

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GUSTAVO HENRIQUE ALCALÁ ZAPAROLI

“Uma segunda família de proteínas indutoras de necrose encontrada em *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença Vassoura-de-Bruxa em cacauzeiros”

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

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Z17n Zaparoli, Gustavo Henrique Alcalá
Uma segunda família de proteínas indutoras de necrose encontrada em *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença vassoura-de-bruxa em cacauzeiros / Gustavo Henrique Alcalá Zaparoli. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

1. Elicitores. 2. *Moniliophthora perniciosa*. 3. Cerato-platanina. I. Pereira, Gonçalo Amarante Guimarães. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: A second family of necrosis inducing protein found in *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches's broom disease in cacao.

Palavras-chave em inglês: Elicitors; *Moniliophthora perniciosa*; Cerato-platanin.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Mestre em Genética de Microorganismos.

Banca examinadora: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Jörg Kobarg, Wanderley Dias da Silveira.

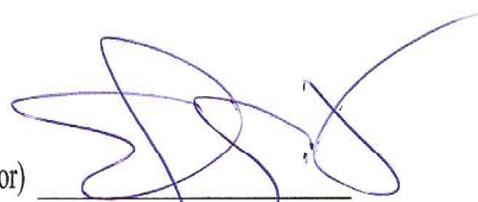
Data da defesa: 05/10/2007.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 05 de outubro de 2007

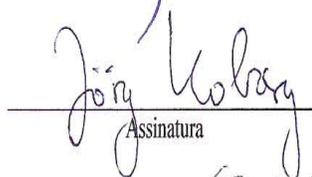
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (Orientador)



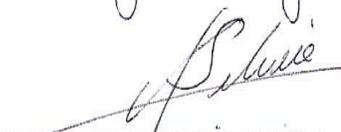
Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg



Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira



Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Assinatura

**AGRADEÇO À MINHA FAMÍLIA PELO APOIO E COMPREENSÃO,
AO PESSOAL DO LAB. E AOS MEUS AMIGOS.**

**“O SIMPLES FARFALHAR DE ASAS DE UMA BORBOLETA PODE CAUSAR
UM TUFÃO NO OUTRO LADO DO MUNDO”**

RESUMO

O fungo basidiomiceto hemibiotrófico *Monilophthora perniciosa* é o agente causador da doença Vassoura-de-Bruxa em cacauzeiros. A infecção é caracterizada pela hipertrofia e hiperplasia dos tecidos da planta durante a fase biotrófica do fungo, formando as denominadas vassouras-verdes, que sofrem necrose e completa degradação durante a fase saprotrófica do fungo, formando as vassouras-secas. Encontramos no genoma de *M. perniciosa* pelo menos cinco seqüências codificando possíveis proteínas similares aos membros da família Cerato-platanina, uma classe de proteínas inicialmente encontrada no fitopatógeno *Ceratocystis fimbriata*. Um dos genes de *M. perniciosa* cerato-platanina (MpCP1) foi expresso “in vitro” e mostrou ter capacidade de induzir necrose em folhas de tabaco e cacauzeiro. A proteína apresenta-se em solução como um dímero e é capaz de recuperar a capacidade de necrose após tratamento de desnaturação térmica. Análises de transcrição “ex planta” mostraram que MpCP1 é mais expresso no micélio biotrófico do que no saprotrófico. O perfil de necrose apresentado é diferente do causado pelas MpNEPs (outra família de elicitores presente em *M. perniciosa*), mas quando aplicadas em conjunto nas plantas, MpCP1 e MpNEP2 apresentam um efeito sinérgico muito semelhante ao encontrado em plantas naturalmente infectadas pelo fungo.

ABSTRACT

The hemibiotrophic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* is the causal agent of the Witches' Broom Disease of cacao. The infection in pod is characterized by the formation of hypertrophic and hyperplastic tissues in the biotrophic phase, forming the green broom, which is followed by necrosis and complete degradation of the organ, causing the dry broom. We found in the fungus genome at least five sequences encoding putative proteins similar to cerato-platanin-like proteins, a class of proteins initially found in the phytopathogen *Ceratocystis fimbriata*. One *M. perniciosa* cerato-platanin gene (MpCP1) was expressed "in vitro" and proved to have necrosis inducing ability in tobacco and cacao leaves. The protein is present in solution as dimers and is able to recover necrosis activity after heat treatment. Transcription analysis "ex planta" showed that MpCP1 is more expressed in biotrophic-like mycelia in comparison to saprotrophic mycelia. The necrosis profile presented is different from that caused by MpNEPs (other family of elicitors also found in *M. perniciosa*). Most remarkable, mixture of MpCP1 with MpNEP2 led to a synergic necrosis effect very similar to that found in naturally infected plants.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
<i>Theobroma cacao</i>	9
Doenças do cacauero	11
<i>Moniliophthora perniciosa</i>	12
<i>Phytophthora</i> spp	15
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	15
Manejo das doenças do cacauero	16
Projeto genoma Vassoura-de-Bruca	18
Interação patógeno-hospedeiro, elicitores e respostas de defesa	19
Cerato-platanina	25
JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS	27
MATERIAIS e MÉTODOS	28
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	49
PERSPECTIVAS	58
REFERÊNCIAS	59

