactose. Nesta condição, a galactose ativa o promotor pGal1 e a atividade da proteína PTP2p (*Phosphotyrosine*) complementa a ausência do gene *Sln1*<sup>105</sup> (Figura II-5).



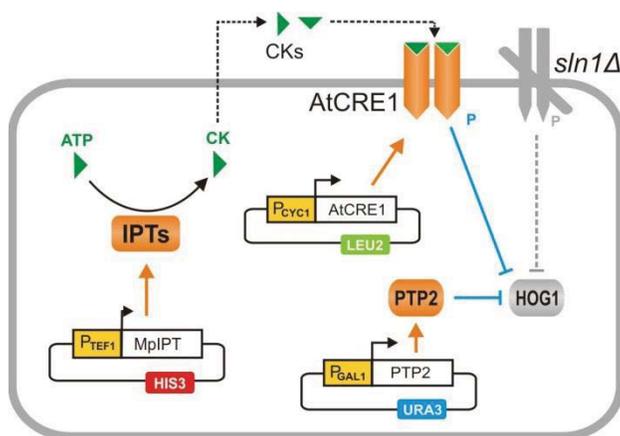
**Figura II-5: Linhagem TM182 *sln1Δ*.** **A:** Representação esquemática do sistema desenvolvido para reprimir a expressão do gene *HOG1* e possibilitar o crescimento da levedura na presença de galactose. **B:** Confirmação do fenótipo. i: Crescimento da linhagem TM182 *sln1Δ* em meio Gal/YNB/SDO ura-. ii: Ausência de crescimento em meio seletivo Glic/YNB/SDO ura-. JAY291 e FY23: levedura selvagem e de laboratório utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Detalhes dos meios de cultura são descritos na secção 3.3, página 64.

Uma vez que a proteína Sln1p possui a atividade de histidina quinase, a inserção do gene codificante para o receptor de citocininas de *Arabidopsis sp.* *AtCRE1* (*CYTOKININ RESPONSE 1*) possibilita que a linhagem TM18 *sln1Δ AtCRE1* retome a habilidade de crescer em glicose desde que o meio de cultura seja suplementado com citocinina<sup>106,107</sup> (Figura II-6). Desta mesma forma, receptores de citocininas de outras plântulas podem ser caracterizados utilizando esta linhagem.



**Figura II-6: Linhagem TM182 *sln1Δ AtCRE1*.** **A:** Representação esquemática da sistema utilizado para a validação funcional do receptor de citocinina de *Arabidopsis sp.* *AtCRE1*. **B:** Confirmação do fenótipo. i: Linhagem TM182 *sln1Δ* cresce apenas em meio Gal/YNB/SDO ura-/leu-. ii: Linhagem TM182 *sln1Δ AtCRE1* cresce em Glic/YNB/SDO ura-/leu- BA. iii e iv: JAY291 e FY23: levedura selvagem e de laboratório utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Detalhes dos meios de cultura são descritos na secção 3.3, página 64. *AtCRE1*: receptor de citocininas de *Arabidopsis sp.* CKs: citocininas. BA: citocinina exógena (*6-Benzylaminopurine*).

Na linhagem TM182 *sln1Δ AtCRE1* a funcionalidade de genes *IPTs* pode ser diretamente avaliada. Quando o gene estudado é funcional para a síntese de citocininas, esta difunde pelo meio e ativa o receptor *AtCRE1* (Figura II-7). Nesta condição, a linhagem retoma a habilidade de crescer em glicose como única fonte de carbono, sem a necessidade de suplementação do meio com citocininas exógenas<sup>41,108</sup>. Neste sistema, genes hipotéticos para a síntese de citocininas podem ser funcionalmente validados.



**Figura II-7: Linhagem TM182 *sln1Δ AtCRE1 IPT*.** Representação esquemática do sistema de complementação desenvolvido para avaliar a funcionalidade de genes para a síntese de citocininas (*IPTs*). *AtCRE1*: receptor de citocininas de *Arabidopsis sp.* CKs: citocininas. *IPTs*: isopentenil transferase.

### 3.5. Caracterização *in silico* de genes similares a *IPT* em *M. pernicioso*

O domínio proteico descrito para a atividade isopentenil transferase (GxTxxGK [ST]xxxxx[VLI]xxxxxxx[VLI][VLI]xxDxxQx{57,60}[VLI][VLI]xGG)<sup>109</sup> foi utilizado como referência na busca preliminar por genes similares a *IPTs* no genoma do fungo *M. pernicioso*, através da ferramenta tBLASTn<sup>110</sup>. “x” denota a ocorrência de qualquer aminoácido na posição indicada; “[ ]” representa a ocorrência de algum dos aminoácidos apresentados entre os colchetes; {57,60} representa a ocorrência dos aminoácidos [VLI][VLI]... 57-60 resíduos após DxxQx. Em seguida, a presença do domínio IPT foi confirmada através da análise de domínios conservados utilizando a ferramenta InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>)<sup>111</sup>.

### **3.6. Tese preliminar para a síntese de citocininas pelo fungo *M. pernicioso***

Após a identificação do gene *MpIPT*, a habilidade do fungo *M. pernicioso* para sintetizar citocininas foi avaliada, utilizando a linhagem TM18 *sln1Δ AtCRE1* em duas abordagens. i) Leveduras foram plaqueadas sucessivamente no meios Gal/YNB/SDO ura-/leu- e Glic/YNB/SDO ura-/leu- suplementado com 10% de sobrenadante de culturas de hifas biotróficas (seção 3.2.3; página 29). Placas foram mantidas a 30°C por 48-72h. ii) TM18 *sln1Δ AtCRE1* e o fungo *M. pernicioso* foram co-cultivados em meio líquido Gal/YNB/SDO ura-/leu- e Glic/YNB/SDO ura-/leu-. As culturas foram mantidas em agitação (150rpm) a 30°C por 48-72h.

### **3.7. Extração de RNA total de *M. pernicioso* para amplificação do gene *MpIPT***

Para obtenção de RNA total do fungo, o RNeasy Mini Kit (Qiagen) foi utilizado seguindo as instruções do fabricante. Micélios necrotróficos crescidos *in vitro* foram pulverizados em nitrogênio líquido utilizando almofariz e pistilo. Aproximadamente 100mg de material foi transferido para tubos de 2mL (do tipo *ependorf*) contendo 450μL de tampão RLT. Após homogeneização vigorosa (vórtex), o material foi transferido para a coluna de purificação (*QIAshredder spin column*). Após centrifugação por 2min a 8.000xg, o sobrenadante do tubo de coleta foi transferido para a segunda coluna (*RNeasy spin column*) e esta foi centrifugada por 15s a 8.000xg. 700μL de tampão RW1 foram adicionados a *RNeasy spin column* e esta foi novamente centrifugada por 15s a 8.000xg. Em seguida, duas lavagens com 500μL de tampão RPE foram realizadas. No último passo, o RNA foi eluído em 30μL de água DEPC.

### **3.8. Síntese de cDNA para amplificação e clonagem do gene *MpIPT***

O cDNA foi sintetizado a partir de RNA total em três etapas: i) o *mix* contendo aproximadamente 2μg de RNA e 50ng pdN6 (*Random primer*) (LifeTechnologies) foi mantido a 70°C por 10min; ii) 1X First Strand Buffer, 10mM dTT, 20U RNaseOUT e 0,5mM dNTP foram adicionados ao *mix* e este foi mantido a 25°C por 2min. iii) 200U de SuperScriptII®

(LifeTechnologies) foi adicionado e a reação foi mantida a 25°C por 10min, 42°C por 70min, 70°C por 15min e a 4°C por 5min. Alíquotas de 2µL foram armazenadas a -80°C.

### 3.9. Amplificação do gene *MpIPT* para clonagem no vetor de expressão p423-TEF

O gene *MpIPT* foi amplificado a partir de cDNAs previamente sintetizados utilizando os *primers* direto: *MpIPT\_EcoRI\_F* 5' GAATTCATGGCTTTCCGAC CTTTAATCG 3'; e reverso: *MpIPT\_XhoI\_R* 5' CTCGAGCTAGCTTGACACATTTGCATCTG 3'. Nucleotídeos sublinhados denotam a sequência referente aos sítios de restrição para *EcoRI* e *XhoI*, apropriados para clonagem no vetor de expressão p423-TEF (seção 3.10, página 69). 10-50ng de cDNA foram utilizados na reação de amplificação contendo: 1X *Phusion HF Buffer*, 0,5µM *primers*; 200 µM dNTPs, 1U *Phusion* DNA polimerase (New England BioLabs®). Após a desnaturação inicial a 98°C por 1min30s, 35 ciclos de amplificação incluíram: desnaturação a 98°C por 20s, anelamento a 55°C por 15s e extensão a 72°C (30s para cada 1.000 pares de bases). A especificidade e integridade do produto amplificado foram avaliadas em gel de agarose 1%.

### 3.10. Clonagem do gene *MpIPT* no vetor de expressão p423-TEF

Como descrito previamente, o gene *MpIPT* foi amplificado utilizando *primers* contendo os sítios de restrição para *EcoRI* e *XhoI* (seção 3.9; página 69). Para verificar a presença de mutações derivadas da amplificação, o produto da *PCR* foi inicialmente clonado utilizando o sistema de clonagem pGEM®-T Easy (Promega) com seguinte parâmetros: 1X *Rapid Ligation Buffer*; 50ng pGEM®-T Easy Vector; 3U *T4 DNA Ligase*; 70ng *MpIPT* (inserto); por 14-16 horas (*overnight*) a 4°C. Após transformação em *E. coli* (seção 3.17; página 75), colônias brancas foram selecionadas em meio LB Amp/X-gal/IPTG (10g/L Triptona; 5g/L Extrato de levedura; 5g/L NaCl, 15g/L ágar; 100µg/mL ampicilina; 80µg/mL X-Gal; 0,5mM IPTG). Plasmídeos foram extraídos por lise alcalina (seção 3.18; página 75) e posteriormente sequenciados (seção 3.19; página 76).

Após a confirmação da inexistência de mutações, o gene *MpIPT* foi transferido por digestão para o vetor p423-TEF. A construção pGEM-*MpIPT* e o vetor p423-TEF foram digeridos utilizando: 1X *Buffer O*; 5U *EcoRI*; 5U *XhoI* (Fermentas); 5µg DNA; por 3 horas a 37°C. Em seguida, o gene *MpIPT* foi transferido para o vetor p423-TEF utilizando: 1X *Ligation Buffer*; 100ng p423-TEF; 5U *T4 DNA Ligase* (Promega); 70ng *MpIPT*; por 14-16 horas (*overnight*) a 4°C. Novas bactérias foram transformadas e selecionadas em meio LB amp (10g/L Triptona; 5g/L Extrato de levedura; 5g/L NaCl, 15g/L ágar; 100µg/mL ampicilina). Plasmídeos foram extraídos e confirmados por digestão com *EcoRI* e *XhoI* (1X *Buffer O*; 1U *EcoRI*; 5U *XhoI* (Fermentas); 1µg DNA; por 3 horas a 37°C). A cada procedimento, o tamanhos dos vetores e inserto foram confirmados em gel de agarose 1%. Bandas foram extraídas do gel utilizando o Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

### **3.11. Transformação da levedura TM182 *sln1Δ AtCRE1* com o gene *MpIPT***

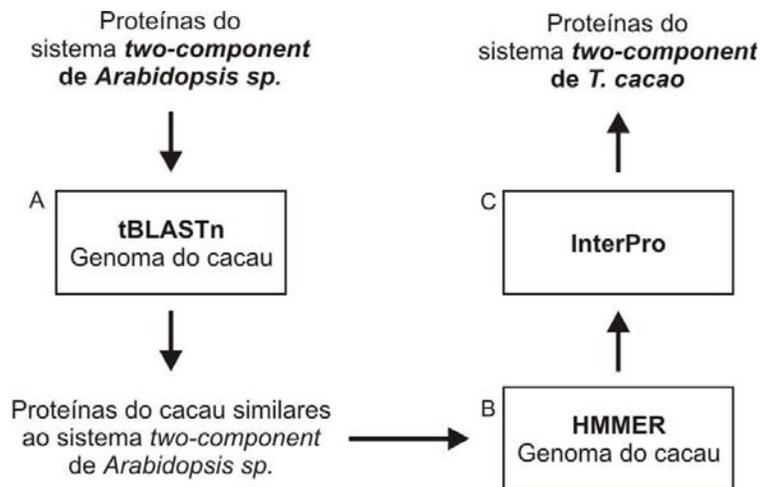
Para realizar o teste de complementação do gene *MpIPT*, a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* TM182 *sln1Δ AtCRE1* (seção 3.4; página 65) foi transformada com a construção p423-TEF-*MpIPT*, seguindo os procedimentos estabelecidos por Gietz e colaboradores<sup>112</sup>. 300 mL de cultura crescida em Gal/YNB/SDO ura-/leu- ( $OD_{600} = 0,4-0,6$ ) foram centrifugados a 1.000x g por 5min a temperatura ambiente (21°C). O *pellet* foi sucessivamente centrifugado e lavado duas vezes com água MilliQ estéril. As células foram ressuspensas em 1mL de 1X LiAc/1X TE (0,1M LiAc; 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5). A transformação foi realizada com 100-200ng de plasmídeo e 0,1mg de DNA de esperma de salmão (Life Technologies) em 100µL de leveduras competentes. Em seguida, 600µL de PEG/LiAc (40% PEG 4000; 1X TE; 1X LiAc) foram adicionados. Após homogeneização vigorosa (vórtex), as células foram mantidas em agitação (200 rpm) por 1h a 30°C. 70µL de DMSO foram adicionados e, em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico (15min a 42°C e 2min no gelo). Células foram plaqueadas em meio Gal/YNB/SDO ura-/leu-/his- e mantidas a 30°C por 48-72h (detalhes do meio de cultura são descritos na seção 3.3; página 64).

### 3.12. Teste de complementação do gene *MpIPT*

Leveduras contendo o gene *MpIPT* (linhagem TM182 *sln1Δ AtCRE1 MpIPT*) foram plaqueados simultaneamente em meios Gal/YNB/SDO ura-/leu-/his e Glic/YNB/SDO ura-/leu-/his- (seção 3.3; página 64). Placas foram mantidas a 30°C e analisadas após 48-72 horas.

### 3.13. Caracterização *in silico* de proteínas do sistema *two-component* em *T. cacao*

O sistema *two-component* é constituído por três famílias proteicas que atuam como módulos funcionais na percepção, transdução e ativação de genes de resposta a citocininas. As proteínas que constituem este sistema no cacau foram identificadas *in silico* utilizando três abordagens complementares (Figura II-8): i) busca preliminar por similaridade em aminoácidos através da ferramenta tBLASTn<sup>110</sup>; ii) identificação e busca por similaridade de domínios proteicos através o *software* HMMER<sup>113</sup> e; iii) anotação dos domínios funcionais descritos para as proteínas constituintes do sistema *two-component* utilizando InterPro<sup>111</sup>.



**Figura II-8: Análises realizadas para caracterizar *in silico* o sistema *two-component* em *T. cacao*.** **A:** Uso da ferramenta tBLASTn para busca por proteínas do cacau similares às do sistema *two-component* de *Arabidopsis sp.* **B:** Uso da ferramenta HMMER para busca de domínio proteicos conservados utilizando as sequências de cacau previamente identificadas como referência. **C:** Anotação de domínios funcionais relacionados ao sistema *two-component*.

Em *Arabidopsis sp.* o sistema *two-component* é bem caracterizado<sup>114</sup>. Por essa razão, as 53 proteínas que constituem este sistema foram obtidas a partir do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) e utilizadas como referência para uma busca preliminar por proteínas similares no cacau (Figura II-8a). Para aumentar a possibilidade de identificar todos os possíveis constituintes do sistema *two-component* em cacau foi realizada uma análise utilizando a ferramenta HMMER (<http://hmmer.janelia.org/>). Esta consiste na definição de domínios proteicos conservados presentes no conjunto de proteínas do cacau previamente identificado. Em seguida, a mesma ferramenta realiza a busca por novas sequências possuindo estes domínios (Figura II-8b). A terceira etapa de caracterização constituiu na anotação de domínios funcionais relacionados ao sistema *two-component* utilizando a ferramenta InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) (Figura II-8c). Todas as proteínas identificadas nas etapas anteriores foram analisadas individualmente e, assim, as prováveis proteína do sistema *two-component* de cacau foram definidas.

### **3.14. Extração de RNA e síntese de cDNA para amplificação dos receptores de CKs**

Amostras de caule de plântulas de cacau foram coletadas e o RNA total foi extraído de acordo com os procedimentos descritos na seção 3.6, página 33. Moléculas de mRNA foram isoladas a partir de 3ug de RNA total utilizando Dynabeads® (LifeTechnologies). cDNA foi sintetizado a partir de ~70µg de mRNA seguindo os procedimentos descritos na seção 3.8, página 68.

### **3.15. Amplificação dos receptores de citocininas para clonagem no vetor p425-GPD**

O *primers* utilizados neste procedimento são apresentados na Tabela II-2. Estes são constituídos por três partes imprescindíveis para a técnica de clonagem utilizada (seção 3.16; página 73). i) extremidade 5' homóloga a sequência do vetor p425-GPD (20-24 nucleotídeos); ii) sítio de restrição para as enzimas *Bam*HI ou *Xma*I; iii) homologia ao gene a ser amplificado.

Os genes *TcHK1-TcHK4*, *TcCKI1a-b* e *TcCKI2* preditos com possíveis receptores de citocininas, foram amplificados através da técnica de *Touchdown PCR*<sup>115</sup>. 1X *Phusion HF Buffer*, 0,5µM *primers*, 200 µM dNTPs, 1U *Phusion* DNA polimerase e 0,5µL cDNA foram utilizados na reação. Após desnaturação inicial a 98°C por 1min30s, foram realizados 10 ciclos de desnaturação a 98°C por 20s, anelamento a 70°C (-1°C a cada ciclo) por 5s e extensão a 72°C (30s para cada 1.000 pares de bases); seguidos de 20 ciclos de desnaturação a 98°C por 20s, anelamento a 60°C por 5s e extensão a 72°C (30s para cada 1.000 pares de bases); finalizando com 7 min de extensão final. A especificidade e integridade do produto amplificado foram avaliadas em gel de agarose 0,7%.

**Tabela II-2:** *Primers* utilizados na amplificação dos genes preditos como possíveis receptores de citocininas em *T. cacao*.