INTRODUÇÃO

Na famosa história infantil "Alice no país das maravilhas" (Carroll, 1960), há uma curiosa passagem em que a personagem corre muito para fugir do exército de cartas de baralho, mas tudo ao seu redor corre junto com ela, e então torna-se uma corrida sem fim. A Rainha Vermelha diz para Alice: “Corra o quanto quiser menina, mas não vai conseguir sair do lugar”. Essa passagem tem sido largamente utilizada em uma perspectiva evolutiva para se comparar o que ocorre entre duas espécies em co-evolução.

Biologicamente falando, co-evolução é a influência evolucionária mútua entre duas espécies, que estão constantemente exercendo pressão seletiva uma sobre a outra. Como exemplo pode-se citar a relação entre flores e insetos polinizadores, a disputa entre presas e seus predadores, e a luta entre patógenos e hospedeiros (Heylighen, 2000). Esta teoria foi denominada “Hipótese da Rainha Vermelha” pelo biólogo evolucionista Leigh Van Valen em 1973, como uma analogia ao livro de Carrol (Valen, 1973).

Na relação patógeno-hospedeiro, por mais que o segundo “corra na frente” e desenvolva novas estratégias de combate e prevenção ao seu agressor, este “corre atrás” e sempre acaba encontrando formas de superar a nova resistência adquirida. É uma corrida sem fim, mas invariavelmente disputada na natureza, e o papel da ciência nesta corrida é o de prover uma "dianteira" para os hospedeiros de interesse econômico.

A co-evolução de vegetais e microorganismos patogênicos tem resultado em mecanismos de comunicação mútua extremamente sensíveis e versáteis, que começam logo depois do reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro. Nesta comunicação intervém grande variedade de sinais físicos e químicos, que se continuam como uma série de eventos de transdução de sinais capazes de induzir a expressão de inúmeros genes (tanto da planta quanto do patógeno) levando a uma resposta de resistência ou susceptibilidade (Kolattukudy, 1995).

As plantas desenvolveram diversos mecanismos de reconhecimento a determinadas moléculas específicas de seus invasores, a fim de perceber o problema e exterminar o patógeno. Por outro lado, os invasores evoluíram maneiras de permanecerem despercebidos durante a colonização do hospedeiro, dificultando a ação defensiva das plantas.

Milhares de patógenos têm causado perdas consideráveis na produção agrícola em todo o mundo, e dentre esses patógenos encontram-se muitas espécies de bactérias, fungos, oomicetos, vírus, nematóides e artrópodes. Através do estudo detalhado desses organismos e de seus mecanismos de interação com as diferentes espécies de plantas, é possível desenvolver estratégias de auxílio na defesa de plantas, e tentar prover uma certa vantagem na corrida pela evolução.

O presente estudo aborda a interação entre o cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) e o fungo basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença Vassoura-de-Bruca.

Theobroma cacao

O fruto do cacauzeiro, conhecido como cacau, é originário da América, e conhecido como alimento e ingrediente de bebidas pelos povos que aqui habitavam antes da colonização européia. Segundo a cultura asteca, o nome do gênero *Theobroma* significa “comida dos deuses”, e o fruto do cacauzeiro foi trazido dos céus pelos deuses para a satisfação de seu povo, como um presente (Bowers *et al.* 2001). A palavra cacau é originária de “kakaw”, adaptada da língua maia pelos espanhóis na época dos descobrimentos. Nesta época o chocolate foi introduzido na Europa e utilizado na confecção de bebidas finas pela nobreza. O chocolate foi a primeira bebida estimulante utilizada na Europa, antes mesmo do café e do chá (Head, 1903).

O cacauzeiro é uma árvore perene e de porte pequeno (4-8m de altura), da família Malvaceae (*Sterculiaceae sensu strictu*). A espécie é nativa do México, mas cresce naturalmente em regiões tropicais do mundo todo, e requer um ambiente de clima quente e úmido com chuvas regulares e solo fértil e irrigado para o crescimento.

As pequenas (1-2 cm de diâmetro) e róseas flores do cacauzeiro crescem em grupos diretamente no tronco e nos galhos mais antigos da árvore, enquanto os frutos são grandes (15-30 cm de comprimento por 8-10 cm de largura), amarelos ou alaranjados e pesam cerca de 500g quando maduros. Cada fruto contém cerca de 20 a 60 sementes com alta taxa de gordura, denominada manteiga de cacau.