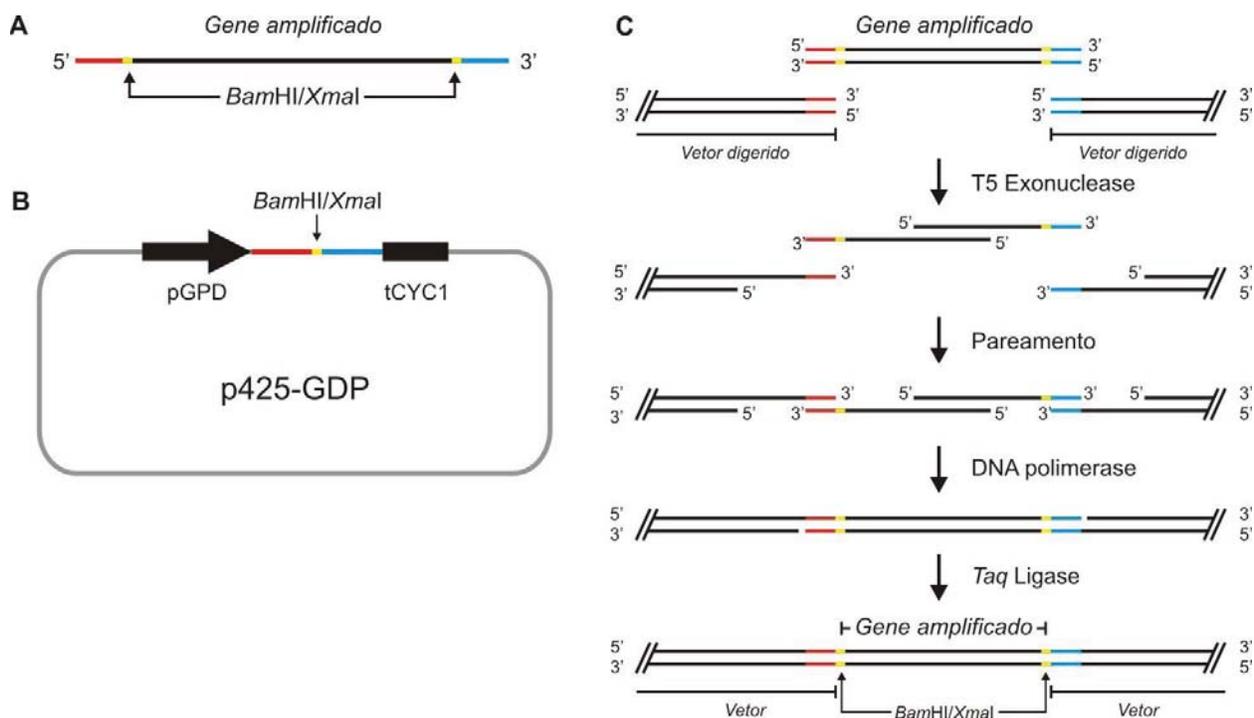
Gene	Primer	Sequência 5'-3'
<i>TcHK1</i>	GB1F_ <i>Bam</i> HI	<u>GTTTCGACGGATTCTAGAACTAGT</u> <b>GGATCC</b> ATGGCAGAAAAAGCATTG
	GB1R_ <i>Bam</i> HI	TCGAATTCCTGCAGCCCGGG <b>GGATCC</b> TTAGGCTGATCTTTTGGTGAGTG
<i>TcHK2</i>	GB2F_ <i>Xma</i> I	ACGGATTCTAGAACTAGTGGATCC <b>CCCGGG</b> GATGAGTTGTTCTTCTGGAA
	GB2R_ <i>Xma</i> I	TTGATATCGAATTCCTGCAG <b>CCCGGG</b> CCCACTCTATCAACCAGACTC
<i>TcHK3</i>	GB3F_ <i>Bam</i> HI	<u>GTTTCGACGGATTCTAGAACTAGT</u> <b>GGATCC</b> ATGAGTCTTCTCCATGTAT
	GB3R_ <i>Bam</i> HI	TCGAATTCCTGCAGCCCGGG <b>GGATCC</b> CTATTGGAAAATCGTGAAACTT
<i>TcHK4</i>	GB4F_ <i>Xma</i> I	ACGGATTCTAGAACTAGTGGATCC <b>CCCGGG</b> GATGGGTCTTAAGCAGCAGC
	GB4R_ <i>Xma</i> I	TTGATATCGAATTCCTGCAG <b>CCCGGG</b> GCTATGAGTCTGAGATGGGTTTGG
<i>TcHK5/CK12</i>	GB5F_ <i>Bam</i> HI	<u>GTTTCGACGGATTCTAGAACTAGT</u> <b>GGATCC</b> ATGGTTTGTGAGATGGAGA
	GB5R_ <i>Bam</i> HI	TCGAATTCCTGCAGCCCGGG <b>GGATCC</b> TCATGGCAAATACTGTTCAAGAC
<i>TcCKI1a</i>	GB6F_ <i>Xma</i> I	ACGGATTCTAGAACTAGTGGATCC <b>CCCGGG</b> GATGCAGGCATTGCTGATATTG
	GB6R_ <i>Xma</i> I	TTGATATCGAATTCCTGCAG <b>CCCGGG</b> GCTACATCCTTTTGTGGTGGATG
<i>TcCKI1b</i>	GB7F_ <i>Xma</i> I	ACGGATTCTAGAACTAGTGGATCC <b>CCCGGG</b> GATGCTGACCAAACAACTA
	GB7R_ <i>Xma</i> I	TTGATATCGAATTCCTGCAG <b>CCCGGG</b> GTTTCATTTACTATCGATCCTTTG

Nucleotídeos sublinhados referem-se a região do *primer* com homologia à sequência do vetor p425-GPD.  
Nucleotídeos em negrito referem-se aos sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI ou *Xma*I.

### 3.16. Clonagem dos receptores de citocininas no vetor p425-GPD

Um método desenvolvido recentemente por Gibson e colaboradores<sup>116</sup> foi utilizado para clonar os genes *TcHK1-TcHK4*, *TcCKI1a-b* e *TcCKI2* diretamente no vetor p425-GPD<sup>104</sup>. O plasmídeo foi linearizado com as enzimas de restrição *Bam*HI ou *Xma*I. Vetor e produtos das *PCRs* (50-100ng para cada 6.000 bases) foram adicionados a reação contendo: 1X *Isothermal*

Buffer, 10U *Taq* Ligase, 1U *T5* Exonuclease e 1U *Phusion* DNA Polymerase. Esta foi e mantida a 50°C por 1h. A montagem ocorre através da atividade sequencial das três enzimas presentes na reação: i) *T5* Exonuclease degrada as extremidades 3' gerando grandes bordas coesivas e homólogas entre o vetor e o inserto; ii) *Phusion* DNA polimerase preenche os espaços entre os fragmentos pareados e; iii) *Taq* Ligase une os fragmentos (Figura II-9). Em seguida, a reação foi dialisada e transformada em *E. coli*. Clones positivos foram selecionados em LB amp (10g/L Triptona; 5g/L Extrato de levedura; 5g/L NaCl, 15g/L ágar; 100µg/mL ampicilina). Plasmídeos foram extraídos por lise alcalina (seção 3.18; página 75) e os insertos foram digeridos com *Bam*HI ou *Xma*I (Fermentas) para confirmação preliminar da clonagem. 1µg de DNA foi digerido em 1X *Buffer Unique*, 1U *Bam*HI ou *Xma*I, a 37°C por 3 horas. O resultado foi observado em gel de agarose 0,7%. Em seguida, os genes foram sequenciados para verificar a existência de quaisquer problemas na sequência (seção 3.19; página 76).



**Figura II-9: Método utilizado para clonar os receptores de citocininas no vetor p425-GPD. A:** Representação esquemática do resultado da amplificação do gene de interesse. Notar a presença de regiões homólogas ao vetor p425-GPD e dos sítios de restrição para *Bam*HI ou *Xma*I. **B:** Representação esquemática do vetor p425-GPD. **C:** Resumo da reação de montagem. T5 exonuclease cria bordas coesivas que possibilitam o pareamento de sequências homólogas. DNA polimerase preenche os espaços entre os fragmentos pareados. Taq Ligase sela os fragmentos.

### 3.17. Procedimentos para transformação de bactérias

*Escherichia coli* DH10 $\beta$  (Life Technologies) foi utilizada em todos os procedimentos de clonagem ou propagação de DNA plasmidial. Células eletrocompetentes foram preparadas seguindo o protocolo proposto por Sambrook e Russell<sup>117</sup>. Resumidamente, 1L de cultura ( $OD_{600} = 0,35-0,4$ ) foi centrifugado a 1.000x g por 5min a 4°C. O *pellet* foi sucessivamente centrifugado e lavado duas vezes com água MilliQ estéril e duas vezes com glicerol 10%. Ao final das lavagens as células foram ressuspensas em 1mL GYT (10% v/v Glicerol; 0,125% p/v Extrato de levedura; 0,25% p/v Triptona). Alíquotas de 40 $\mu$ L foram congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C. Cubetas de 2,5mm foram utilizadas para a eletroporação utilizando Gene Pulser Xcell Electroporation System com parâmetros ajustados para *E. coli* (C=25 $\mu$ F; PC=200ohm; V=2.5kV) (BioRad<sup>®</sup>). Células foram recuperadas em 1mL de meio LB (10g/L Triptona; 5g/L Extrato de levedura; 5g/L NaCl, 15g/L ágar) e mantidas a 37°C por 1h. 50-200 $\mu$ L foram plaqueados em meio meio LBamp (10g/L Triptona; 5g/L Extrato de levedura; 5g/L NaCl, 15g/L ágar; 100 $\mu$ g/mL ampicilina) e as placas foram mantidas a 37°C por 14-16h (*overnight*).

### 3.18. Extração de plasmídeos por lise alcalina

Plasmídeos foram extraídos de *E. coli* utilizando os procedimentos de lise alcalina descritos por Birnboim e Doly<sup>118</sup>. 3mL de culturas crescidas por 14-16 horas (*overnight*) foram centrifugadas em tubos de 1,5mL (do tipo *ependorf*) por 3min a 20.000xg. O sobrenadante foi descartado, em seguida, a lise e a precipitação de *debris* celulares foi realizada pela adição de 300 $\mu$ L de “solução P1” (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 100  $\mu$ g/mL RNase A), 300 $\mu$ L de “solução P2” (1% SDS, 0,2 M NaOH) e 300 $\mu$ L de “solução P3” (3.0 M Acetato de Potássio, pH 5,5), mantendo intervalos de 5-10min entre a adição de cada solução. Após centrifugação por 15min a 20.000xg, o sobrenadante foi transferido para tubos novos (~900 $\mu$ L). 500 $\mu$ L de isopropanol 100% foram adicionados e o DNA foi precipitado por centrifugação a

20.000xg por 15min. O *pellet* foi lavado com 700µL de etanol 70% e ressuspendido com 10-30µL de água-DEPC. A cada extração o DNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific).

### 3.19. Sequenciamento do gene *MpIPT* e dos receptores de citocininas de *T. cacao*

Os procedimentos de clonagem do gene *MpIPT* e dos receptores de citocininas do cacau (*TcHK1-TcHK4*, *TcCKI1a-b* e *TcCKI2*) incluíram uma etapa de sequenciamento para verificar a ocorrência de diferenças entre as sequências preditas e as clonadas, que poderiam comprometer a expressão desses genes nos testes de complementação propostos.

Foi utilizado o sequenciador Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (POP-7™ Polymer; Capillary Array, 50cm) (Life Technologies®). Para cada amostra, a reação de sequenciamento foi constituída por: 1X BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies®); 1,6 µM *primer* e 200-500ng DNA. Após desnaturação inicial a 94°C por 2min, foram realizados 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 20s, anelamento a 55°C por 30s e extensão a 60°C por 2min. A precipitação foi realizada com isopropanol 60%, seguida de uma lavagem com 200µL de etanol 70%. O DNA foi ressuspendido em 10µL de formamida e desnaturado a 95°C por 5 minutos.

Diversos *primers* foram construídos para o sequenciamento de cada gene devido ao tamanho das sequências (Tabela II-3). *MpIPT* foi sequenciado enquanto clonando em pGEM®-T Easy. Por essa razão, *primers* específicos para a sequência deste vetor foram utilizados para sequenciar com qualidade as extremidades 5' e 3' deste gene (Tabela II-3a). Os receptores de citocininas (*TcHK1-TcHK4*, *TcCKI1a-b* e *TcCKI2*) foram sequenciados após serem clonados no vetor p425-GPD. Da mesma forma, *primers* específicos para a sequência deste vetor foram utilizados (Tabela II-3b). A amplificação do gene *TcCKI1b* não funcionou e, por essa razão, não foram construídos *primers* para este gene (detalhes na seção 4.4; página 96).

**Tabela II-3:** *Primers* utilizados no sequenciamento do gene *MpIPT* e dos receptores de citocininas identificados em *T. cacao*.

#	Descrição/objetivo	Primer	Sequência 5'-3'
<b>a</b>	Sequenciamento do gene <i>MpIPT</i> clonado em <i>pGEM<sup>®</sup>-T Easy</i>	MpIPT_ATG_F	ATGGCTTTCCGACCTTTAATCG
		MpIPT_STOP_R	CTAGCTTGACACATTTGCATCTG
		MpIPT_SEQ1_F	CCGTGTTTCGACCACGTTTCAG
		MpIPT_SEQ2_R	CTCCACCATCTTATCCACCCG
		MpIPT_SEQ3_R	GATTCTGGCGCCCTTCCAGG
		pUC/M13 Forward*	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
		pUC/M13 Reverse*	TCACACAGGAAACAGCTATGAC
<b>b</b>	Sequenciamento do receptores de clonados no vetor p425-GPD	GPD_SEQ_F	CCTTCTGCTCTCTCTGATTTGG
		CYC1_SEQ_R	GGGACCTAGACTTCAGGTTGTC
<b>c</b>	Sequenciamento do gene <i>TcHK1</i>	HK1_ATG_F	ATGGCAGAAAAAGCATTGAAAC
		HK1_STOP_R	TTAGGCTGATCTTTTGGTGAGTG
		HK1_SEQ1_F	GAGGGTACTTACTGGCTAC
		HK1_SEQ2_R	CCACATGAACCACATGACC
		HK1_SEQ3_F	GCACAGTGTAGCAGTGATCC
		HK1_SEQ4_R	CAGATGCTTCCAAAGTGGGTAC
<b>d</b>	Sequenciamento do gene <i>TcHK2</i>	HK2_ATG_F	ATGAGTTGTTCTTCTGGAAGTG
		HK2_STOP_R	ACTCTATCAACCAGACTC
		HK2_SEQ1_F	GTTCTTCACTCAGAGAGGGAGC
		HK2_SEQ2_R	CTGTCAGGCAATCTTGACC
		HK2_SEQ3_R	CTCCACCTGTCCACCACTGG
		HK2_SEQ4_F	CGAGCTGAGGTTACAAGATACC
		HK2_SEQ5_R	GCAAATGCACCTTGTGCCAC
<b>e</b>	Sequenciamento do gene <i>TcHK3</i>	HK3_ATG_F	ATGAGTCTTCTCCATGTATTTGG
		HK3_STOP_R	CTATTGGAAAAATCGTGAAGCTTCC
		HK3_SEQ1_F	GGAACGAACTGCTTTTGAGAGG
		HK3_SEQ2_F	GGACTAAGCATAAGCAAGTG
		HK3_SEQ3_F	GTCTGGGAAGCTAGAGCTCG
		HK3_SEQ4_R	CTGCCAACTCAACTCCTTTGTC
<b>f</b>	Sequenciamento do gene <i>TcHK4</i>	HK4_ATG_F	ATGGGTCTTAAGCAGCAGCAG
		HK4_STOP_R	CTATGAGTCTGAGATGGGTTTGG
		HK4_SEQ1_F	GCTGTCTTAACAAGCCC
		HK4_SEQ2_F	GTTCCAGCAATGGTTAAGGG
		HK4_SEQ3_R	GAAGGAATCCCAACTGTTCC
		HK4_SEQ4_F	CAGAAATGGATGGGTTTGAGGC
		HK4_SEQ5_R	TCACCCTTTCTGGCAGACCC
<b>g</b>	Sequenciamento do gene <i>TcHK5/TcCKI2</i>	CKI2_ATG_F	ATGGTTTGTGAGATGGAGACGG
		CKI2_STOP_R	TCATGGCAAATACTGTTCAAGAC
		CKI2_SEQ1_F	GACCGAGAGCAAAGACAG
		CKI2_SEQ2_R	CGTGGTCGGAATTTTGTAGC
		CKI2_SEQ3_F	GACACTGGAATTGGAATACC
		CKI2_SEQ4_F	GATGAAGCAGATAGGCCACACG
		CKI2_SEQ5_R	CATCAGGACGGCATAACAGACATC
<b>h</b>	Sequenciamento do gene <i>TcCKI1a</i>	CKI1A_ATG_F	ATGCTGACCAAACAAACTAG
		CKI1A_STOP_R	GTTCAATTAATCGATCCTTTG
		CKI1A_SEQ1-F	CCACTGTTGCTATGGATGG
		CKI1A_SEQ2-F	GTCCAATCTATTGTGCGCCTG
		CKI1A_SEQ3_R	GGTTGACATGCGGTAAGCAG

\*Promega; "ATG": *primers* específicos para o início do gene; "STOP": *primers* específicos para o fim do gene; "SEQ": *primers* "internos". F: *primer* direto; R: *primer* reverso.

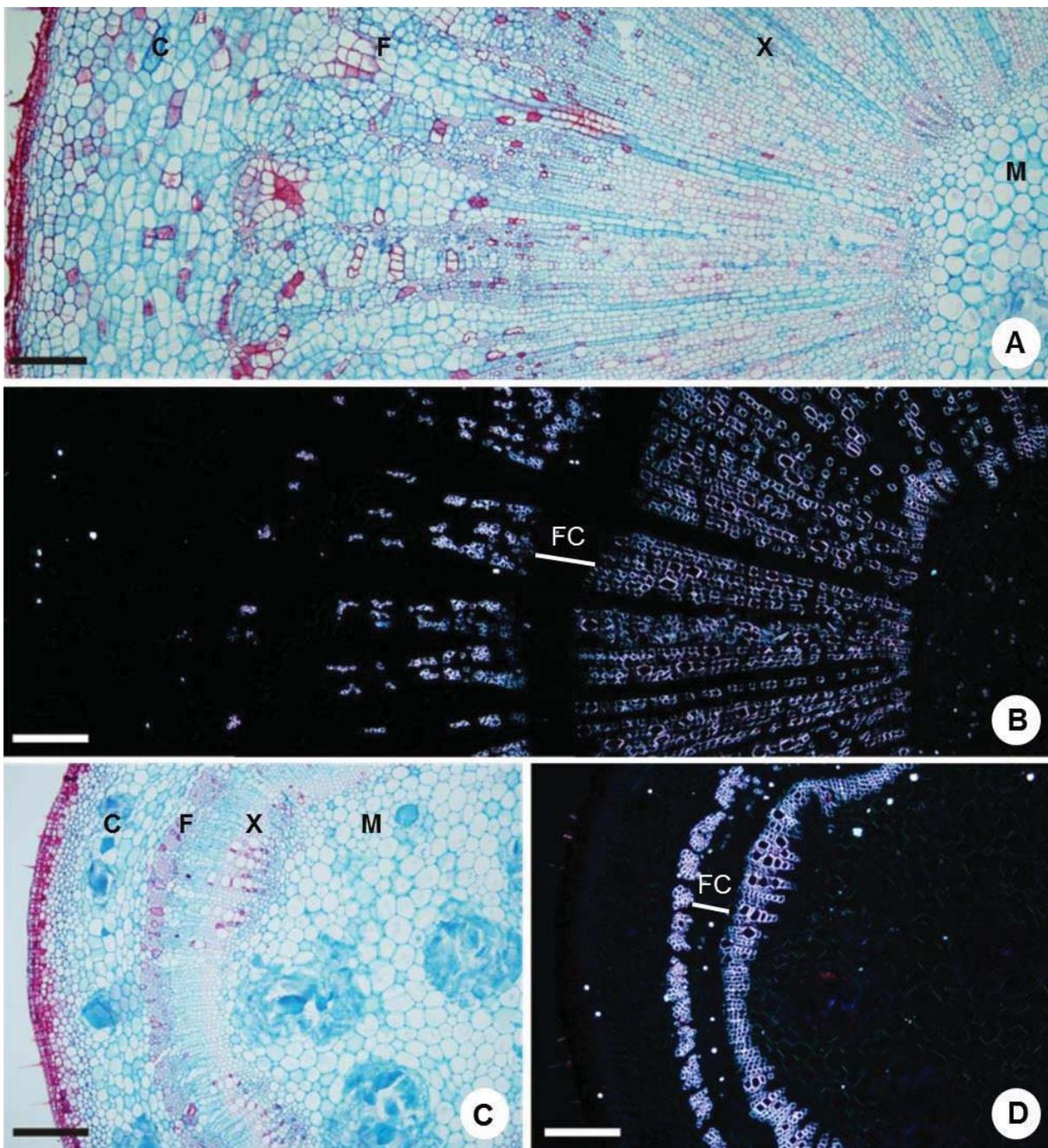
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. O intumescimento da vassoura verde é determinado pelo tecido vascular

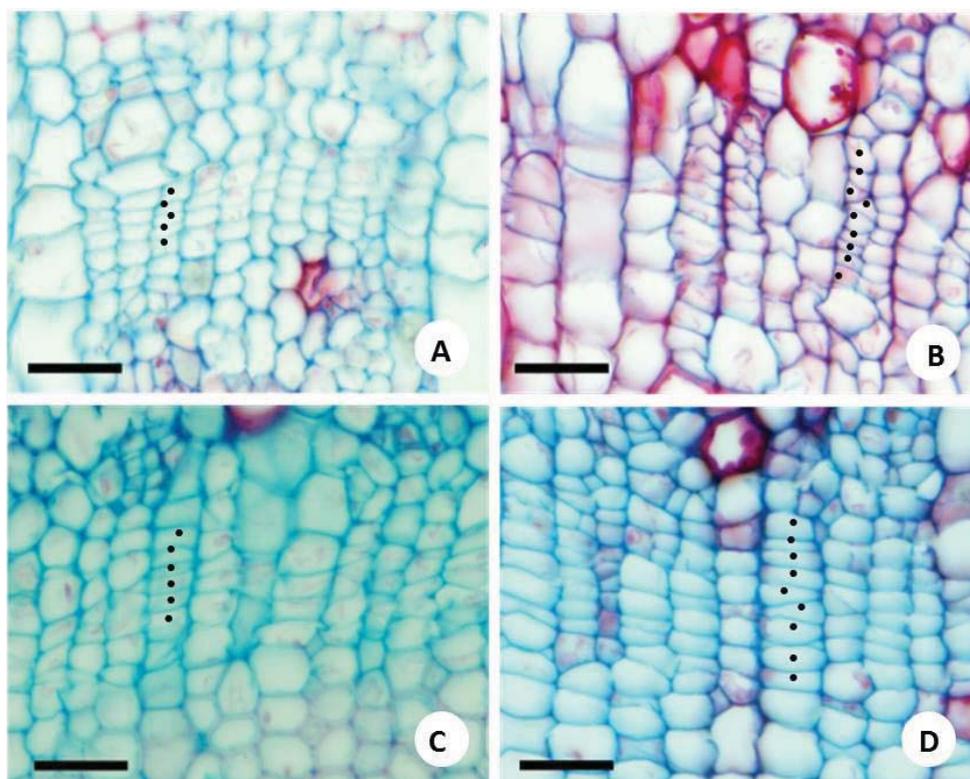
A estrutura microscópica da vassoura verde foi avaliada através da confecção de lâminas histológicas do ramo infectado e da comparação deste com o ramo sadio. A análise de cortes histológicos mostrou que o intumescimento observado é predominantemente determinado pelo crescimento excessivo do xilema secundário (Figura II-10). Além disso, foi observado um aumento no número de células na faixa cambial do tecido infectado em relação ao controle, indicando a maior atividade do cambio vascular na vassoura verde (Figura II-11).