É do fruto do cacauzeiro que se faz uma das maiores iguarias de todos os tempos, o chocolate, através da moagem das suas amêndoas secas. Para a fabricação de 1 kg de

chocolate, são necessárias entre 300 e 600 sementes, dependendo da qualidade final desejada pelo produtor. Seu consumo cresce assustadoramente ao redor do mundo, gerando empregos a milhares de pessoas e enormes lucros a empresas alimentícias (o chocolate movimenta cerca de 60 bilhões de dólares por ano). Outros subprodutos do cacau incluem sua polpa, suco, geléia, destilados finos e sorvete.

A produção mundial de cacau tem se comportado de maneira sempre ascendente. Entre 1993/94 e 2003/04 a produção mundial saiu de 2,49 para 3,6 milhões de toneladas, perfazendo um crescimento de 38,86%. A produção que mais cresceu foi a de Costa do Marfim, saindo de 840 mil toneladas para 1,4 milhões de toneladas, ocupando a primeira posição, com cerca de 40% da produção mundial (Tabela 1).

Top Cocoa Producers <i>in 2004</i>	
(million metric tons)	
 Côte d'Ivoire	1.33
 Ghana	0.74
 Indonesia	0.43
 Nigeria	0.37
 Brazil	0.17
 Cambodia	0.13
 Ecuador	0.09
World Total	3.6

Tabela 1. Maiores produtores mundiais de cacau, com a produção em milhões de toneladas métricas. Retirado de *UN Food & Agriculture Organisation (FAO)*.

Já a participação brasileira na produção mundial caiu avassaladoramente, devido ao surgimento da doença Vassoura-de-Bruxa. Em 1993/94 sua produção estava em 320,5 mil toneladas e a sua participação na produção mundial estava em 14,8%. A produção chegou ao fundo do poço em 1999/2000 com a produção de apenas 123,5 mil toneladas, chegando a participar com apenas 4,01% da produção mundial (CEPLAC) – Gráfico 1.

No Brasil a plantaçaõ cacaeira encontrou seu nicho no sul do estado da Bahia, devido ao clima úmido e solo fértil, além de enorme disponibilidade de mão de obra. O estado era responsável por cerca de 80% da produção nacional e vinha em enorme

ascensão, até o surgimento da doença Vassoura-de-Bruxa. As perdas ocasionadas pela doença, associadas aos baixos preços das sementes de cacau atingidos no mercado internacional, fragilizou consideravelmente a situação sócio-econômica das regiões produtoras do cacau no país, onde cerca de 2,5 milhões de pessoas dependem dessa atividade (<http://www.agricultura.gov.br>). Este problema atinge o Brasil como um todo ao afetar toda a cadeia produtiva de cacau. Devido à drástica redução na produção de cacau, o Brasil hoje deve importar este produto para assim suprir sua demanda interna, incrementando assim os custos de produção de chocolate. Além disso, com as perdas das plantações de cacau, os produtores passaram a desmatar a mata e começaram a criar gado, afetando também o equilíbrio ecológico na região.