Curiosamente, estas alterações foram observadas independentemente em mutantes de *Arabidopsis sp.* e *Populus sp.* No primeiro exemplo, Matsumoto-Kitano e colaboradores<sup>119</sup> comprovaram que a atividade do cambio vascular requer citocininas. Utilizando o mutante quádruplo para a síntese de este hormônio (*atipt1;3;5;7*), no qual não há formação dos feixes vasculares (xilema e floema), os autores demonstraram que o fenótipo selvagem é restaurado com a aplicação de citocinina exógena. No segundo exemplo, Nieminen e colaboradores<sup>92</sup> demonstraram que ao aumentar a expressão do gene *CKX2*, o número de camadas de células constituintes da zona cambial é reduzido em relação ao controle, devido à menor disponibilidade de citocininas ativas nas células.

Na fase avançada da Vassoura-de-bruxa, especialmente na vassoura verde, o intumescimento, a formação de um calo na base do ramo infectado e, como demonstrado neste trabalho, o crescimento excessivo dos tecidos vasculares provavelmente resultante de uma maior atividade do cambio vascular, sugerem que as citocininas possam desempenhar um importante papel no desenvolvimento dos sintomas da Vassoura-de-bruxa.



**Figura II-10: Secções transversais da base de caules de plântulas de *T. cacao* sadio e infectado por *M. perniciosa* aos 45 dias após inoculação (DAI). A-B: Plântula infectada. C-D: Plântula sadio. O aumento da atividade do câmbio vascular nas plântulas infectadas promove o aumento do diâmetro do ramo em secção transversal (A-B), sendo responsável pelo espessamento observado nas Vassouras Verdes. Nota-se que a faixa cambial é mais larga em plântulas infectadas (B, barra branca) do que em plântulas sadias (D, barra branca). A e C: Cortes observados em luz branca. B e D: Cortes observados em luz polarizada. Escalas=200µm.**

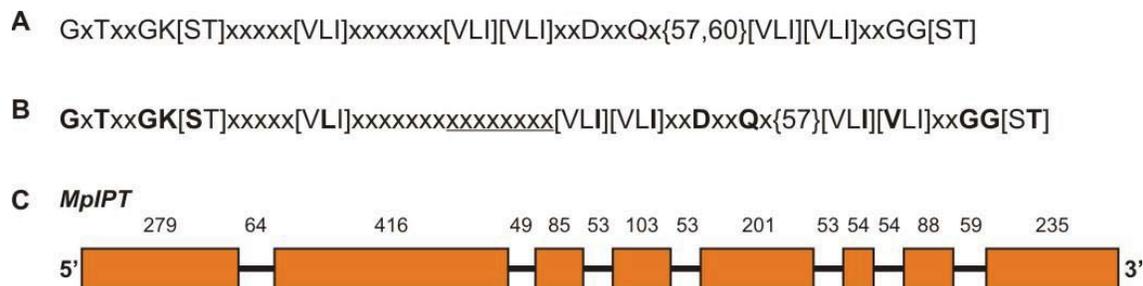


**Figura II-11: Detalhe do câmbio vascular em plântulas de *T. cacao* saudáveis e infectadas por *M. perniciosa*. A-B: 35 DAI. C-D: 45 DAI. A e C: plântulas saudáveis. B e D: plântulas infectadas. Nas plântulas infectadas em 35 e 45 DAI, nota-se um aumento no número de células na faixa cambial em relação às plântulas saudáveis, compreendendo as células iniciais do câmbio propriamente ditas e suas derivadas imediatas em diferenciação. DAI: dias após a inoculação. Escalas: 25µm.**

#### **4.2. *M. perniciosa* possui um gene similar a *IPT***

Para identificar possíveis genes *IPTs* no genoma do *M. perniciosa*, foi realizada uma busca por proteínas contendo o domínio isopentenil transferase<sup>109</sup> (Figura II-12a). Um gene candidato foi encontrado e denominado *MpIPT*. Este possui 1.839 nucleotídeos distribuídos em 8 *exons* e 7 *introns* com tamanho médio de 182 e 55 nucleotídeos, respectivamente (Figura II-12c). Os *exons* somam 1.461 nucleotídeos que codificam uma proteína contendo 486 aminoácidos. *MpIPT* possui todos os aminoácidos do domínio *IPT*, porém, 15 resíduos de aminoácidos “x” (e não 7) ocorrem entre as posições [VLI]xxxxxxx[VLI][VLI] (Figura II-12b) do domínio proposto por Kakimoto<sup>109</sup>. Curiosamente, o domínio predito é similar ao encontrado em isopentenil transferases dependente de tRNA (tRNA-*IPT*), sugerindo que em *M. perniciosa* o

gene *MpIPT* pode estar envolvido na síntese de *cis*-zeatina<sup>93</sup>. Embora o domínio IPT seja conservado, esta proteína possui 38% de similaridade com IPTs de *A. tumefaciens* (*Tmr*) e *Arabidopsis* sp (*AtIPT4*).



**Figura II-12: Representação esquemática do gene *MpIPT*.** **A:** Sequência em aminoácidos do domínio isopentenil transferase<sup>109</sup>. “x” denota a ocorrência de qualquer aminoácido na posição indicada; “[ ]” representa a ocorrência de algum dos aminoácidos apresentados entre os colchetes; {57,60} representa a ocorrência dos aminoácidos [VLI][VLI]... 57-60 resíduos após DxxQx. **B:** Sequência encontrada na proteína *MpIPT*; esta possui todos aminoácidos nas respectivas posições propostas em B (letras em negrito) com exceção do número de resíduos “x” na posição [VLI]xxxxxx[VLI][VLI] (letras sublinhadas). **C:** Estrutura de gene *MpIPT*. Exons (caixas em laranja) e introns (linha preta). Números representam a quantidade de nucleotídeos de cada exon e intron.

Após a caracterização *in silico* do gene *MpIPT*, o passo seguinte foi avaliar a funcionalidade da proteína *MpIPT*. A primeira estratégia proposta foi quantificação deste hormônio em de culturas do fungo. Porém, os métodos analíticos utilizados na quantificação de hormônios são extremamente complicados e, por essa razão, esta estratégia foi descartada. Na busca por outras alternativas foi identificado o sistema de complementação desenvolvido em *S. cerevisiae* (detalhes na seção 3.4; página 65).

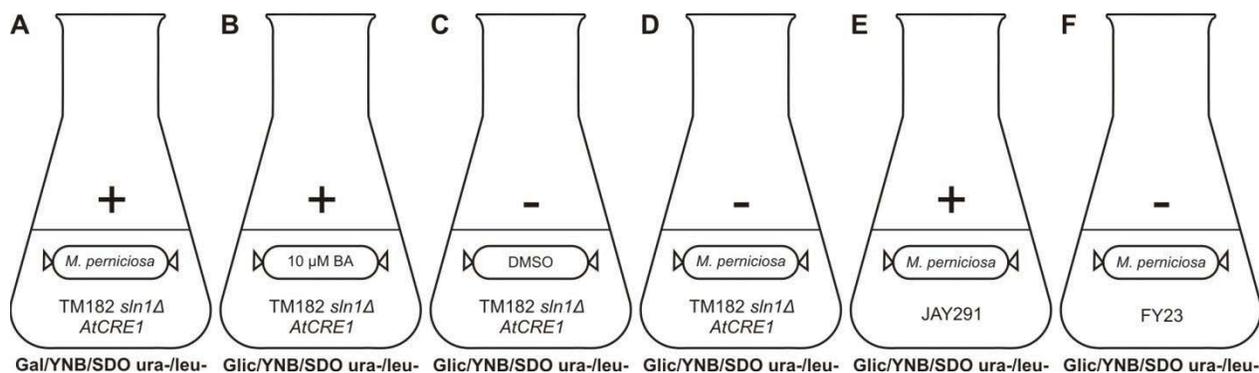
Considerando que o gene *MpIPT* é funcional para a síntese de citocininas, a possibilidade do fungo secretar este hormônio *in vitro* foi avaliada por duas abordagens, que combinara o cultivo de hifas do fungo com o sistema TM182 *sln1Δ AtCRE1*. No primeiro teste, o meio de cultura apropriado para TM182 *sln1Δ AtCRE1* foi suplementado com 10% de sobrenadante de culturas biotróficas. A levedura foi plaqueada sobre o meio suplementado mas não foram capazes de crescer em meio contendo glicose como fonte de carbono. Detalhes do experimento são apresentados na Tabela II-4.

**Tabela II-4: Teste de complementação do gene *MpIPT* utilizando meio de cultura suplementado com sobrenadante de culturas biotróficas.**

YNB/SDO ura-/leu-	TM182 <i>sln1Δ AtCRE1</i>	FY23	JAY291
2% Gal + 10% sobrenadante	+	-	+
2% Glic + 10% sobrenadante	-	-	+
2% Glic + 10μM BA	+	-	+
2% Glic + 10% sobrenadante + 10μM BA	+	-	+

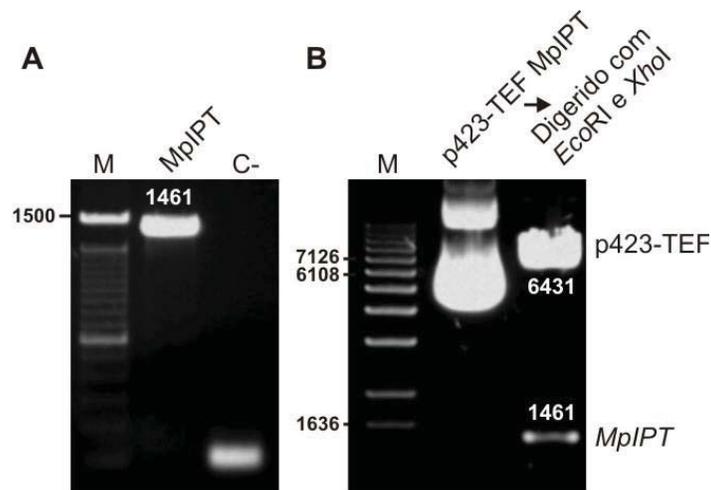
JAY291 e FY23: levedura selvagem e de laboratório utilizadas como controle positivo e negativo.

No segundo experimento, foi realizado um co-cultivo de hifas do fungo e a linhagem TM182 *sln1Δ AtCRE1*. Esporos do fungo foram inoculados dentro de membranas de diálise e estas foram submersas em meios apropriados contendo a linhagem TM182 *sln1Δ AtCRE1* (Figura II-13). Como observado no procedimento anterior, não houve crescimento em meio contendo glicose como fonte de carbono.



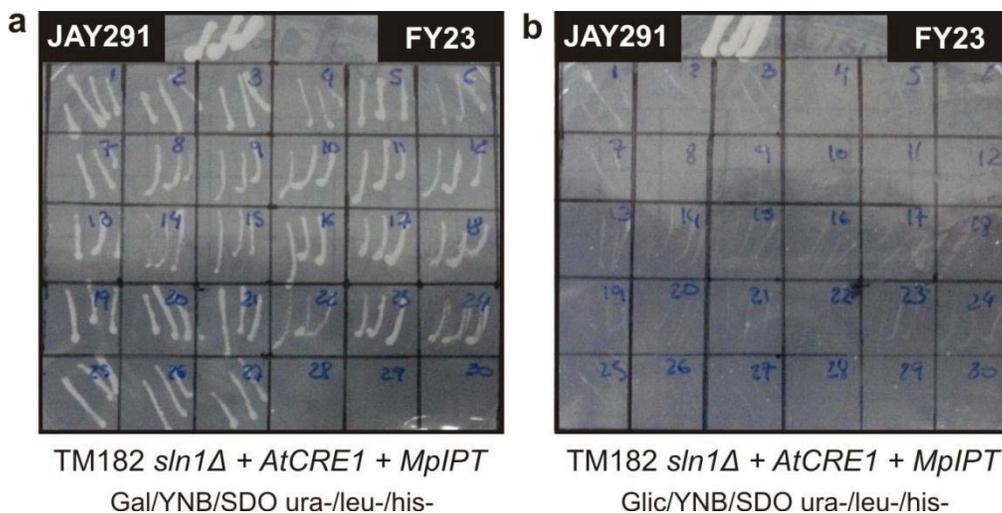
**Figura II-13: Co-cultivo de *M. perniciosa* e TM182 *sln1Δ AtCRE1*.** **A:** Fungo e TM182 *sln1Δ AtCRE1* crescem normalmente em Gal/YNB/SDO ura-/leu-. **B:** linhagem TM182 *sln1Δ AtCRE1* crescem Gal/YNB/SDO ura-/leu- BA. **C:** linhagem TM182 *sln1Δ AtCRE1* é incapaz de crescer em Glic/YNB/SDO ura-/leu-. **D:** fungo cresce em Glic/YNB/SDO ura-/leu- mas não é observado crescimento da linhagem TM182 *sln1Δ AtCRE1*. **E-F:** JAY291 e FY23: levedura selvagem e de laboratório utilizadas como controle positivo e negativo respectivamente. Detalhes dos meios de cultura são apresentados na secção 3.3, página 64.

Em paralelo, o gene *MpIPT* foi amplificado e inserido no vetor para expressão em leveduras p423-TEF (Figura II-14). Após a confirmação da clonagem, a levedura TM18 *sln1Δ* contendo o receptor de citocininas *AtCRE1* foi transformada com a construção p423-TEF-*MpIPT*.



**Figura II-14: Amplificação e clonagem do gene *MpIPT*.** O gene foi clonado nos sítios de restrição para *EcoRI* e *XhoI* do vetor p423-TEF. **A:** Resultado da amplificação do gene *MpIPT*. **B:** Digestão do plasmídeo p423-TEF-*MpIPT* para confirmação da clonagem. Gel agarose 1% corado com 0,5 µg/mL brometo de etídio. M: 1Kb DNA Ladder (Life Technologies). Números em branco indicam o tamanho esperado para cada fragmento.

Transformantes foram selecionados em meio de cultura apropriado e submetidos ao teste de complementação. Entretanto, as linhagens contendo o receptor de AtCRE1 e o gene *MpIPT* foram incapazes de crescer em glicose como única fonte de carbono, não havendo complementação do fenótipo (Figura II-15).



**Figura II-15: Teste funcional do gene *MpIPT* para síntese de citocininas.** Diferentes clones da linhagem TM182 *sln1Δ AtCRE1 MpIPT* em meio seletivo contendo galactose (2% gal) ou glicose (2% Glic) como fonte de carbono. **A:** clones crescem normalmente Gal/YNB/SDO ura-/leu-/his-. **B:** ausência de crescimento em Glic/YNB/SDO ura-/leu-/his-. JAY291 e FY23: levedura selvagem e de laboratório utilizadas como controle positivo e negativo respectivamente. Detalhes dos meios de cultura são apresentados na secção 3.3, página 64.

Embora o teste de complementação não tenha funcionado no sistema TM182 *sln1Δ AtCRE1*, os resultados não são suficientes para afirmar que o fungo não seja capaz de produzir citocininas. Em um estudo recentemente realizado com o fungo hemibiotrófico *C. graminicola*, os autores não encontraram evidências para a síntese de citocininas em meio de cultura definido. Entretanto, após adicionar dimetilalil difosfato (DMAPP), um precursor para a síntese de CKs que ocorre em plantas, uma série de isoformas de *trans*-zeatina foram detectadas<sup>78</sup>. Em estudos futuros, esta abordagem poderá ser utilizadas para tentar demonstrar a capacidade do fungo de produzir e secretar citocininas.

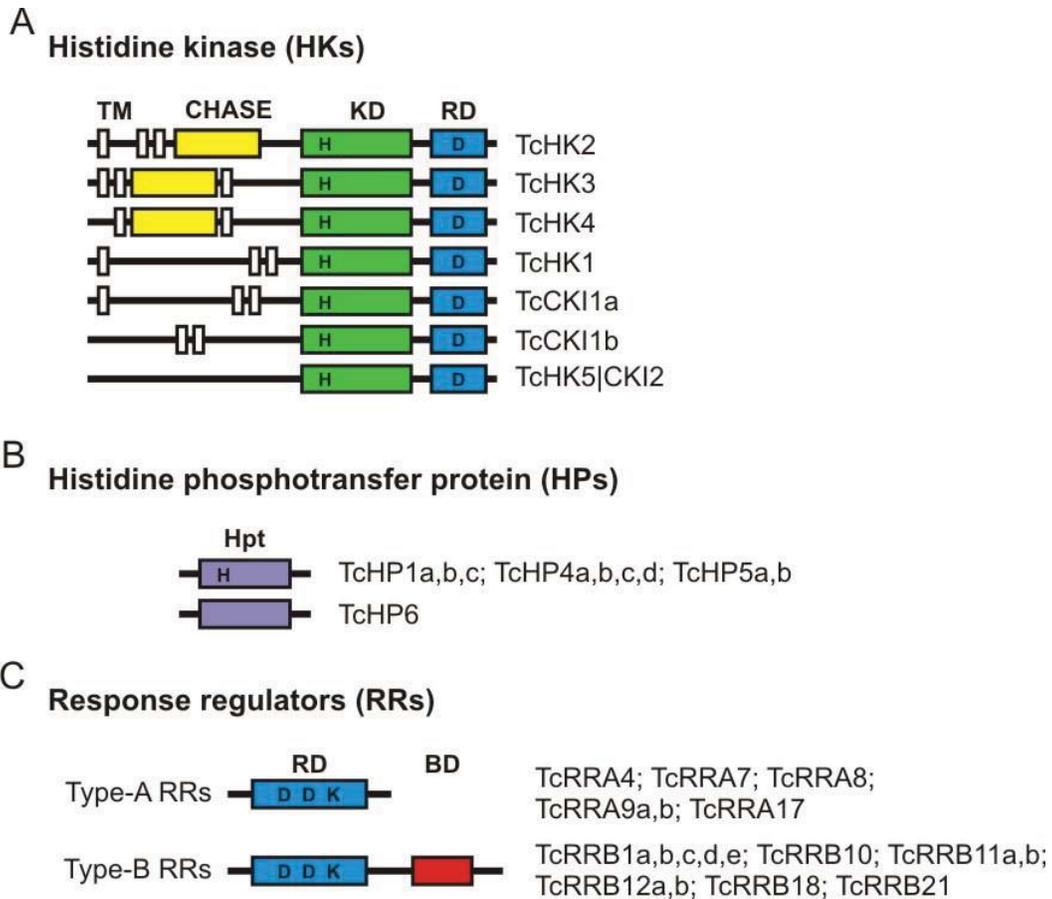
Outra possibilidade é a substituição do receptor *AtCRE1* por receptores de citocininas do cacau no sistema TM18 *sln1Δ AtCRE1*. Para isto, estes genes foram amplificados e clonados no vetor apropriado para a expressão em *S. cerevisiae* (detalhes apresentados na seção 4.4; página 96). Os próximos passos serão: transformar a linhagem TM18 *sln1Δ* com os cassetes de expressão possuindo os receptores de citocininas e; ii) realizar novamente os testes de complementação.