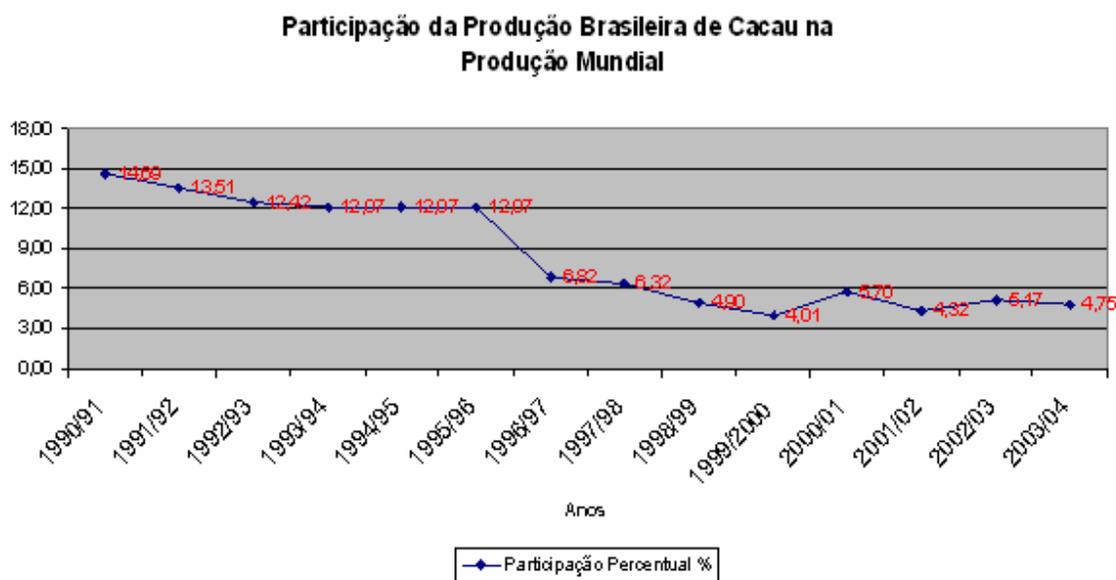


Gráfico 1. Participação da produção brasileira de cacau na produção mundial (CEPLAC)

Doenças do cacauero

Dentre as principais doenças que atingem o cacauero, podemos observar patógenos de diferentes reinos e classes, alguns desses atingindo regiões específicas e outros espalhados por toda a região produtora de cacau ao redor do mundo.

Existem fungos ascomycetos, como *Ceratocystis fimbriata* causador do “Mal-do-Facão” (que atinge países da América do Sul), *Verticillium dahliae*, causador da “Murcha

do *Verticillium*” nas principais regiões produtoras do mundo, e *Oncobasidium theobromae*, que causa a “Morte Descendente do cacau” na Ásia; e também fungos basidiomicetos como *Moniliophthora perniciosa*, causador da “Vassoura-de-Bruxa” e *Moniliophthora roreri*, que causa a “Monília do cacauero”, as duas últimas doenças atingindo países da América.

Várias espécies de oomicetos do gênero *Phytophthora* causam a “Podridão Parda” nas árvores de cacau, antiga doença que ocorre nas Américas, África e Ásia e é responsável pelas maiores perdas ao redor do globo terrestre (Erwin e Ribeiro, 1996).

Além disso, as plantações da Indonésia são muito prejudicadas pelo inseto lepidóptero *Conopomorpha cramerella* causador da doença conhecida como “Cocoa Pod Borer”; e o vírus CSSV - “Cacao Swollen Shoot Virus” ataca os cacaueros na África Ocidental (Taylor, 1998; APSnet).

Entre as espécies de maior efeito econômico no Brasil, estão *Moniliophthora perniciosa*, *Ceratocystis fimbriata* e algumas espécies do gênero *Phytophthora*.

Moniliophthora perniciosa

A doença Vassoura-de-Bruxa é atualmente o maior problema fitopatológico do estado da Bahia e um dos maiores de toda a América produtora de cacau. A doença é causada pelo fungo basidiomiceto *Moniliophthora* (= *Crinipellis*) *perniciosa* (Stahel, 1915; Aime e Phillips-Mora, 2005), originário da bacia amazônica e detectado no sul da Bahia em 1989 (Pereira *et al.*, 1996). Atualmente, a doença encontra-se espalhada por toda a América produtora de cacau, ocorrendo na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Granadas, Guiana, Panamá, Peru, São Vicente, Suriname, Trindade e Tobago e Venezuela.

A Vassoura-de-Bruxa debilita as árvores de cacau através do redirecionamento de energia para as numerosas vassouras, que são ramos secos infectados pelo fungo, semelhantes às palhas de uma vassoura – daí o nome da doença. As vassouras não formam flores, o que resulta numa redução do potencial de produção de frutos (Bowers *et al.*, 2001). O fungo pode atingir também diretamente os frutos, formando frutos menores chamados de morangos, e inviabilizando sua comercialização.

Durante a colonização de uma planta hospedeira, os fungos patogênicos podem exibir dois tipos fundamentais de nutrição: biotrófico ou parasítico, que obtém nutrientes do

hospede sem causar a morte celular; e necrotrófico ou saprotrófico, que matam as células hospedeiras ao redor em busca de nutrientes para sobreviver. Algumas espécies de fungo agem como biotróficos e saprotróficos em diferentes estádios da doença e são denominados hemibiotróficos.

O ciclo de vida de *Moniliophthora perniciosa* é hemibiotrófico (Purdy e Schmidt, 1996), apresentando, portanto, dois tipos de micélio durante seu ciclo de vida (Fig. 1). O ciclo de vida do fungo começa quando os basidiósporos germinam sobre a cutícula e a base dos tricomas da planta. A penetração pode ser pelo estômato, por tecidos lesados ou pela penetração direta sem que haja a formação de apressórios (Sreenivasan, 1989). Estes tubos germinativos penetram unicamente em tecidos meristemáticos, formando um micélio uninuclear e haplóide que invade os espaços intercelulares do tecido com hifas relativamente grossas (5-20 μm), irregulares, monocarióticas e com ausência de grampos de conexão (Silva e Matsuoka, 1999).