#### **4.3. A arquitetura do sistema *two-component* em cacau é similar a de *Arabidopsis sp.***

Apesar de não comprovarmos a hipótese inicial de que o fungo poderia produzir citocininas, uma análise a nível transcricional dos genes relacionados a percepção deste hormônio poderia nos auxiliar a compreender se esta via estaria sendo regulada em resposta à infecção, independentemente da habilidade do patógeno para sintetizar este hormônio.

Citocininas são percebidas por um sistema denominado *Two-component*, que compartilha módulos da via de sinalização de etileno e fotoreceptores<sup>114,120</sup>. Em *Arabidopsis sp.*, é constituído por 53 genes, sugerindo o alto número de representantes em cacau. Por essa razão, antes da análise da expressão foi necessário caracterizar detalhadamente cada constituinte deste sistema.

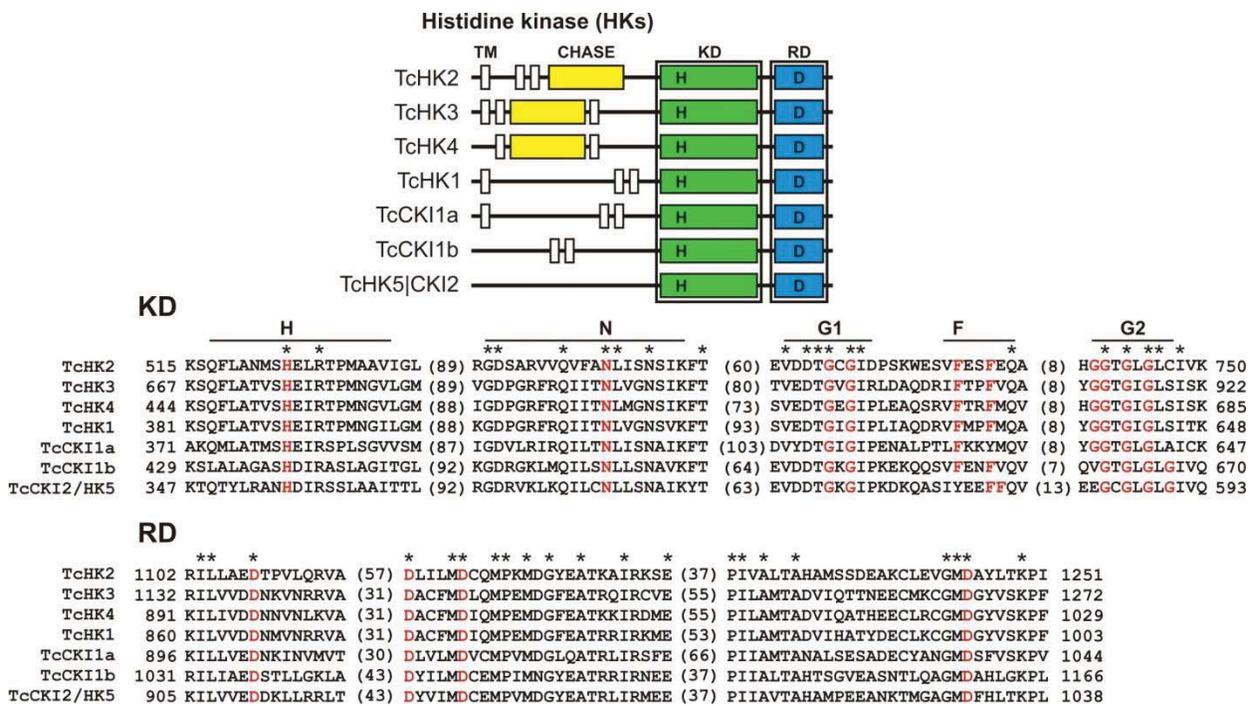
Pelo menos 49 proteínas constituem o sistema *two-component* em cacau. Destas, 35 estão provavelmente relacionadas às citocininas e incluem: 7 histidina quinases (HKs); 10 proteínas com atividade fosfo-transferase (HPs) e 18 reguladores de resposta (RRs). Uma representação esquemática da estrutura de cada proteína é apresentada na Figura II-16, e as sequências proteicas podem ser analisadas nas Figura II-17-19.



**Figura II-16: Representação esquemática da estrutura primária das proteínas do sistema *two-component* em *T. cacao*.** **A:** *Histidine kinases* (HKs): proteínas com atividade histidina quinase que atuam como receptores de citocininas. **B:** *Histidine phosphotransfer protein*: (Hpt): proteínas com atividade fosfo-transferase. **C:** *Response regulators* (RRs): reguladores da resposta a citocininas. *Type-A*: reguladores negativos. *Type-B*: Reguladores positivos. TM: domínio transmembrana. CHASE: *Cyclases, Histidine Kinases Associated Sensory Extracellular*. KD: domínio quinase. RD: domínio receptor. BD: domínio de ligação ao DNA (Myb). Resíduos de histidina (H) e aspartato (D) que participam do sistema de fosforilações são indicados em cada proteína.

*Proteínas da família Histidina quinase (HKs): receptores de citocininas*

Esta família é constituída por 7 proteínas, TcHK1-TcHK4; TcCKI1a,b e TcHK5/CKI2, que contêm ambos os domínios His quinase (KD) e domínio receptor (RD). Uma HK típica possui cinco motivos (assinaturas) conservados H, N, G1, F, e G2 no domínio KD. A principal característica do motivo H é a presença de um resíduo de histidina (H). N, G1, F, e G2 constituem o sítio de ligação a ATP. No domínio RD, é característico a ocorrência de resíduos de aspartato (D) conservados<sup>120</sup> (Figura II-17).



**Figura II-17: Alinhamento das proteínas Histidine Kinase (HKs) identificadas em *T. cacao*.** Sequências foram alinhadas utilizando o *software* MEGA5<sup>121</sup>. KD: domínio quinase. RD: domínio receptor. H, N, G1, F e G2: Motivos conservados descrito para proteínas com atividade histidina quinase. TM: domínio transmembrana. CHASE: Cyclases, Histidine Kinases Associated Sensory Extracellular. Números representam intervalos entre as regiões alinhadas. H: histidina. D: aspartato. Aminoácidos conservados são indicados com “\*”.

Dois ou três domínios transmembrana estão presentes em cada proteína, com exceção em TcHK5/CKI2. Três delas (TcHK2, TcHK3 e TcHK4) constituem um subgrupo que provavelmente está diretamente relacionado a percepção de citocininas por possuírem o domínio CHASE (*Cyclases, Histidine Kinases Associated Sensory Extracellular*)<sup>122,123</sup> (Figura II-14). As HKs descritas são 26-92% similares entre si, possuindo entre 1003-1272 aminoácidos. Com exceção dos genes codificantes para TcCKI1b e TcHK5/CKI2, transcritos para todos os outros cinco genes foram detectadas neste estudo (Tabela II-5).

**Tabela II-5: Proteínas similares a histidina quinases (HKs) identificadas em *T. cacao*.**

Nome proposto <sup>1</sup>	ID-CGD <sup>2</sup>	aa <sup>3</sup>	Expressão <sup>4</sup>
TcHK2	CGD0001614	1272	sim
TcHK3	CGD0009574	1029	sim
TcHK4	CGD0012427	1003	sim
TcHK1	CGD0000121	1251	sim
TcCKI1a	CGD0002905	1166	sim
TcCKI1b	CGD0022454	1038	não
TcCKI2/HK5	CGD0031910	1044	não

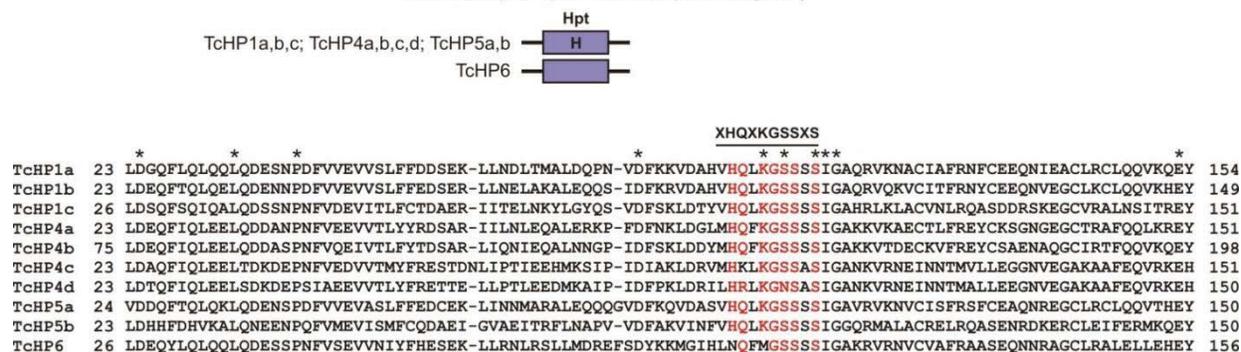
<sup>1</sup>Nome baseado na similaridade com proteínas de *Arabidopsis sp.* <sup>2</sup>ID do banco dados do genoma do cacau (<http://www.cacaogenomedb.org/>). <sup>3</sup>Número de aminoácidos preditos.

<sup>4</sup>Evidência de expressão em ramos de plântulas de cacau (RPKM≥1).

#### *Proteínas com atividade fosfo-transferase (HPs)*

Pelo menos dez genes de *T. cacao* codificam proteínas com atividade fosfo-transferase: TcHP1a,b,c; TcHP4a,b,c,d; TcHP5a,b e TcHP6 (Figura II-16). Deste grupo, 9 proteínas possuem o motivo XHQXKGSSXS altamente conservado, o qual inclui o sítio de fosforilação (H) (Figura II-18). Em TcHP6 um resíduo de asparagina (N) ocorre na posição do resíduo de histidina (H), exatamente como observado em seu homólogo mais próximo em *Arabidopsis sp.*, sugerindo que TcHP6 pode atuar como um regulador negativo da sinalização por citocininas<sup>124</sup>. TcHPs são 27-83% similares entre si e possuem entre 149-198 aminoácidos. (Tabela II-6).

### Histidine phosphotransfer protein (HPs)



**Figura II-18: Alinhamento das proteínas com atividade fosfo-transferase (Hpt) identificadas em *T. cacao*.** “XHQXKGSSXS” denota o domínio conservado descrito para Hpts. Proteínas foram alinhadas utilizando o *software* MEGA5<sup>121</sup>. Aminoácidos conservados são indicados com “\*”.

**Tabela II-6: Proteínas com atividade fosfo-transferase (Hpt) identificadas em *T. cacao*.**

Nome proposto <sup>1</sup>	ID-CGD <sup>2</sup>	aa <sup>3</sup>	Expressão <sup>4</sup>
TcHP1a	CGD0020212	154	sim
TcHP1b	CGD0022682	149	sim
TcHP1c	CGD0020893	151	sim
TcHP4a	CGD0002621	151	sim
TcHP4b	CGD0031637	198	sim
TcHP4c	CGD0031154	151	não
TcHP4d	CGD0031155	150	não
TcHP5a	CGD0003162	150	sim
TcHP5b	CGD0034265	150	sim
TcHP6	CGD0024695	156	não

<sup>1</sup>Nome baseado na similaridade com proteínas de *Arabidopsis sp.* <sup>2</sup>ID do banco dados do genoma do cacau (<http://www.cacaogenomedb.org/>). <sup>3</sup>Número de aminoácidos preditos. <sup>4</sup>Evidência de expressão em ramos de plântulas de cacau (RPKM≥1).

### Reguladores de resposta (RRs)

A análise do genoma do cacau revelou pelo menos 18 reguladores de resposta hipotéticos, contendo o domínio receptor (RD) não acoplado com proteínas His quinase (Figura II-16). O alinhamento dos aminoácido preditos mostram que o RD possui resíduos de lisina (L) e aspartato (D) conservados como descrito em *Arabidopsis sp.*<sup>114</sup>. e em *Oryza sp.*<sup>99</sup>. Baseado na sequência e nos domínios funcionais preditos, os RRs foram classificados em dois grupos: RRs tipo A (TcRRAs) e RRs tipo B (TcRRBs). Seis reguladores do tipo A foram identificados em cacau: *TcRRA4*; *TcRRA7*; *TcRRA8*; *TcRRA9a,b* e *TcRRA17* (Figura II-19); em *Arabidopsis sp.*,



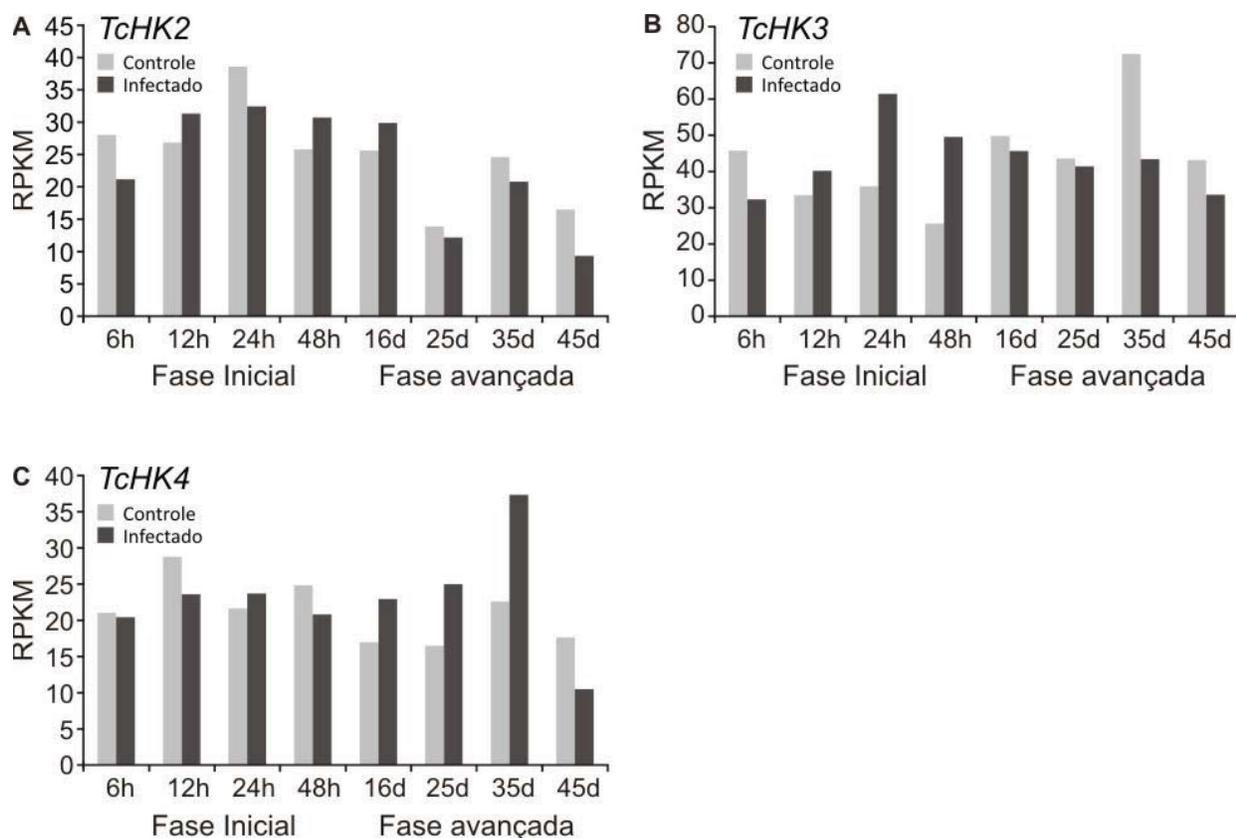
**Tabela II-7: Reguladores de resposta (RRs) identificados em *T. cacao*.**

Nome proposto <sup>1</sup>	ID-CGD <sup>2</sup>	aa <sup>3</sup>	Expressão <sup>4</sup>
RRs tipo A			
TcRRA4	CGD0011067	237	sim
TcRRA7	CGD0013310	228	sim
TcRRA8	CGD0029316	251	sim
TcRRA9a	CGD0015421	213	sim
TcRRA9b	CGD0005383	188	sim
TcRRA17	CGD0005573	237	sim
RRs tipo B			
TcRRB1a	CGD0019992	681	sim
TcRRB1b	CGD0012569	676	sim
TcRRB1c	CGD0016375	556	sim
TcRRB1d	CGD0010953	505	não
TcRRB1e	CGD0010554	569	não
TcRRB10	CGD0002951	432	não
TcRRB11a	CGD0011440	581	sim
TcRRB11b	CGD0004403	483	sim
TcRRB12a	CGD0031852	634	sim
TcRRB12b	CGD0004806	453	não
TcRRB18	CGD0031718	703	sim
TcRRB21	CGD0014720	680	não

<sup>1</sup>Nome baseado na similaridade com proteínas de *Arabidopsis sp.* <sup>2</sup>ID do banco dados do genoma do cacau (<http://www.cacaogenomedb.org/>). <sup>3</sup>Número de aminoácidos preditos. <sup>4</sup>Evidência de expressão em ramos de plântulas de cacau (RPKM $\geq$ 1).