Os tecidos colonizados sofrem diversas modificações fisiológicas e hormonais, ocasionando inchaço e formação de ramos vegetativos anormais (vassouras verdes) por toda a planta, resultantes da perda de dominância apical, além de causar anomalias nos frutos e almofadas florais (Evans, 1979; Orchard *et al.*, 1994). As vassouras são geralmente formadas entre 5 e 6 semanas após a infecção.

Durante esta primeira fase, o fungo garante um suprimento de energia vivendo como um parasita intercelular obrigatório ou biotrófico, agindo como um dreno nutricional (Scarpari *et al.*, 2005).

A fase sexual é marcada pela fusão de hifas (plasmogamia ou anastomose) de dois isolados compatíveis para formar um micélio dicariótico. (Delgado e Cook, 1976) demonstraram em estudos citológicos que a dicarionização ocorre em hifas monocarióticas derivadas de um único basidiósporo uninucleado, evidenciando a natureza homotática (autofértil) de *Moniliophthora perniciosa*.

O crescimento de *M. perniciosa* dicarionizado dá origem a um micélio de fase secundária, saprotrófico, no qual as hifas são mais finas (1,5-3 μm) e muito mais numerosas no interior da planta, e apresentam grampos de conexão (Silva e Matsuoka, 1999). Nesta fase, o fungo causa necrose, apodrecimento e morte dos tecidos afetados da planta, formando assim o fenótipo da doença conhecido como vassouras secas. Unicamente nesta

fase da vida do fungo, após um período de seca, aparecem os basidiomas, os quais produzem numerosos esporos que disseminam cada vez mais a doença e reiniciam o ciclo (Andebrhan, 1987; Orchard *et al.*, 1994). As condições climáticas do sul do estado da Bahia, com períodos intermitentes de seca e umidade, favorecem a sobrevivência do fungo e a produção de esporos durante o ano todo.

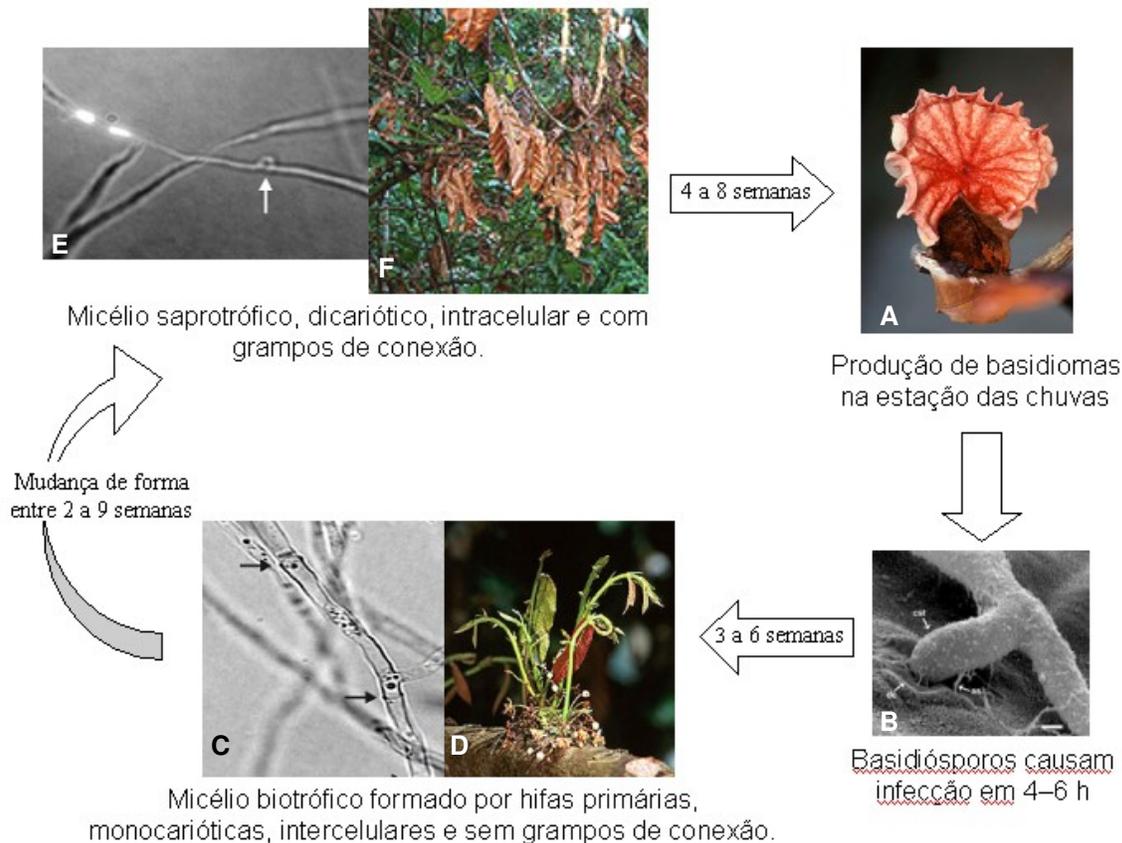


Figura 1. Ciclo de Vida de *Moniliophthora perniciosa* em *Theobroma cacao*.

A) o ciclo é iniciado pelo lançamento de basidiósporos, produzidos no basidioma, sobre a superfície da planta hospedeira; B) germinação dos basidiósporos com formação de um tubo germinativo e penetração através do estômato, tecido lesado ou diretamente; C) hifa biotrófica do micélio primário, encontrada em tecidos meristemáticos vivos do hospedeiro, conhecidos como vassouras verdes (D); E) hifa saprotrófica do micélio secundário, encontrada nos tecidos necrosados do hospedeiro (F) e que dará origem à formação de basidiomas.

Phytophthora spp

As espécies de *Phytophthora* são responsáveis pelas maiores perdas mundiais relacionadas ao cacau, atingindo principalmente as plantações de países da África Central e Ocidental, maiores produtores mundiais de semente de cacau, responsáveis por 60-70% de todo o mercado internacional.

No Brasil, as espécies de *Phytophthora* atingem as plantações e causam uma doença conhecida como Podridão Parda. Para se ter uma idéia do poder de destruição desse patógeno, antes do aparecimento do fungo *Moniliophthora perniciosa* na Bahia, a Podridão Parda sozinha era responsável pela perda de 30% da produção no Brasil (Gramacho *et al.*, 1992).

A semelhança dos sintomas entre as doenças causadas no cacau por *M. perniciosa* e *Phytophthora spp* é muito grande, com o aparecimento de necrose nas folhas e frutos, e são dificilmente diferenciados visualmente. A diferença encontrada nos frutos, por exemplo, é a origem da necrose. Enquanto na Vassoura-de-Bruxa a necrose inicia-se por fora do fruto, na Podridão Parda a necrose vem de dentro.

Ceratocystis fimbriata

O fungo ascomiceto *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *Platani* é causador de doenças em muitas plantas lenhosas e em algumas herbáceas de importância econômica como, por exemplo, batata doce, cacau, cafeeiro, citros, eucalipto, figo, seringueira e o plátano, árvore utilizada como ornamentação na Europa (Ferreira, 2005). Em eucalipto, a doença é extremamente danosa, uma vez que atinge o caule da árvore, inviabilizando a obtenção de celulose e conseqüentemente a produção de papel.

Dentre os sintomas das doenças causadas por *Ceratocystis fimbriata* estão o murchamento das folhas e o espalhamento de lesões necróticas pelo floema, câmbio e lenho juvenil, ocasionando em muitos casos a morte da árvore.

Nas plantações de cacau, este fungo é responsável pela doença conhecida como Mal-do-Facão, e provoca a formação de um cancro no caule, seguido de murchamento e morte da árvore. Diferentemente da Vassoura-de-Bruxa e da Podridão Parda, que debilitam

as árvores e inviabilizam a produção de frutos, o Mal-do-Facão mata a árvore como um todo.

O fungo penetra na planta através de aberturas provocadas no caule por ferramentas (daí o nome da doença) ou insetos, que atuam como vetores de disseminação da doença. A doença também se espalha através do vento, respingos de chuva e pelo contato das raízes com o solo. O estabelecimento do fungo na planta é facilitado com umidade alta e sombreamento excessivo (condições normais em uma roça de cacau).

O fungo multiplica-se de maneira intensa dentro dos tecidos infectados e vasos condutores do cacaueiro, formando uma mancha profunda e causando obstrução na condução da seiva. Inicialmente a planta fica amarela, depois se torna marrom, seguido de um murchamento e morte que ocorre rapidamente, permanecendo as folhas aderidas à planta, mesmo após sua morte (CEPLAC).

Manejo das doenças do cacaueiro

O manejo do Mal-do-Facão é suficientemente realizado por controle fitossanitário, removendo-se as árvores doentes e queimando-as no próprio local onde estavam. Além disso, realiza-se a desinfecção das ferramentas utilizadas com hipoclorito de sódio ou formol diluído. Fungicidas não são eficientes contra essa doença. O controle profilático da Podridão Parda consiste também no controle fitossanitário dos frutos infectados, realizado paralelamente com controle químico através de fungicidas à base de cobre (CEPLAC).

Pode-se observar que o Mal-do-Facão e a Podridão Parda podem ser controladas com a realização de um controle fitossanitário eficaz ou através de fungicidas e, por isso, as doenças não são mais um problema grave em plantações de cacau.