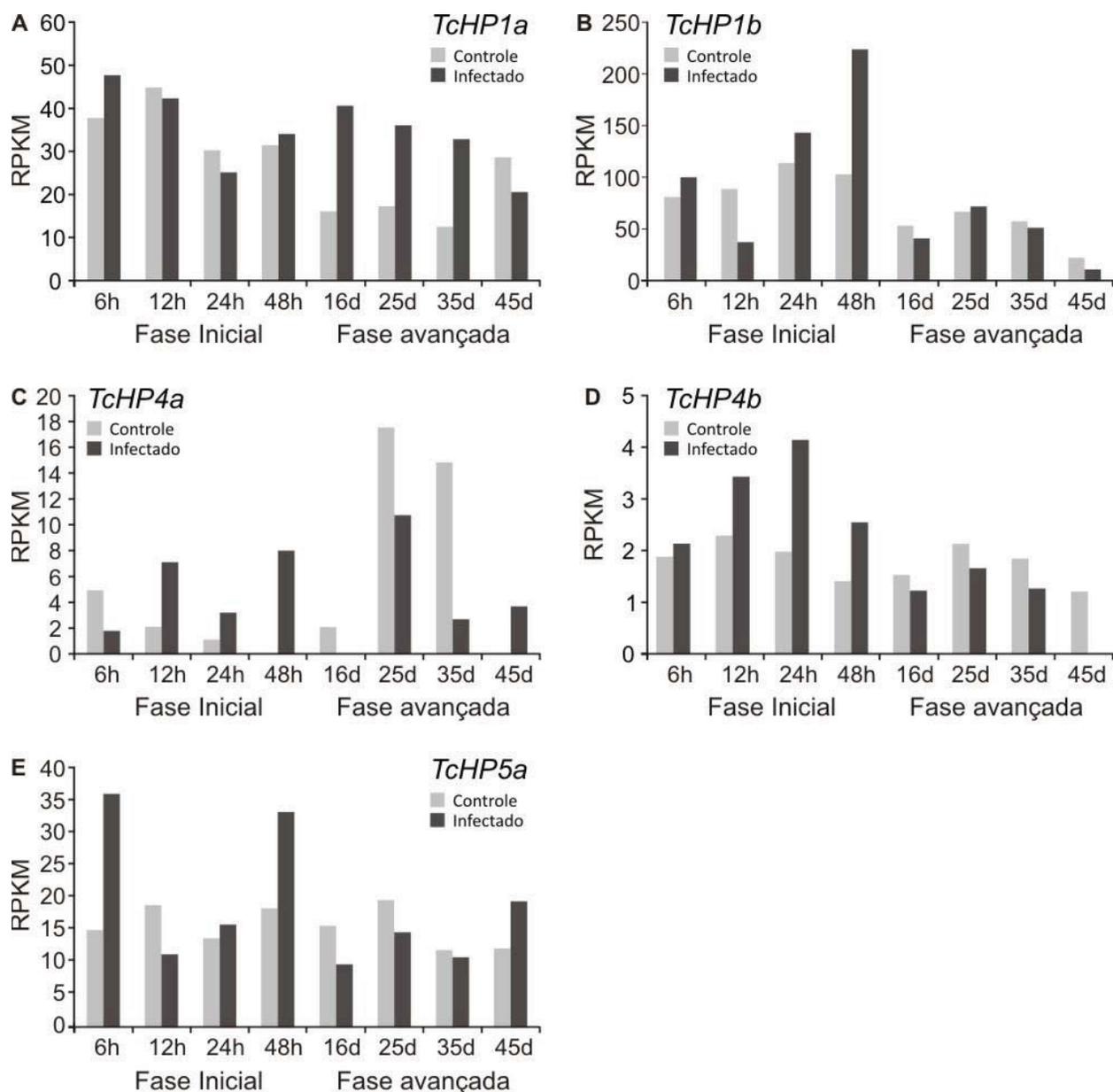
A expressão de cada gene foi acessada durante a progressão da doença a partir da análise de dados do sequenciamento do transcriptoma de plântulas infectadas e seus respectivos controles (seção 4.1; página 37). Entretanto, poucas alterações foram observadas entre as plântulas infectadas e respectivos controles.

Entre grupo das histidina quinases, os três potenciais receptores de citocininas (*TcHK2*, *TcHK3* e *TcHK4*), não apresentam diferenças de expressão significativas em resposta a infecção (Figura II-20).



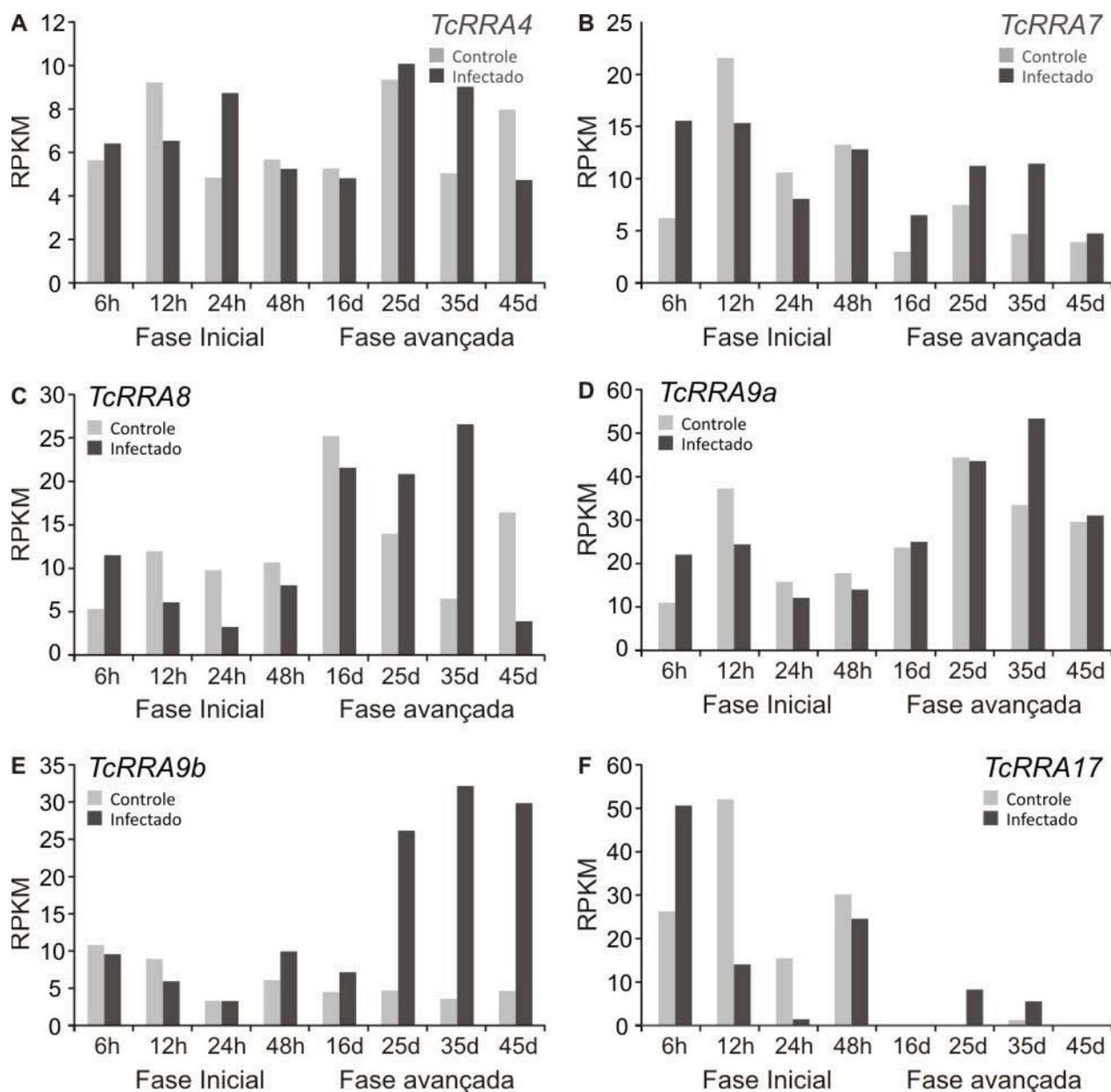
**Figura II-20: Perfil da expressão (RPKM) dos receptores de citocinina em *T. cacao* (*TcCHKs*) durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.** Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 16, 25, 35, ou 45 DAI.

Da mesma forma, apenas tendências são observadas no grupo das proteínas com atividade fosfo-transferase (HPs)<sup>127</sup>. *TcHP1a* e *TcHP1b* parecem estar mais relacionados com o desenvolvimento dos sintomas (Figura II-21a-b). Por outro lado, *TcHP4a,b* e *TcHP5a* mostram um tendência de indução na plântula infectada na fase inicial (Figura II-21c-e).



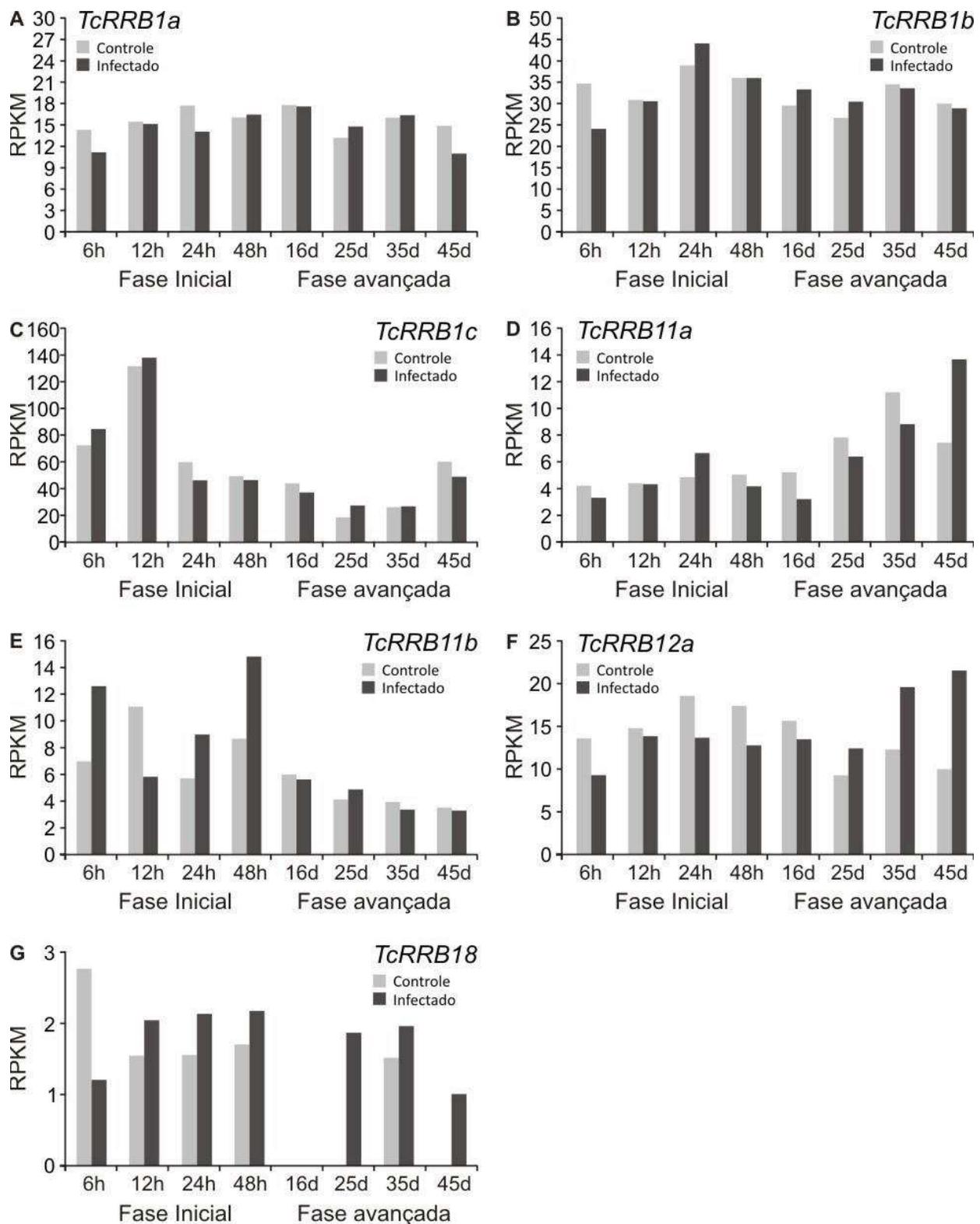
**Figura II-21: Perfil da expressão (RPKM) dos genes *TcHPs* durante a progressão da Vassoura-de-bruxa.** HP: *Histidine phosphotransfer*. Estes genes codificam proteínas com atividade fosfo-transferase. Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 6, 25, 35, ou 45 DAI.

Em *Arabidopsis sp.* a transcrição dos reguladores de resposta do tipo A é rapidamente ativada na presença do de citocininas<sup>128</sup>. Em cacau, *TcRRA4*, *TcRRA7*, *TcRRA8* e *TcRRA9b* sugerem um sinalização mediada por citocininas ligeiramente mais ativa durante a fase sintomática (Figura II-22a-c,e).



**Figura II-22: Perfil da expressão (RPKM) dos Reguladores de Resposta do tipo A em *T. cacao* (*TcRRAs*) durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 16, 25, 35, ou 45 DAI.**

De forma similar, reguladores de resposta do tipo B, os quais ativam a expressão de genes de resposta primária a citocininas<sup>126</sup>, também não sofreram alterações significativas (Figura II-23).



**Figura II-23: Perfil da expressão (RPKM) dos Reguladores de Resposta do tipo B em *T. cacao* (*TcRRBs*) durante a progressão da Vassoura-de-bruxa. Fase Inicial: 6, 12, 24, ou 48 HAI. Fase avançada: 16, 25, 35, ou 45 DAI.**

Apesar da via de sinalização por citocininas ser bem caracterizada em organismos modelos, o funcionamento lógico desta via possui uma enorme complexidade. Os membros de cada módulo se interagem de várias maneiras para exercer tanto funções específicas, como funções altamente redundantes, dificultando seu estudo a nível transcricional<sup>90</sup>.

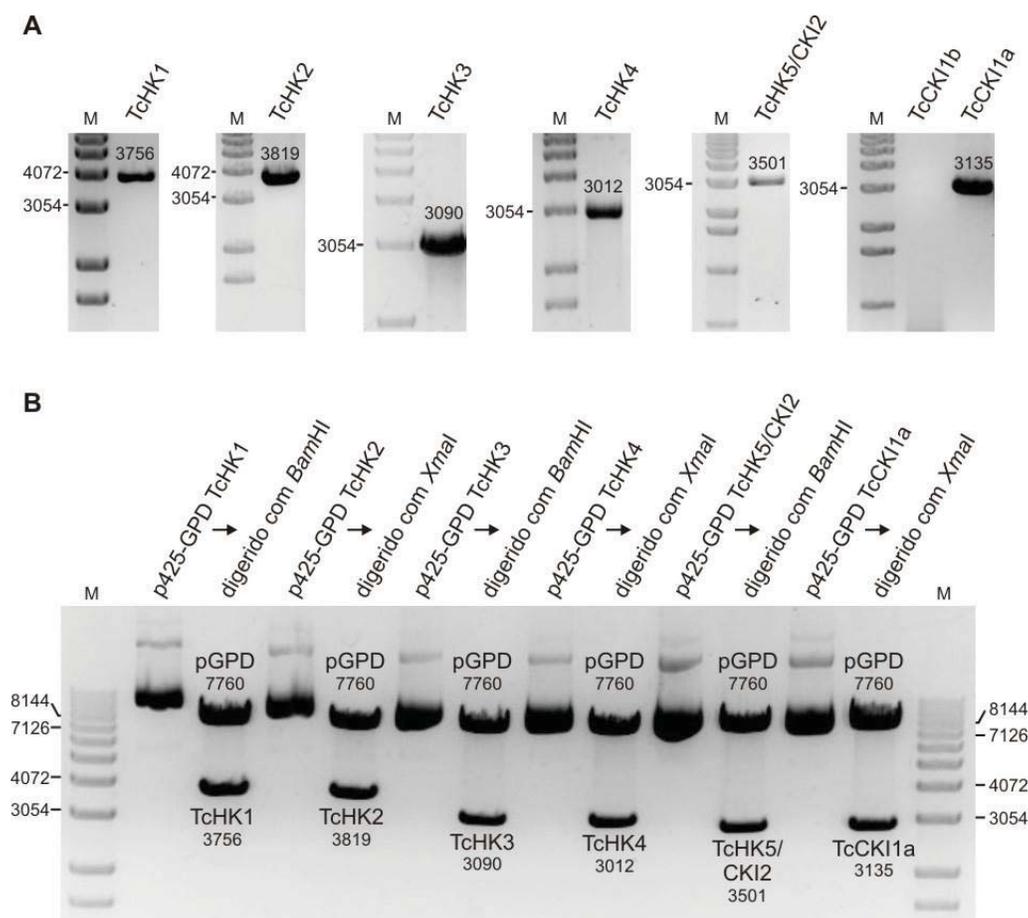
Neste trabalho, a hipótese inicial de que o fungo *M. pernicioso* seria capaz de sintetizar CKs foi avaliada e, no entanto, não houve confirmação utilizando o teste de complementação proposto em TM182 *sln1Δ AtCRE1*. É importante considerar que o fungo possui um gene similar a uma *tRNA-IPT*, cuja verdadeira contribuição na produção de citocininas ativas é debatida<sup>129,130</sup>, sugerindo que o fungo talvez não possua essa habilidade biossintética.

Para avaliar se as citocininas estariam exercendo um papel importante no desenvolvimento dos sintomas da Vassoura-de-bruxa, independentemente da habilidade do patógeno para produzir este hormônio, foi caracterizado o sistema *two-component* em cacau, o qual ainda não havia sido acessado de forma detalhada. No entanto, este não apresentou alterações significativas a nível transcricional, indicando que: i) a metodologia empregada pode não ter sido sensível o bastante para detectar alterações neste sistema; ii) o sistema *two-component* pode não sofrer regulação em resposta a doença ou; iii) as respostas mediadas por citocininas durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa ocorrem a nível traducional ou metabólico, sem alterar a transcrição do sistema de percepção.

Não foi possível estabelecer uma relação clara entre as citocininas e o intumescimento e formação do “calo” na base do ramo infectado. O mecanismo molecular que desencadeia estes sintomas em cacau permanece incerto. Cafeína, um metabólito que pode mimetizar a ação de citocininas, é detectada em altas concentrações em plântulas infectadas e poderiam em parte explicar os sintomas<sup>11</sup>.

#### 4.4. Amplificação dos receptores de citocininas e clonagem no vetor p425-GPD

Após a caracterização do sistema *two-component* em *T. cacao* os receptores de citocininas foram amplificados para um estudo funcional destes utilizando a levedura TM182 *sln1Δ* (detalhes na seção 3.4; página 65). Com exceção do gene *TcCKI1b*, seis genes preditos como histidinas quinases no cacau foram amplificados (Figura II-24a) e clonados no vetor p425-GPD (Figura II-24b). Após a clonagem, todos os genes foram sequenciados utilizando primers previamente desenhado (seção 3.19; página 76). Em análises futuras, estas construções serão utilizadas para validar a função destes receptores e, além disso, para novos testes de complementação da função do gene *MpIPT*.



**Figura II-24: Amplificação e clonagem dos receptores de citocininas.** **A:** Resultado da amplificação do receptores de citocininas. **B:** Digestão do vetor contendo cada gene amplificado para confirmação da clonagem. Gel agarose 0,7% corado com 0,5 µg/mL brometo de etídio. M: 1Kb DNA Ladder (Life Technologies). Números em preto indicam o tamanho esperado para cada fragmento.

## CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os dados obtidos neste trabalho sugerem que durante as primeiras horas de infecção, período crucial para o estabelecimento da doença, pode ocorrer uma supressão das respostas de defesa da planta que, por sua vez, seria provocada por um possível desequilíbrio na homeostase de auxinas.