Por outro lado, visto a grande destruição causada pela Vassoura-de-Bruca na economia brasileira e mundial, numerosos esforços têm sido realizados na tentativa de estabelecer um plano de controle efetivo e economicamente viável contra esta doença.

O manejo de cacaueiros na presença da doença Vassoura-de-Bruca requer o conhecimento profundo da biologia do fungo, epidemiologia da doença, clima ideal para o início da infecção, acesso e abundância do patógeno na região e suscetibilidade dos tecidos

do hospedeiro. Além disso, são necessárias informações agronômicas, tais como espaçamento entre as árvores, proximidade com plantações infectadas e tempo de colheita.

Esses pré-requisitos, aliados a difícil situação econômica da região baiana, tornam o controle da doença muito complicado de ser realizado. Táticas fitossanitárias (remoção de partes da planta infectadas com o fungo e prevenção contra esporulação dos basidiocarpos), controle químico e biológico, e a busca em germoplasmas por indivíduos resistentes têm sido as estratégias empregadas nessa luta.

O conhecimento do exato momento para retirada dos galhos infectados, assim como do número de vezes ao ano que será realizado o controle fitossanitário, é crucial para o efeito desejado com essa técnica. Entretanto, devido ao grande trabalho gerado, as partes infectadas com a doença geralmente não são removidas a locais longes o suficiente das plantações. Com isso, na próxima estação chuvosa ocorre a formação de novos basidiocarpos, que esporulam e então o ciclo recomeça, infectando novamente as árvores ao redor. Além disso, essa estratégia não oferece nenhuma resistência à planta, e a cada nova infecção pelo fungo o trabalho deve ser repetido. Além disso, a remoção de partes infectadas do cacauete deixa os meristemas expostos a novas infecções, facilitando novas colonizações pelo fungo.

O controle da doença por fungicidas químicos, assim como a utilização de agentes biológicos, como o fungo *Trichoderma polysporum*, mostraram-se estratégias custosas e ineficientes contra a Vassoura-de-Bruca.

Dos métodos de controle testados, o mais promissor é o uso de variedades de cacauete resistentes a *M. perniciosa*. Alguns clones de cacauete resistentes já foram distribuídos e utilizados por produtores na Bahia através da CEPLAC e no Equador através do INIAP, em Pichilingue, Quevedo.

Apesar da utilização de clones resistentes estar dando bons resultados, já foi demonstrado no Equador que linhagens resistentes podem tornar-se suscetíveis ao longo de gerações (Bartley, 1986). Além disso, um estudo recente demonstrou que a variabilidade genética de *Moniliophthora perniciosa* na Bahia é muito baixa quando comparada àquela encontrada na região amazônica, mostrando apenas a existência de dois genótipos do patógeno na Bahia (Rincones *et al.*, 2006).

Estes resultados alertam para o fato de que estes clones resistentes podem ser muito sensíveis a reintroduções de novas variedades do fungo provenientes da Amazônia, podendo devastar plantações inteiras de uma só vez, já que todas as árvores são clones do mesmo indivíduo.

Projeto genoma Vassoura-de-Bruxa

Devido ao grande problema econômico e social causado pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* nas plantações de cacau do sul da Bahia, à falta de um método de controle eficaz contra a doença e à ausência de dados sobre a biologia básica e sobre sua interação com o hospedeiro, foi lançado em 2001 um Programa de Genoma da Vassoura-de-Bruxa (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura>). Ao contrário de outros projetos genoma, esse programa tem tido como principal objetivo coordenar um conjunto de pesquisas de diferentes áreas, como biologia celular, morfologia, bioquímica, fisiologia vegetal e genética molecular, tendo os diversos pesquisadores envolvidos o apoio de um banco de dados de seqüências genômicas e de cDNA do fungo. O programa tem também um forte viés pragmático, sendo seu objetivo conseguir as bases para compreensão da doença com vistas à intervenção tecnológica para o seu combate.

Uma série de estudos relacionados à doença, provindos de pesquisas pós-genoma mostraram resultados de técnica (Gesteira Ada *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2003), da biologia do fungo (Rincones *et al.*, 2003; Rincones *et al.*, 2006), de sua bioquímica (Scarpari *et al.*, 2005) e das bases citológicas (Meinhardt *et al.*, 2006). Esses resultados, conseguidos por nosso grupo de pesquisa, estão auxiliando a compreensão do modo de vida do fungo, assim como sua atuação na doença.