Os resultados apresentados motivam a elaboração de novas estratégias para reavaliar as hipóteses iniciais e para reforçar as discussões levantadas. Dessa forma, propomos como perspectivas futuras:

1. Validar os resultados de expressão gênica utilizando, por exemplo, a técnica de PCR em tempo real;
2. Analisar *in vivo* a expressão gênica de componentes específicos do sistema *two-component* em resposta a infecção e a tratamentos com diferentes hormônios;
3. Avaliar se o tratamento prévio de plântulas de cacau com diferentes hormônios mimetiza os sintomas e/ou favorece a infecção;
4. Avaliar a contribuição de diferentes hormônios para a patogenicidade através do tratamento de plântulas com inibidores específicos;
5. Realizar novos testes de complementação do gene *MpIPT* utilizando a levedura TM182 *sln1Δ* contendo os receptores de citocininas;
6. Avaliar qualitativamente a presença de citocininas em diferentes culturas do fungo, utilizando repórteres como, por exemplo, o sistema *ARR5::GUS de Arabidopsis sp.*<sup>131</sup>;
7. Avaliar a contribuição de outros hormônios vegetais na hipertrofia do ramo infectado observada na vassoura verde.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rolim, S. G. & Chiarello, A. G. Slow death of Atlantic forest trees in cocoa agroforestry in southeastern Brazil. *Biodiversity and Conservation* **13**, 2679–2694 (2004).
2. Purdy, L. H. & Schmidt, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annual review of phytopathology* **34**, 573–94 (1996).
3. Cheesman, E. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cocoa populations. *Tropical Agriculture* **21**, 144–159 (1944).
4. Motamayor, J. C. *et al.* Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PloS one* **3**, e3311 (2008).
5. Ploetz, R. Cacao diseases: Important threats to chocolate production worldwide. *Phytopathology* (2007).at <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-97-12-1634>>
6. Hebbbar, P. Cacao Diseases: A Global Perspective from an Industry Point of View. *Phytopathology* (2007).at <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-97-12-1634>>
7. Aime, M. C. & 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* **97**, 1012–22 (2005).
8. Evans, H. & Bastos, C. Uma avaliação do ciclo de vida da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) do cacauero. *Fitopatologia Brasileira* **4**, 104 (1979).
9. Hedger, J., Pickering, V. & Araguindi, J. Variability of populations of the witch's broom disease of cocoa *Crinipellis perniciosa*. *Transactions of the British Mycological Society* **88**, 533–546 (1987).
10. Sreenivasan, T. & Dabydeen, S. Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis perniciosa*. *Plant Disease* **73**, 478–481 (1989).
11. Scarpari, L. M. *et al.* Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. *Journal of experimental botany* **56**, 865–77 (2005).
12. Rio, M. C. S. Do, De Oliveira, B. V, De Tomazella, D. P. T., Silva, J. a F. Da & Pereira, G. a G. Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of Cacao. *Current microbiology* **56**, 363–70 (2008).
13. Garcia, O. *et al.* Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycological research* **111**, 443–55 (2007).
14. Zaparoli, G. *et al.* 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* **113**, 61–72 (2009).
15. Rincones, J. *et al.* Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Molecular plant-microbe interactions* **21**, 891–908 (2008).
16. Mondego, J. M. C. *et al.* A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC genomics* **9**, 548 (2008).
17. Formighieri, E. F. *et al.* The mitochondrial genome of the phytopathogenic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* is 109 kb in size and contains a stable integrated plasmid. *Mycological research* **112**, 1136–52 (2008).
18. Thomazella, D. P. T. *et al.* The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *The New phytologist* **194**, 1025–34 (2012).
19. Teixeira, P. J. P. L. *et al.* The fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* has genes similar to plant PR-1 that are highly expressed during its interaction with cacao. *PloS one* **7**, e45929 (2012).

20. De Oliveira, B. V. *et al.* A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. *Fungal genetics and biology* **49**, 922–932 (2012).
21. Santner, A. & Estelle, M. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**, 1071–8 (2009).
22. Santner, A., Calderon-Villalobos, L. I. A. & Estelle, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology* **5**, 301–7 (2009).
23. Goda, H. *et al.* The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *The Plant Journal* **55**, 526–542 (2008).
24. Peng, Z. *et al.* Arabidopsis Hormone Database: a comprehensive genetic and phenotypic information database for plant hormone research in *Arabidopsis*. *Nucleic acids research* **37**, D975–82 (2009).
25. Nemhauser, J. L., Hong, F. & Chory, J. Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* **126**, 467–75 (2006).
26. Skoog, F. & Miller, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Syrup. Soc. Exp. Biol.* **54**, 118–130 (1957).
27. Nordström, A. *et al.* Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. *PNAS* **101**, 8039–8044 (2004).
28. Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M. & Kakimoto, T. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* **37**, 128–138 (2003).
29. Su, Y.-H., Liu, Y.-B. & Zhang, X.-S. Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular plant* **4**, 616–25 (2011).
30. Vanstraelen, M. & Benková, E. Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual review of cell and developmental biology* **28**, 463–87 (2012).
31. Moubayidin, L., Di Mambro, R. & Sabatini, S. Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in plant science* **14**, 557–562 (2009).
32. Aguda, B. D. & Goryachev, A. B. From pathways databases to network models of switching behavior. *PLoS computational biology* **3**, 1674–8 (2007).
33. Koide, T., Pang, W. L. & Baliga, N. S. The role of predictive modelling in rationally re-engineering biological systems. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 297–305 (2009).
34. Krupinski, P. & Jönsson, H. Modeling Auxin-regulated Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, (2010).
35. Espinosa-Soto, C., Padilla-Longoria, P. & Alvarez-Buylla, E. R. A gene regulatory network model for cell-fate determination during *Arabidopsis thaliana* flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *The Plant Cell* **16**, 2923 (2004).
36. Mendoza, L. & Alvarez-Buylla, E. R. Dynamics of the genetic regulatory network for *Arabidopsis thaliana* flower morphogenesis. *Journal of theoretical biology* **193**, 307–19 (1998).
37. Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R. & Jones, J. D. G. Pathological hormone imbalances. *Current opinion in plant biology* **10**, 372–9 (2007).
38. Grant, M. R. & Jones, J. D. G. Hormone (dis) harmony moulds plant health and disease. *Science* **324**, 750 (2009).
39. Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. & Jones, J. D. G. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology* **49**, 317–43 (2011).
40. Sakakibara, H. *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *PNAS* **102**, 9972–7 (2005).
41. Joshi, M. V & Loria, R. *Streptomyces turgidiscabies* possesses a functional cytokinin biosynthetic pathway and produces leafy galls. *MPMI* **20**, 751–8 (2007).
42. Pertry, I. *et al.* Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *PNAS* **106**, 929–34 (2009).

43. Choi, J. *et al.* The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Developmental cell* **19**, 284–95 (2010).
44. Argueso, C. T. *et al.* Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS genetics* **8**, e1002448 (2012).
45. Meinhardt, L. W. *et al.* In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Current microbiology* **52**, 191–6 (2006).
46. Frias, G. A., Purdy, L. H. & Schmidt, R. A. An inoculation method for evaluating resistance of cacao to *crinipellis pernicioso*. *Plant Disease* **79**, 787–791 (1995).
47. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* **10**, R25 (2009).
48. Mortazavi, A., Williams, B. a, McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods* **5**, 621–8 (2008).
49. Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* **11**, R106 (2010).
50. Harris, M. a *et al.* The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic acids research* **32**, D258–61 (2004).
51. Conesa, A. & Götz, S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International journal of plant genomics* **2008**, 619832 (2008).
52. Apweiler, R. *et al.* UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic acids research* **32**, D115–9 (2004).
53. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* **13**, 2498–504 (2003).
54. Maere, S., Heymans, K. & Kuiper, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* **21**, 3448–9 (2005).
55. Meinhardt, L. & Rincones, J. *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Molecular plant pathology* **9**, 577–588 (2008).
56. Glazebrook, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology* **43**, 205–27 (2005).
57. Münch, S. *et al.* The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of plant physiology* **165**, 41–51 (2008).
58. Kelley, B. S. *et al.* A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death. *The Plant journal* **62**, 357–66 (2010).
59. Leung, J., Merlot, S. & Giraudat, J. The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (AB12)* and *ABI1* Genes Encode Homologous Protein Phosphatases 2C Involved in Abscisic Acid Signal Transduction. *The Plant Cell* **9**, 759–771 (1997).
60. Milborrow, B. V The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of experimental botany* **52**, 1145–64 (2001).
61. Wang, K., Li, H. & Ecker, J. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell* **14**, 131–152 (2002).
62. Quint, M. & Gray, W. M. Auxin signaling. *Current opinion in plant biology* **9**, 448–53 (2006).
63. Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M. & Tiryaki, I. Characterization of an *Arabidopsis* Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indole-3-Acetic Acid. **17**, 616–627 (2005).
64. Ding, X. *et al.* Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *The Plant cell* **20**, 228–40 (2008).
65. Jagadeeswaran, G. *et al.* *Arabidopsis* *GH3-LIKE DEFENSE GENE 1* is required for accumulation of salicylic acid, activation of defense responses and resistance to *Pseudomonas syringae*. *The Plant journal* **51**, 234–46 (2007).

66. Nobuta, K. *et al.* The GH3 acyl adenylase family member PBS3 regulates salicylic acid-dependent defense responses in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **144**, 1144–56 (2007).
67. Thordal-Christensen, H. Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 351–357 (2003).
68. Martinoia, E. *et al.* Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers. *Planta* **214**, 345–355 (2002).
69. Stein, M. & Dittgen, J. Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *The Plant Cell* **18**, 731–746 (2006).
70. Navarro, L. *et al.* DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current biology* **18**, 650–5 (2008).
71. Kaliff, M., Staal, J., Myrenäs, M. & Dixelius, C. ABA is required for *Leptosphaeria maculans* resistance via ABI1- and ABI4-dependent signaling. *Molecular plant-microbe interactions* **20**, 335–45 (2007).
72. Hok, S., Attard, A. & Keller, H. Getting the most from the host: how pathogens force plants to cooperate in disease. *Molecular plant-microbe interactions* **23**, 1253–9 (2010).
73. Kilaru, A. & Hasenstein, K. H. Development and Pathogenicity of the Fungus *Crinipellis perniciosa* on Interaction with Cacao Leaves. *Phytopathology* **95**, 101–7 (2005).
74. Kwon, S. J. *et al.* GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis*. *The Plant journal* **58**, 235–45 (2009).
75. Kendrick, M. D. & Chang, C. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. *Current opinion in plant biology* **11**, 479–85 (2008).
76. Stepanova, A. N. & Alonso, J. M. Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current opinion in plant biology* **12**, 548–55 (2009).
77. McGrath, K. & Dombrecht, B. Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiology* **139**, 949–959 (2005).
78. Behr, M. *et al.* Remodeling of cytokinin metabolism at infection sites of *Colletotrichum graminicola* on maize leaves. *Molecular plant-microbe interactions* **25**, 1073–82 (2012).
79. Muday, G. K., Rahman, A. & Binder, B. M. Auxin and ethylene: collaborators or competitors? *Trends in plant science* **17**, 181–95 (2012).
80. Li, J., Brader, G., Kariola, T. & Palva, E. T. WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *The Plant journal* **46**, 477–91 (2006).
81. Hu, Y., Dong, Q. & Yu, D. *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant science* **185-186**, 288–97 (2012).
82. Moffat, C. S. *et al.* ERF5 and ERF6 play redundant roles as positive regulators of JA/Et-mediated defense against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *PloS one* **7**, e35995 (2012).
83. Luna, E., Bruce, T. J. a, Roberts, M. R., Flors, V. & Ton, J. Next-generation systemic acquired resistance. *Plant physiology* **158**, 844–53 (2012).
84. Turner, J., Ellis, C. & Devoto, A. The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* **14**, 153–165 (2002).
85. Kilaru, A., Bailey, B. A. & Hasenstein, K. H. *Moniliophthora perniciosa* produces hormones and alters endogenous auxin and salicylic acid in infected cocoa leaves. *FEMS Microbiology Letters* **274**, 238–244 (2007).
86. Thomma, B. P. H. ., Eggermont, K., Broekaert, W. F. & Cammue, B. P. . Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 421–427 (2000).
87. Van Wees, S. C., De Swart, E. a, Van Pelt, J. a, Van Loon, L. C. & Pieterse, C. M. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **97**, 8711–6 (2000).

88. Sakakibara, H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 431–449 (2006).
89. Siemens, J. *et al.* Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **19**, 480–94 (2006).
90. Hwang, I., Sheen, J. & Müller, B. Cytokinin signaling networks. *Annual review of plant biology* **63**, 353–80 (2012).
91. Matsumoto-kitano, M. Cytokinins are central regulators of cambial activity. *PNAS* **105**, 20027–20031 (2008).
92. Nieminen, K., Immanen, J., Laxell, M. & L Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *PNAS* **105**, 20032–20037 (2008).
93. Miyawaki, K. *et al.* Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *PNAS* **103**, 16598–16603 (2006).
94. Werner, T. & Schmulling, T. Cytokinin action in plant development. *Current opinion in plant biology* **527–538** (2009).
95. Inoue, T. *et al.* Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060–1063 (2001).
96. To, J. P. C. & Kieber, J. J. Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in plant science* **13**, 85–92 (2008).
97. Kieber, J. J. & Schaller, G. E. The perception of cytokinin: a story 50 years in the making. *Plant physiology* **154**, 487–92 (2010).
98. Du, L. *et al.* The two-component signal system in rice (*Oryza sativa* L.): a genome-wide study of cytokinin signal perception and transduction. *Genomics* **89**, 697–707 (2007).
99. Pareek, A. *et al.* Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with *Arabidopsis*. *Plant physiology* **142**, 380 (2006).
100. Ito, Y. & Kurata, N. Identification and characterization of cytokinin-signalling gene families in rice. *Gene* **382**, 57–65 (2006).
101. Macdonald, E. M. S. *et al.* Secretion of Zeatin, Ribosylzeatin, and Ribosyl-1"-Methylzeatin by *Pseudomonas savastanoi*. *Plant Physiology* **82**, 742–747 (1986).
102. Lichter, A., Barash, I., Valinsky, L. & Manulis, S. The genes involved in cytokinin biosynthesis in *Erwinia herbicola* *pv.* *gypsophylae*: characterization and role in gall formation. *Journal of bacteriology* **177**, 4457–4465 (1995).
103. Johansen, D. A. *Plant Microtechnique*. (McGraw-Hill Book Co.: New York & London, 1940).
104. Mumberg, D., Müller, R. & Funk, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119–22 (1995).
105. Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M. & Saito, H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**, 242–5 (1994).
106. Higuchi, M., Kakimoto, T. & Mizuno, T. Cytokinin Sensing Systems Using Microorganisms. *Plant Hormones: Methods an Protocols* **495**, 101–109 (2009).
107. Reiser, V., Raitt, D. C. & Saito, H. Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *The Journal of cell biology* **161**, 1035–40 (2003).
108. Chen, M.-T. & Weiss, R. Artificial cell-cell communication in yeast *Saccharomyces cerevisiae* using signaling elements from *Arabidopsis thaliana*. *Nature biotechnology* **23**, 1551–5 (2005).
109. Kakimoto, T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant & cell physiology* **42**, 677–85 (2001).
110. Altschul, S. & Madden, T. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**, 3389–3402 (1997).
111. Hunter, S. *et al.* InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic acids research* **37**, D211–5 (2009).

112. Gietz, R. D. & Woods, R. a Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology* **350**, 87–96 (2002).
113. Finn, R. D., Clements, J. & Eddy, S. R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic acids research* **39**, W29–37 (2011).
114. Hwang, I., Chen, H. C. & Sheen, J. Two-component signal transduction pathways in Arabidopsis. *Plant Physiology* **129**, 500 (2002).
115. Korbie, D. J. & Mattick, J. S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols* **3**, 1452–6 (2008).
116. Gibson, D., Young, L., Chuang, R. & Venter, J. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* **6**, 12–16 (2009).
117. Sambrook, J., and Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory: New York, 2001).
118. Birnboim, H. C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **7**, 1513–1523 (1979).
119. Matsumoto-Kitano, M. *et al.* Cytokinins are central regulators of cambial activity. *PNAS* **105**, 20027–20031 (2008).
120. Stock, a M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry* **69**, 183–215 (2000).
121. Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. & Tamura, K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics* **9**, 299–306 (2008).
122. Pas, J., Von Grotthuss, M., Wyrwicz, L. S., Rychlewski, L. & Barciszewski, J. Structure prediction, evolution and ligand interaction of CHASE domain. *FEBS letters* **576**, 287–90 (2004).
123. Heyl, A. *et al.* Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC evolutionary biology* **7**, 62 (2007).
124. Mahonen, A. P. *et al.* Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**, 94 (2006).
125. To, J. P. C. *et al.* Type-A *Arabidopsis* Response Regulators Are Partially Redundant Negative Regulators of Cytokinin Signaling. **16**, 658–671 (2004).
126. Mason, M. G. *et al.* Multiple Type-B Response Regulators Mediate Cytokinin Signal Transduction in *Arabidopsis*. **17**, 3007–3018 (2005).
127. Hutchison, C. E. *et al.* The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *The Plant cell* **18**, 3073–87 (2006).
128. To, J. P. C. *et al.* Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* Response Regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *The Plant cell* **19**, 3901–14 (2007).
129. Mok, D. W. S. & Mok, M. C. Cytokinin metabolism and action. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 89–118 (2001).
130. Kamada-Nobusada, T. & Sakakibara, H. Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 444–449 (2009).
131. Shtratnikova, V. Y. & Kulaeva, O. N. Cytokinin-dependent expression of the ARR5::GUS construct during transgenic *Arabidopsis* growth. *Russian Journal of Plant Physiology* **55**, 756–764 (2008).



## ANEXO I

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

Resultados obtidos em paralelo ao doutoramento foram utilizados na composição desta publicação anexada (Figura 5c). Resumidamente, o padrão de metilação do domínio péctico homogalacturônico foi analisado. Durante a transição dos sintomas da Vassoura-de-bruxa observa-se que a parede celular de plântulas infectadas sofre um processo de desmetilação. Este processo libera metanol que potencialmente é utilizado como fonte de carbono pelo fungo *M. perniciosa*.





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

Bruno V. de Oliveira<sup>a</sup>, Gleidson S. Teixeira<sup>a</sup>, Osvaldo Reis<sup>a</sup>, Joan G. Barau<sup>a</sup>, Paulo José P.L. Teixeira<sup>a</sup>, Maria Carolina S. do Rio<sup>a,c</sup>, Romênia R. Domingues<sup>c</sup>, Lyndel W. Meinhardt<sup>b</sup>, Adriana F. Paes Leme<sup>c</sup>, Johana Rincones<sup>a</sup>, Gonçalo A.G. Pereira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Genômica e Expressão, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

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

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

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 May 2012

Accepted 2 September 2012

Available online 26 September 2012

#### Keywords:

*Moniliophthora perniciosa*

Cacao

Witches' broom disease

Methanol oxidase

Extracellular

Pectin methylesterase

### ABSTRACT

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

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

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

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

inhabit the intercellular space, where they grow slowly at a low density, causing hypertrophy and hyperplasia of the infected branches, which are the main symptoms of the green broom stage (Evans, 1978; Penman et al., 2000; Silva, 1999). These symptoms are caused by a drastic biochemical change during the development of the green brooms (Scarpari et al., 2005). Very little is known about the characteristics of this monokaryotic mycelium *ex planta* because its cultivation is difficult due to its instability; a glycerol-based culture media for the cultivation of a monokaryotic and biotrophic-like mycelia was developed only recently (Meinhardt et al., 2006).

Five to eight weeks after the start of the infection, a dikaryotization process occurs, and the mycelia become necrotrophic, presenting two nuclei per cell that are connected by typical basidiomycete clamp connections. The necrotrophic mycelia rapidly invade the host plant cells, completely destroying the infected tissues and causing the extensive degradation symptoms of the dry

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

E-mail address: [gocalo@unicamp.br](mailto:gocalo@unicamp.br) (G.A.G. Pereira).

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

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

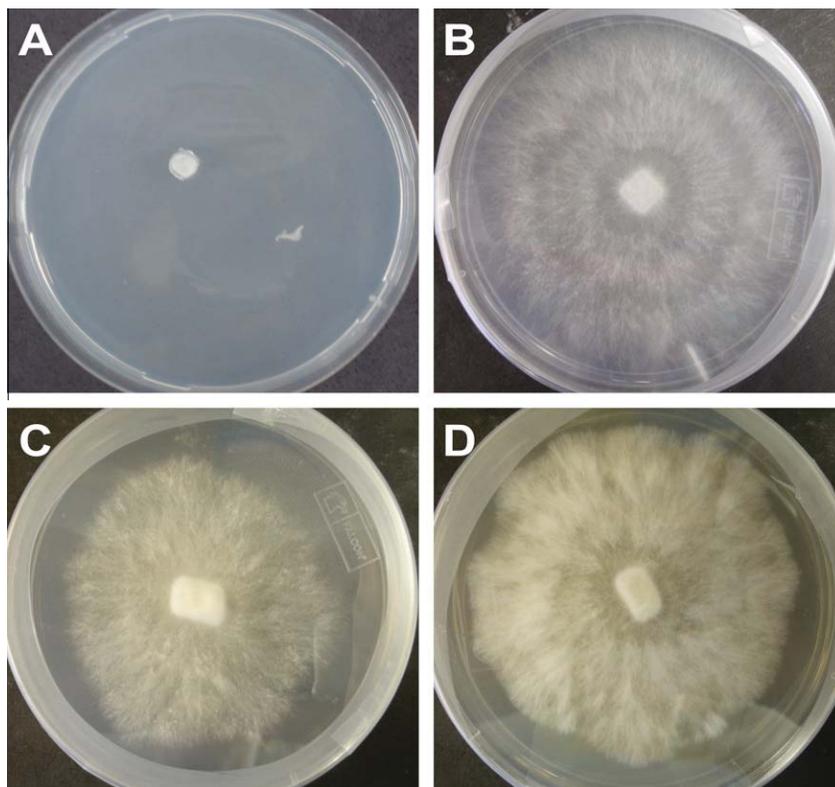
MOX is the key enzyme in methanol metabolism in methylotrophic yeasts and other methanol-degrading organisms. It consists of an octameric flavoprotein that oxidizes methanol to formaldehyde and hydrogen peroxide (Ozimek et al., 2005). The peroxide generated is decomposed by a catalase, and the formaldehyde is subjected either to the action of a dihydroxyacetone synthase (DHAS) or to direct oxidation by the enzymes formaldehyde dehydrogenase (FMDH) and formate dehydrogenase (FDH) (Kaszycki and Koloczek, 2000).