Uma informação curiosa encontrada durante a fase biotrófica de *Moniliophthora perniciosa* é que, apesar do vigor fenotípico, a densidade do fungo dentro da planta nessa fase é muito baixa. (Penman *et al.*, 2000) realizaram a quantificação da biomassa fúngica dentro da planta através dos níveis de quitina, e encontraram 81 µg de biomassa fúngica/mg peso seco na vassoura verde, e 161 µg de biomassa fúngica/mg peso seco na vassoura seca. Observaram ainda, que a maioria da biomassa do fungo está concentrada na base da vassoura (215 µg/mg peso seco), declinando em direção ao topo (10 µg/mg peso seco).

Esses dados apontam para a possibilidade das alterações que ocorrem na planta serem resultados de uma resposta direta do hospedeiro à infecção ou a moléculas secretadas pelo próprio patógeno.

Interação patógeno-hospedeiro, elicitores e respostas de defesa

As plantas estão constantemente expostas a microorganismos. Para serem patogênicos, os microorganismos devem conseguir acessar o interior da planta, seja penetrando diretamente através da superfície de folhas e raízes ou entrando através de aberturas como estômatos ou ferimentos. Para isso os invasores devem superar defesas primárias das plantas, barreiras físicas e químicas pré-formadas como cutículas, camadas de cera e compostos antimicrobianos produzidos constitutivamente (Chisholm *et al.*, 2006).

Uma vez no interior da planta, os microorganismos enfrentam outro obstáculo, uma rígida parede celular de celulose. Após atravessar a parede celular, o invasor tem acesso à membrana celular da planta, local onde ocorrem as principais interações patógeno/hospedeiro. As relações de um organismo estranho com as defesas primárias, não específicas do hospedeiro, são conhecidas como interações inespecíficas (nonhost).

Quando um patógeno consegue ultrapassar todas as barreiras iniciais a ele impostas, ocorre interação direta com o hospedeiro (host). Nesse caso, a reação pode tomar dois caminhos diferentes. Caso a planta hospedeira seja resistente ao patógeno invasor, uma rápida resposta de defesa é induzida e ocorre a prevenção do desenvolvimento da doença (interação incompatível). Por outro lado, caso a planta hospedeira seja suscetível, a doença desenvolve-se e espalha-se pela planta (interação compatível), que é incapaz de reconhecer ou responde muito lentamente ao invasor (Garcia-Brugger, 2006).

O sistema de defesa das plantas deve ter a capacidade de distinguir entre próprio e não-próprio para assegurar uma resposta eficiente, assim como ocorre no sistema imune de animais. Essa discriminação é conseguida pelo reconhecimento de determinadas moléculas de superfície ou secretadas pelos patógenos. O sistema de defesa das plantas pode ser separado em duas fases, de tempos de atuação diferentes. Primeiramente a defesa basal, já descrita acima, que ocorre apenas no momento da infecção, e posteriormente a defesa

mediada por genes de resistência, que se inicia após a infecção e continua numa escala de horas (Grennan, 2006).

Uma reação comum após uma interação entre patógeno e hospedeiro, compatível ou não, é a morte celular programada (PCD). Essa resposta pode ocorrer como parte de uma defesa ativa da planta contra seu agressor, tentando isolar o patógeno no sítio da infecção, ou pode ser uma resposta deliberadamente induzida pelo invasor (Jackson e Taylor, 1996).

As moléculas de microorganismos, reconhecidas pelo sistema de defesa das plantas, são denominadas PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns ou padrões moleculares associados ao patógeno). Uma vez que estas moléculas não são somente encontradas em organismos patogênicos, este termo não está exatamente correto, mas é comumente utilizado no meio científico (Nürnberg, 2004).

A resistência a doenças em plantas está baseada em dois mecanismos básicos da imunidade inata. O primeiro, conhecido como PTI (PAMP-triggered immunity ou imunidade desencadeada por PAMPs), reconhece estruturas invariáveis da superfície de patógenos, PAMPs. O segundo mecanismo é conhecido como ETI (Effector-Triggered Immunity ou imunidade desencadeada por efetores), e está relacionado com o reconhecimento de moléculas específicas liberadas por um patógeno por determinado hospedeiro (Ausubel, 2005; Chisholm *et al.*, 2006).

Efetores são moléculas de patógenos que manipulam a estrutura e funções celulares do hospedeiro, facilitando a infecção e/ou incitando respostas de defesa. Efetores podem ser elicitores e/ou toxinas. Diferente destes, o termo efector é neutro e não implica um impacto negativo ou positivo no decorrer da doença (Kamoun, 2006). Entre as classes mais conhecidas de efetores, encontramos inibidores apoplásticos de enzimas produzidas pelo hospedeiro, uma série de proteínas pequenas ricas em cisteínas descritas com atividades elicitoras (Kamoun *et al.*, 1997), proteínas da família Nep1-Like (Pemberton e Salmond, 2004) e efetores citoplasmáticos (Kamoun, 2006).

Em