In almost all methanol-degrading organisms, such as the methylotrophic yeasts *Pichia angusta* and *Pichia pastoris* and the ascomycete phytopathogen *Cladosporium fulvum*, MOX is a

peroxisomal enzyme (Ozimek et al., 2005; Segers et al., 2001). It is synthesized in the cytosol and imported into the peroxisomes, triggered by a peroxisomal targeting signal (PTS1) that is located in the C-terminal part of the enzyme (Ozimek et al., 2006). To date, the only known exception concerns the MOX produced by the basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*, which is secreted into the extracellular space, despite the absence of a clear secretion signal in its sequence (Daniel et al., 2007).

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

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



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

phytopathogenic fungal species secrete PMEs as pathogenicity factors. For example, the disruption of the *B. cinerea* pectin methyl-esterase gene *Bcpme1* reduces virulence in several host plants, including apple fruits, grapevines, and *Arabidopsis thaliana* leaves (Valette-Collet et al., 2003). The analysis of *M. perniciosa*'s genomic and expressed sequences revealed the presence of a sequence similar to a pectin methyl-esterase.

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

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

## 2. Material and methods

### 2.1. Biological material and growth conditions

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

For all *in vitro* gene expression experiments, both biotrophic-like and necrotrophic mycelia were grown for 7 days at 28 °C, under constant agitation at 120 rpm, in biotrophic liquid media, which contains glycerol as the sole carbon source (Meinhardt et al., 2006); the same media was used for the biotrophic-like and necrotrophic mycelia growth to avoid gene expression variations associated with different growth conditions. After the 7-day growth period, the mycelia were separated from the media by filtration, washed twice in sterile distilled water and inoculated in new aliquots of the same media supplemented with the following sole carbon sources at final concentrations of 1% (w/v): glycerol, glucose, methanol, non-esterified pectin from citrus (Sigma, polygalacturonate) and esterified pectin from citrus (Sigma, degree of esterification, DE ≥ 85%). After a 24-h period of incubation, the mycelia were separated from the media by filtration, washed twice in sterile distilled water, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C for further RNA isolation.

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

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

### 2.2. RNA isolation

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

### 2.3. Real-time PCR

One microgram of total RNA from *in vitro* cultures and plant material was treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) and used for cDNA synthesis with SuperscriptII® Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The online program Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) was used to design all PCR primers based on the sequences obtained from the Witches' broom Genome Project database (Table 1). The optimal primer annealing temperature was set to 55 °C, and the amplicon size varied from 100 to 110 bp. Quantitative PCR was performed using the SYBRGreen MasterMix (Applied Biosystems), and the fluorescence was detected with the Step One Plus platform (Applied Biosystems). A 16 µl reaction was set with 8 µl of the SYBRGreen MasterMix, 40 ng of cDNA and 100 nM of each primer. The thermal cycling conditions were 94 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 15 s, 55 °C for 20 s and 60 °C for 1 min. After amplification, a melt-curve step consisting of one cycle of 94 °C for 15 s and a ramp varying from 60 °C to 94 °C in intervals of 0.3 °C was added to inspect the reactions for the formation of primer dimers and unspecific amplicons. The melting temperatures of the fragments were determined according to the manufacturer's protocol (Table 1). No-template reactions (water) were included as negative controls in every plate for all of the primers used; for plant material analyses, non-infected plants were also assayed to ensure that the fungal primers were not amplifying cacao genetic material.

The data analysis was performed using a mathematical method described previously (Pfaffl, 2001), using the C<sub>t</sub> (cycle threshold) mean of biological triplicates. Standard curves for each primer pair were generated by serial cDNA dilutions. The housekeeping genes β-actin and α-tubulin (Table 1) were used to normalize the qPCR reactions for *in vitro* and infected plant material, respectively.

### 2.4. Methanol oxidase assay

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

**Table 1**  
Primers and melting temperatures (MT) for quantitative SYBRGreen real-time PCR.

	Forward	Reverse	MT (°C)
PME	TTTTGTACTCAAACCTGCATCACC	CTGAAGGAAGATTAGACAGACACG	75.6
MOX	CTGTGGCGGTAGCCTATGTT	TCCACTGCTCAGAACGACAC	82.3
ACT	CCCTTCTATCGTCCGGCTGT	AGGATACCACCGCTTGGATTG	80.7
TUB	GACCAACAGCTTGTCTTTGC	GACATTGCAACATCGAGGA	81.0

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

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

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

Concentrated supernatants of liquid *M. perniciosa* cultures, obtained as described in Section 2.4, were used in mass spectrometry analysis. SDS-PAGE electrophoresis (12.5%) was used to separate 20  $\mu$ g of the concentrated protein mixture. The bands corresponding to the molecular mass range from 70 to 75 kDa, as predicted for MOX, were excised from the gel and subjected to in-gel trypsin digestion, which was performed as described previously (Hanna et al., 2000), with modifications. As a negative control, we performed the same preparation with a cell-free culture media.

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

Peak lists (msf) were generated from the raw data files using the software Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific) with Sequest search engine and they were searched against *M. perniciosa*'s predicted protein database (17,012 sequences) with carbamidomethylation (+57.021 Da) as a fixed modification, oxidation of methionine (+15.995 Da) as a variable modification, one trypsin missed cleavage and a tolerance of 10 ppm for the precursor and of 1 Da for fragment ions, filtered using xcorr cutoffs (+1 > 1.8, +2 > 2.2, +3 > 2.5 and +4 > 3.25) and false discovery rate of 0.01, performed using a reverse *M. perniciosa*'s predicted protein database.

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

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

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

### 2.7. Transcriptomic analysis using RNA-seq

The RNA isolated from *M. perniciosa* necrotrophic mycelia induced in glycerol or methanol (Section 2.1) was processed for global transcriptome analysis by large scale mRNA sequencing (RNA-seq). Libraries were prepared according the manufacturer's instructions (Illumina). The mRNA was purified from 10  $\mu$ g of total RNA using Sera-Mag Magnetic Oligo(dT) Beads (Thermo Scientific), and fragmented in the presence of divalent cations under high temperatures. The fragmented mRNA was used to synthesize the cDNA. The first strand was synthesized using Superscript II Reverse Transcriptase and random hexamers. Double-stranded cDNA was then produced using the enzymes DNA polymerase I and RNase H. Subsequently, abrupt extremities were obtained by treatment with the enzymes T4 DNA polymerase and Klenow DNA polymerase; a 3'-adenine was added by the enzyme Klenow exo-Adapters with an overhang thymine were added, and non-ligated adapters were purified in gel. Finally, the libraries were enriched through 15 cycles of amplification using primers that anneal to the adapters. The libraries were quantitative and qualitatively assayed with the Qubit fluorometer (Invitrogen) and the Experion capillary electrophoresis system (Bio-RAD). Each library was subjected to a 36-cycle single end sequencing in the Genome Analyzer II<sub>x</sub> platform (Illumina).

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

## 3. Results

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

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

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

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

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

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

### 3.2. *M. pernicioso* MOX is a secreted protein

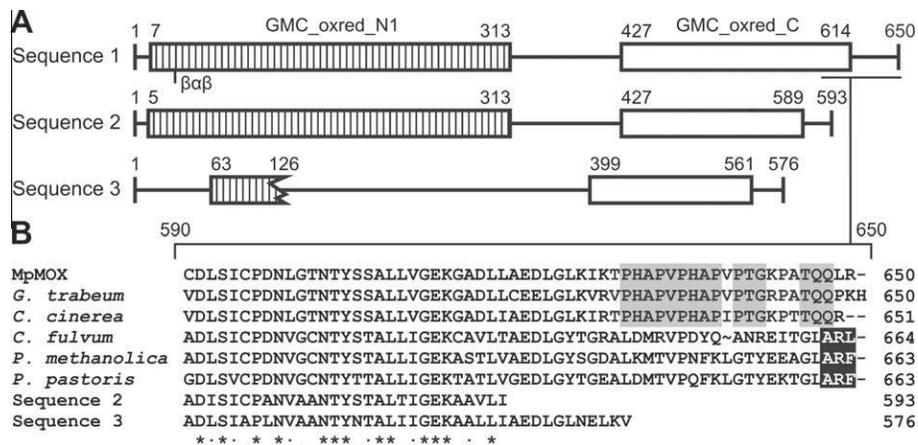
One hundred-fold concentrated culture supernatants (secretome) from *M. pernicioso* were assayed for MOX activity. As described in Section 2.4, MOX activity was assayed by following the oxidation of ABTS at 405 nm with a spectrophotometer. Table 2 shows MOX relative activity and  $K_m$  values in different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

LC-MS/MS analysis on an LTQ Orbitrap-Velos mass spectrometer was used to confirm the presence of methanol oxidase in the extracellular extracts of *M. pernicioso* cultures. The concentrated fungal secretome was electrophoretically separated in a 12.5% one dimensional SDS-PAGE gel. As MOX is predicted to have a molecular mass of approximately 72 kDa, the bands corresponding to the molecular mass range of 70–75 kDa were excised from the gel (Fig. 3A) and analyzed in the LTQ-Orbitrap-Velos mass spectrometer. A total of 2722 spectral counts were assigned to 205 proteins of the *M. pernicioso* predicted protein database. As shown in Fig. 3B, three unique MOX peptides were identified, totaling 7% of protein coverage. This finding confirms that *M. pernicioso* secretes this enzyme into the extracellular space, despite the absence of a predicted secretory signal peptide in its

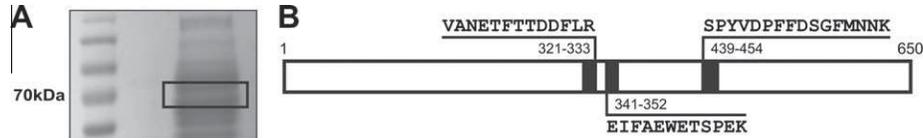
**Table 2**  
Relative activity and  $K_m$  values for MOX in different substrates.

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

<sup>a</sup> Activities are given relative to methanol.



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



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

**Table 3**

Peptide sequences identified by mass spectrometry analysis.

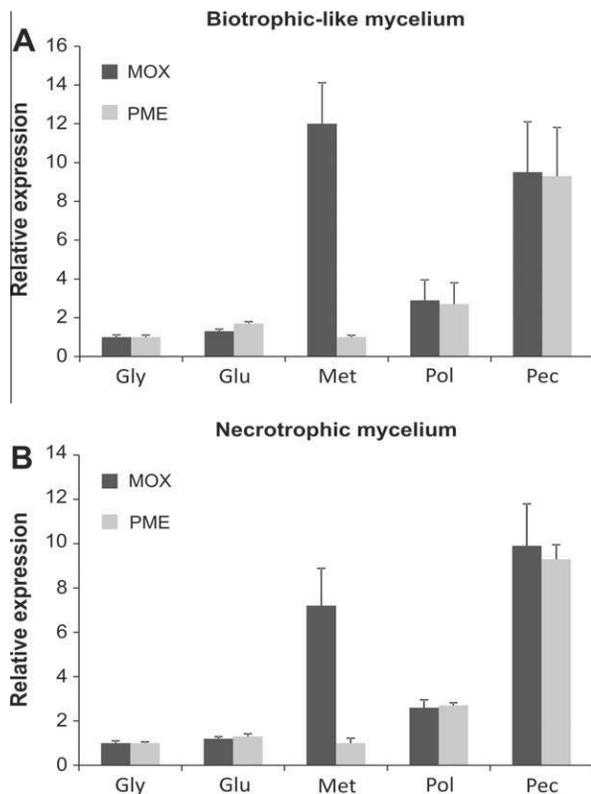
Peptide sequence	Spectral counts	Charge	<i>m/z</i>	MH + [Da]
VANETFTDDFLR	1	+2	764.8710	1528.7348
SPSPYVDPPFFDSGFMNK	1	+2	1032.9590	2064.9107
EIFAEWETSPEK	1	+2	733.3496	1465.6919

M – oxidation of methionine.

sequence. The peptide sequences, the number of spectral counts, and their *m/z* are detailed in Table 3.

### 3.3. *Mp-mox* is upregulated in the presence of methanol and esterified pectin

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



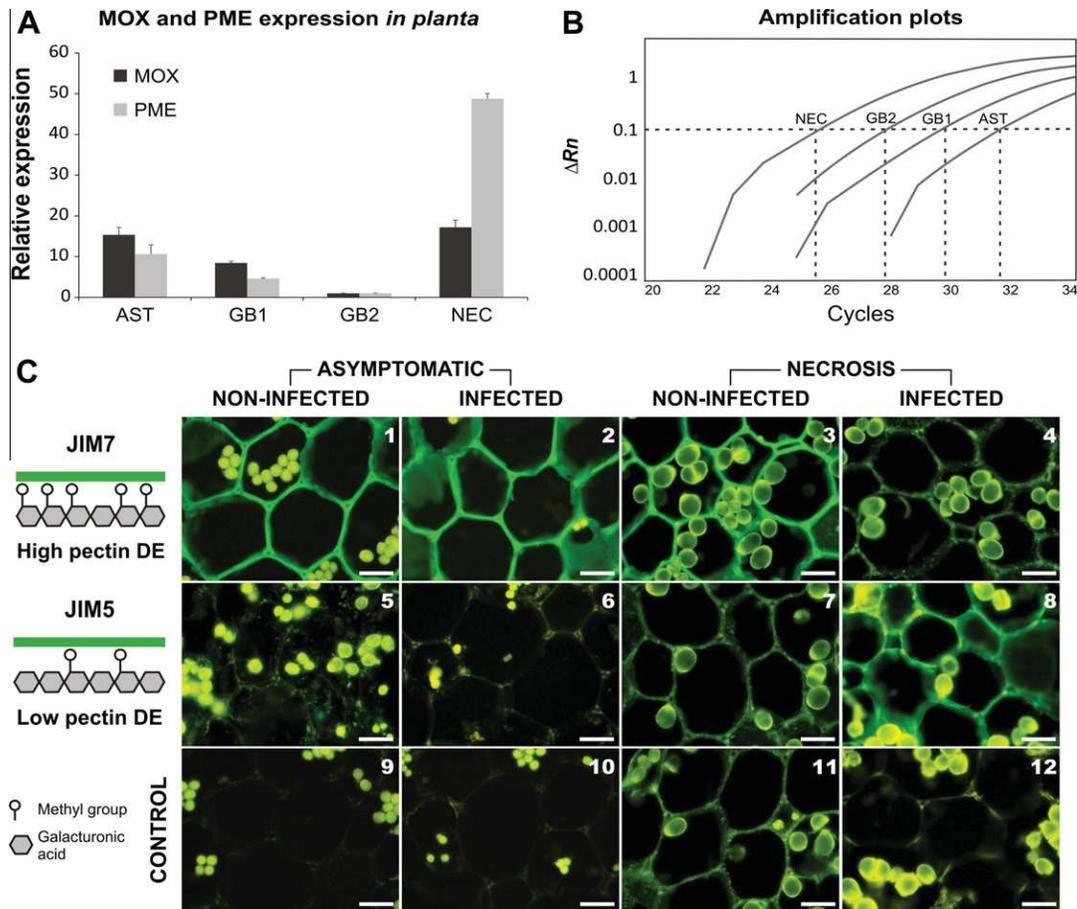
**Fig. 4.** *Mp-mox* and *Mp-pme* relative expression in the biotrophic-like and necrotrophic mycelium from *M. perniciosa* grown *in vitro* and supplemented with different sole carbon sources. Gly: glycerol; Glu, glucose; Met: methanol; Pol: polygalacturonate (pectin DE 0%); Pec: pectin, DE > 85%. The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

methanol, polygalacturonate or pectin with 90% esterification. As shown in Fig. 4, there was a 12- and 9-fold increase in the expression of *Mp-mox* in the biotrophic-like and necrotrophic mycelia, respectively, in the presence of methanol when compared with glycerol as the carbon source. This is consistent with the fact that methanol is a substrate for MOX and a known inducer of its expression in other organisms (Ozimek et al., 2005). In the presence of esterified pectin, both *Mp-mox* and *Mp-pme* genes were upregulated. The expression of *Mp-mox* and *Mp-pme* was increased approximately 10 and 9 times, respectively, in both types of mycelium. This result suggests that the methanol released during the demethylation of pectin by the enzyme PME is a substrate for MOX, which shows an increased level of expression. Interestingly, in the presence of non-esterified pectin, neither gene was upregulated, thus reinforcing the hypothesis that the demethylation of pectin is a key process for *Mp-mox* and *Mp-pme* upregulation. The lack of variation in gene expression between the biotrophic-like and necrotrophic mycelia show that, although these mycelia produce distinct symptoms in the progression of WBD, they may exhibit similar characteristics when grown under the same conditions *in vitro*. The expression of these genes in the presence of glucose did not show any difference when compared to growth in glycerol.

### 3.4. The reduction of the level of methyl esterification in infected cacao seedlings is correlated with the higher levels of *M. perniciosa Mp-pme* relative gene expression in planta

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

Spores of *M. perniciosa* infect cacao plants as biotrophic mycelia, which grow slowly and at low densities in the infected plants. As the disease progresses, the amount of fungal material *in planta* increases, reaching a maximum at the late stages of the dry broom phase when the necrotrophic mycelia completely colonizes the infected tissues (Evans, 1978; Frias et al., 1991; Griffith and Hedger, 1994). Fig. 5B shows the amplification plots and Ct, with a threshold of 0.1, for the housekeeping gene  $\alpha$ -tubulin in the four stages of WBD analyzed. The  $C_t$  difference for the  $\alpha$ -tubulin gene between the asymptomatic ( $C_t = 30$ ) and the necrosis phase ( $C_t = 23$ ) indicates that there is approximately 100 times more fungal material in the infected plants during the necrosis phase than in the previous stages. The relatively higher *Mp-mox* and *Mp-pme* expression levels in the necrosis phase, in conjunction with the higher number of mycelia infecting the plants during this phase, led us to hypothesize that the final quantity of the transcripts of these genes and,



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

possibly, their protein products, would be even higher in the infected plants.

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

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

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

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

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

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

#### 4. Discussion

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

methanol as the sole carbon source is due to the production of large amounts of MOX; in the presence of methanol, MOX can reach 30% of the total soluble protein produced by these organisms (Giuseppin et al., 1988). However, very little is known about this enzyme among the basidiomycete and/or phytopathogenic fungal species.

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

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

To date, the only described extracellular MOX belongs to the lignin-degrading basidiomycete *G. trabeum* (Daniel et al., 2007). However, the protein sequence lacks any clear secretion signal. The authors suggested that the differences in MOX targeting compared with the known yeast peroxisomal localization were traced to a unique C-terminal sequence of the *G. trabeum* enzyme, which is apparently responsible for the protein's extracellular translocation. *M. perniciosa* MOX contains an identical C-terminal sequence when compared to *G. trabeum* and predicted MOX from other basidiomycetes that are completely different from the known peroxisomal MOX. Because *M. perniciosa* MOX also lacks a predicted secretion signal, we suggest that its unique C-terminal sequence is the signal component that leads to the translocation of this enzyme to a secretory pathway, given that this is the only significant sequence difference between *M. perniciosa* and other basidiomycete MOX compared with the yeast and ascomycete peroxisomal *mox* genes.

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

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

**Table 4**

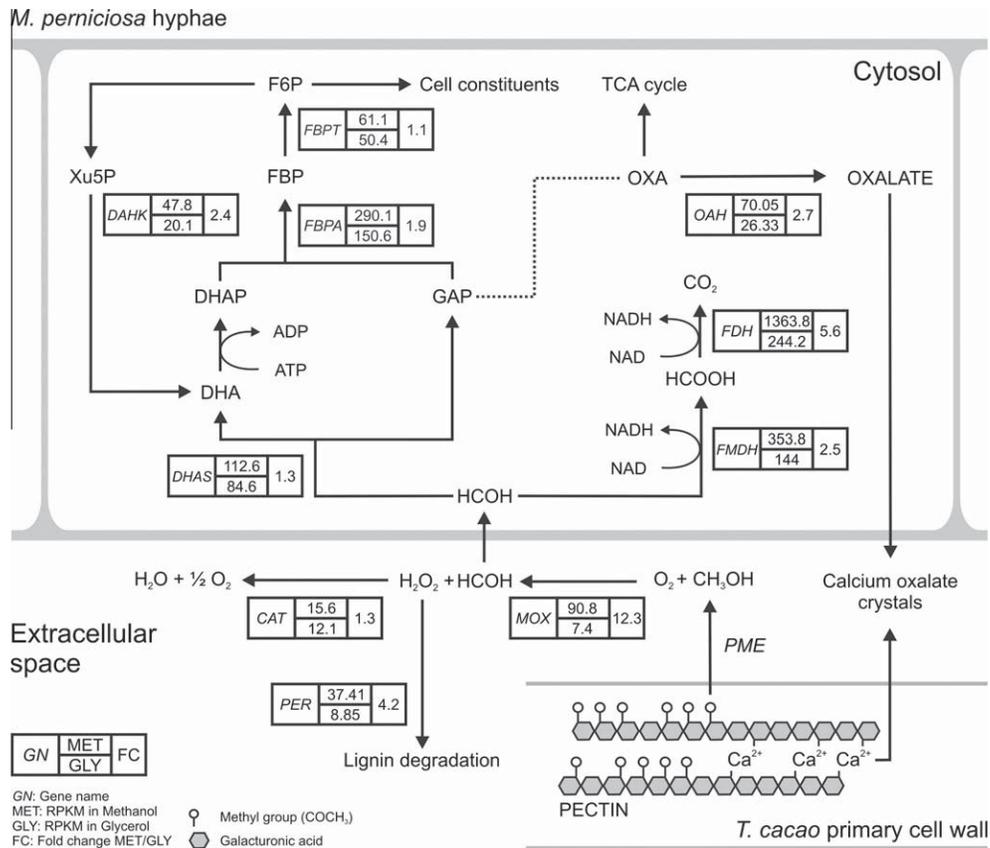
Prediction of the subcellular localization of the enzymes involved in the methanol metabolism pathway in *M. perniciosa*. Catalase and pectin methyltransferase are predicted as secreted; the other enzymes are predicted as cytoplasmic, except for OAH, predicted as mitochondrial. However, MOX is as secreted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

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

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

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

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



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

extracellular catalase. As shown in Fig. 6, a catalase showing a clear predicted secretory signal (Table 4) is slightly induced in the presence of methanol and its activity is detected in the fungal culture supernatants (data not shown), indicating a possible role in the degradation of the peroxide generated. Moreover, *M. perniciosa* possesses several peroxidases that are predicted to be secreted, which may also participate in peroxide degradation. One of these peroxidases is induced in the methanol RNA-seq libraries, as shown in Fig. 6. A Dyp peroxidase, which uses iron ions as cofactors, shows a 4-fold increase in its expression when *M. perniciosa* is supplemented with methanol compared with supplemented with glycerol. In known plant–pathogen models involving wood-degrading fungal species, such as *Postia placenta*, *Phanerochaete chrysosporium* and *G. trabeum*, secreted peroxidases are related to lignin degradation (Daniel et al., 2007; Wymelenberg et al., 2010). Moreover, extracellular sources of hydrogen peroxide, such as that generated by methanol oxidation are related to lignin degradation via the Fenton reaction:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ = \text{OH} + \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$ . The hydroxyl radicals generated by this reaction ( $\cdot\text{OH}$ ) are able to penetrate the plant cells of infected hosts and act as depolymerizing agents, thus causing extensive cell damage (Schlosser et al., 2000). The necrosis observed in the dry broom phase of WBD as a consequence of plant cell death may be caused by, among other factors, lignin degradation via peroxidases and/or the Fenton reaction. Although *M. perniciosa* is not a classical wood-degrading phytopathogen, studies have revealed that this species is probably derived from a saprotrophic ancestral (Aime and Phillips-Mora, 2005; Tiburcio et al., 2010); thus, *M. perniciosa* may have retained its ability to degrade wood.

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

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

uncertain (Segers et al., 2001). In phytopathogenicity, MOX has been related to lignin degradation instead of the pectin degradation as proposed in this work. In the wood-degrading basidiomycetes, such as *P. placenta* and *G. trabeum*, MOX is suggested to generate the hydrogen peroxide used for Fenton's reaction (Daniel et al., 2007; Martinez et al., 2009). Although we cannot discard the possibility that MOX participates in Fenton's reaction, providing the extracellular hydrogen peroxide used for Fenton's reaction, our data strongly suggest that *M. perniciosa* methanol oxidase is related to the pectin degradation. Moreover, as *M. perniciosa* is able to grow on methanol as the sole carbon source and possesses the complete pathway for methanol degradation, we also suggest that this fungus utilizes methanol as an energy source, similar to the methylotrophic yeast species. This is in contrast to wood-degrading fungal species, in which methanol degradation is only described as a provider of extracellular generator of hydrogen peroxide (Daniel et al., 2007). Lastly, MOX also uses ethanol as a substrate; in plants, ethanol is derived from fermentative growth on sugars and used as a carbon source via acetaldehyde and the TCA cycle; however, we carefully inspected over 80 RNA-seq libraries and have found no metabolism compatible with ethanol production by the plant (data not shown); on the other hand, our results show evidences for the presence of methanol and for that reason we consider that this is the substrate utilized by the proposed pathway. The disruption of the *Mp-mox* and *Mp-pme* genes from *M. perniciosa* would be a key next step in confirming the role of these two enzymes in the establishment of WBD and will be performed as soon as gene disruption techniques are developed for *M. perniciosa*.

## 5. Conclusions

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

## Acknowledgments

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

## References

Aime, M.C., Phillips-Mora, W., 2005. The causal agents of Witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97, 1012–1022.

Buckeridge, M.S., Reid, J.S., 1994. Purification and properties of a novel beta-galactosidase or exo-(1→4)-beta-D-galactanase from the cotyledons of germinated *Lupinus angustifolius* L. seeds. *Planta* 192, 502–511.

Daniel, G., Volc, J., Filonova, L., Plihal, O., Kubatova, E., Halada, P., 2007. Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular

source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in brown rot decay of wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6241–6253.

de Hoop, M.J., Ab, G., 1992. Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. *Biochem. J.* 286 (Pt 3), 657–669.

de Souza, T.A., Soprano, A.S., de Lira, N.P., Quaresma, A.J., Pauletti, B.A., Paes Leme, A.F., Benedetti, C.E., 2012. The TAL effector PthA4 interacts with nuclear factors involved in RNA-dependent processes including a HMG protein that selectively binds poly(U) RNA. *PLoS One* 7, e32305.

Delgado, J.C., Cook, A.A., 1976. Nuclear condition of basidia, basidiospores, and mycelium of *Marasmius-Perniciosus*. *Can. J. Bot. – Rev. Can. Bot.* 54, 66–72.

Evans, H.C., 1978. Witches broom disease of cocoa (*Crinipellis-Perniciosa*) in Ecuador 1. *Fungus. Ann. Appl. Biol.* 89, 185–192.

Evans, H.C., 1980. Pleomorphism in *Crinipellis-Perniciosa*, causal agent of Witches broom disease of cocoa. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 74, 515–523.

Evans, H.C., Bastos, C.N., 1980. Basidiospore germination as a means of assessing resistance to *Crinipellis-Perniciosa* (Witches broom disease) in cocoa cultivars. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 74, 525–536.

Frias, G.A., Purdy, L.H., Schmidt, R.A., 1991. Infection biology of *Crinipellis-Perniciosa* on vegetative flushes of cacao. *Plant Dis.* 75, 552–556.

Giuseppin, M.L., Van Eijk, H.M., Bes, B.C., 1988. Molecular regulation of methanol oxidase activity in continuous cultures of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* 32, 577–583.

Gould, S.G., Keller, G.A., Subramani, S., 1987. Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J. Cell Biol.* 105, 2923–2931.

Griffith, G.W., Hedger, J.N., 1994. The breeding biology of biotypes of the Witches-broom pathogen of cocoa *Crinipellis-Perniciosa*. *Heredity* 72, 278–289.

Griffith, G.W., Nicholson, J., Nenninger, A., Birch, R.N., Hedger, J.N., 2003. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. *NZ J. Bot.* 41, 423–435.

Guimaraes, R.L., Stotz, H.U., 2004. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiol.* 136, 3703–3711.

Gunkel, K., van Dijk, R., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., 2004. Routing of *Hansenula polymorpha* alcohol oxidase: an alternative peroxisomal protein-sorting machinery. *Mol. Biol. Cell* 15, 1347–1355.

Han, Y., Joosten, H.J., Niu, W., Zhao, Z., Mariano, P.S., McCalman, M., van Kan, J., Schaap, P.J., Dunaway-Mariano, D., 2007. Oxaloacetate hydrolase, the C-C bond lyase of oxalate secreting fungi. *J. Biol. Chem.* 282, 9581–9590.

Hanna, S.L., Sherman, N.E., Kinter, M.T., Goldberg, J.B., 2000. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Microbiology* 146 (Pt 10), 2495–2508.

Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137.

Kaszycki, P., Koloczek, H., 2000. Formaldehyde and methanol biodegradation with the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* in a model wastewater system. *Microbiol. Res.* 154, 289–296.

Langmead, B., 2010. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr. Protoc. Bioinform. Unit* 11 7 (Chapter 11).

Lazarow, P.B., 2006. The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1599–1604.

Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmoll, M., Kubicek, C.P., Ferreira, P., Ruiz-Duenas, F.J., Martinez, A.T., Kersten, P., Hammel, K.E., Wymelenberg, A.V., Gaskell, J., Lindquist, E., Sabat, G., BonDurant, S.S., Larrondo, L.F., Canessa, P., Vicuna, R., Yadav, J., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Pisabarro, A.G., Lavin, J.L., Oguiza, J.A., Master, E., Henriessat, B., Coutinho, P.M., Harris, P., Magnuson, J.K., Baker, S.E., Bruno, K., Kenealy, W., Hoegger, P.J., Kues, U., Ramaiya, P., Lucash, S., Salamov, A., Shapiro, H., Tu, H., Chee, C.L., Misra, M., Xie, G., Teter, S., Yaver, D., James, T., Mokrejs, M., Pospisek, M., Grigoriev, I.V., Brettin, T., Rokhsar, D., Berka, R., Cullen, D., 2009. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 1954–1959.

Meinhardt, L.W., Bellato Cde, M., Rincones, J., Azevedo, R.A., Cascardo, J.C., Pereira, G.A., 2006. In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of Witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Curr. Microbiol.* 52, 191–196.

Mondego, J.M., Carazzolle, M.F., Costa, G.G., Formighieri, E.F., Parizzi, L.P., Rincones, J., Cotomacci, C., Carraro, D.M., Cunha, A.F., Carrer, H., Vidal, R.O., Estrela, R.C., Garcia, O., Thomazella, D.P., de Oliveira, B.V., Pires, A.B., Rio, M.C., Araujo, M.R., de Moraes, M.H., Castro, L.A., Gramacho, K.P., Goncalves, M.S., Neto, J.P., Neto, A.G., Barbosa, L.V., Guiltinan, M.J., Bailey, B.A., Meinhardt, L.W., Cascardo, J.C., Pereira, G.A., 2008. A genome survey of *Monilophthora perniciosa* gives new insights into Witches' broom disease of cacao. *BMC Genom.* 9, 548.

Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B., 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621–628.

Nakagawa, T., Miyaji, T., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N., Tomizuka, N., 2000. A methylotrophic pathway participates in pectin utilization by *Candida boidinii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4253–4257.

Nakagawa, T., Yamada, K., Fujimura, S., Ito, T., Miyaji, T., Tomizuka, N., 2005. Pectin utilization by the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *Microbiology* 151, 2047–2052.

Nemecek-Marshall, M., MacDonald, R.C., Franzen, J.J., Wojciechowski, C.L., Fall, R., 1995. Methanol emission from leaves (enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development). *Plant Physiol.* 108, 1359–1368.

- Orfila, C., Knox, J.P., 2000. Spatial regulation of pectic polysaccharides in relation to pit fields in cell walls of tomato fruit pericarp. *Plant Physiol.* 122, 775–781.
- Ozimek, P., Kotter, P., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., 2006. *Hansenula polymorpha* and *Saccharomyces cerevisiae* Pex5p's recognize different, independent peroxisomal targeting signals in alcohol oxidase. *FEBS Lett.* 580, 46–50.
- Ozimek, P., Veenhuis, M., van der Klei, I.J., 2005. Alcohol oxidase: a complex peroxisomal, oligomeric flavoprotein. *FEMS Yeast Res.* 5, 975–983.
- Pelloux, J., Rusterucci, C., Mellerowicz, E.J., 2007. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* 12, 267–277.
- Penman, D., Britton, G., Hardwick, K., Collin, H.A., Isaac, S., 2000. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycol. Res.* 104, 671–675.
- Pereira, J.L., Ram, A., Figueiredo, J.M., de Almeida, L.C., 1989. La primera aparición de la "Escoba de Bruja" en la principal región productora de cacao del Brasil. *Turrialba* 36, 459–461.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 29, e45.
- Rincones, J., Scarpari, L.M., Carazzolle, M.F., Mondego, J.M., Formighieri, E.F., Barau, J.G., Costa, G.G., Carraro, D.M., Brentani, H.P., Vilas-Boas, L.A., de Oliveira, B.V., Sabha, M., Dias, R., Cascardo, J.M., Azevedo, R.A., Meinhardt, L.W., Pereira, G.A., 2008. Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the Witches' broom pathogen *Moniliophthora pernicioso*. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 21, 891–908.
- Rio, M.C., de Oliveira, B.V., de Tomazella, D.P., Silva, J.A., Pereira, G.A., 2008. Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cacao. *Curr. Microbiol.* 56, 363–370.
- Roggenkamp, R., Janowicz, Z., Stanikowski, B., Hollenberg, C.P., 1984. Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Mol. Gen. Genet.* 194, 489–493.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365–386.
- Sahm, H., Wagner, F., 1973. Microbial assimilation of methanol. The ethanol- and methanol-oxidizing enzymes of the yeast *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.* 36, 250–256.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., Vandamme, E.J., 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 39, 213–294.
- Scarpari, L.M., Meinhardt, L.W., Mazzafera, P., Pomella, A.W., Schiavinato, M.A., Cascardo, J.C., Pereira, G.A., 2005. Biochemical changes during the development of Witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*. *J. Exp. Bot.* 56, 865–877.
- Schlosser, D., Fahr, K., Karl, W., Wetzstein, H.G., 2000. Hydroxylated metabolites of 2,4-dichlorophenol imply a Fenton-type reaction in *Gloeophyllum striatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2479–2483.
- Segers, G., Bradshaw, N., Archer, D., Blissett, K., Oliver, R.P., 2001. Alcohol oxidase is a novel pathogenicity factor for *Cladosporium fulvum*, but aldehyde dehydrogenase is dispensable. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 14, 367–377.
- Silva, S.D.V.M.K.M., 1999. Histologia da Interação *Crinipellis pernicioso* em Cacaueiros Suscetível e Resistente à Vassoura-de-Bruja. *Fitopatol. Bras.* 24, 54–59.
- Teixeira, P.J.P.L., Mondego, J.M.C., Pereira, G.A.G., A method for production of *Moniliophthora pernicioso* basidiospores in vitro. Manuscript in preparation.
- Thomazella, D.P., Teixeira, P.J., Oliveira, H.C., Saviani, E.E., Rincones, J., Toni, I.M., Reis, O., Garcia, O., Meinhardt, L.W., Salgado, I., Pereira, G.A., 2012. The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora pernicioso* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New Phytol.*
- Tiburcio, R.A., Costa, G.G., Carazzolle, M.F., Mondego, J.M., Schuster, S.C., Carlson, J.E., Guiltinan, M.J., Bailey, B.A., Mieczkowski, P., Meinhardt, L.W., Pereira, G.A., 2010. Genes acquired by horizontal transfer are potentially involved in the evolution of phytopathogenicity in *Moniliophthora pernicioso* and *Moniliophthora roreri*, two of the major pathogens of cacao. *J. Mol. Evol.* 70, 85–97.
- Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C., Boccara, M., 2003. Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene Bcpme1 reduces virulence on several host plants. *Mol. Plant–Microbe Interact.* 16, 360–367.
- Van der Klei, I.J., Bystrykh, L.V., Harder, W., 1990. Alcohol oxidase from *Hansenula polymorpha* CBS 4732. *Methods Enzymol.* 188, 420–427.
- Veenhuis, M., Van Dijken, J.P., Harder, W., 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv. Microb. Physiol.* 24, 1–82.
- Vidal, R.O., Mondego, J.M., Pot, D., Ambrosio, A.B., Andrade, A.C., Pereira, L.F., Colombo, C.A., Vieira, L.G., Carazzolle, M.F., Pereira, G.A., 2010. A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. *Plant Physiol.* 154, 1053–1066.
- Waterham, H.R., Russell, K.A., Vries, Y., Cregg, J.M., 1997. Peroxisomal targeting, import, and assembly of alcohol oxidase in *Pichia pastoris*. *J. Cell Biol.* 139, 1419–1431.
- Wierenga, R.K., Terpstra, P., Hol, W.G.J., 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding  $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* 187, 101–107.
- Willats, W.G., Limberg, G., Buchholt, H.C., van Alebeek, G.J., Benen, J., Christensen, T.M., Visser, J., Voragen, A., Mikkelsen, J.D., Knox, J.P., 2000. Analysis of pectic epitopes recognised by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydrate Res.* 327, 309–320.
- Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J.P., 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol. Biol.* 47, 9–27.
- Wymelenberg, A.V., Gaskell, J., Mozuch, M., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., Mansfield, S.D., Blanchette, R.A., Martinez, D., Grigoriev, I., Kersten, P.J., Cullen, D., 2010. Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3599–3610.
- Yurimoto, H., Komeda, T., Lim, C.R., Nakagawa, T., Kondo, K., Kato, N., Sakai, Y., 2000. Regulation and evaluation of five methanol-inducible promoters in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1493, 56–63.
- Yurimoto, H., Oku, M., Sakai, Y., 2011. Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis. *Int. J. Microbiol.* 2011, 101298.



**ANEXO II**



## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada "**Análise integrada do papel dos hormônios vegetais durante a progressão da Vassoura-de-bruxa do cacau**":

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

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

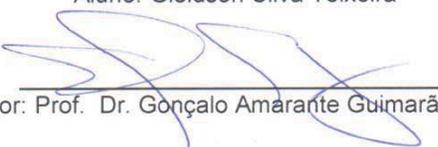
( x ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. 2011/03, Instituição: Instituto de Biologia/Unicamp.

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

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

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

  
\_\_\_\_\_  
Aluno: Gleidson Silva Teixeira

  
Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido ( ) Indeferido

  
\_\_\_\_\_

Carimbo e assinatura

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

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura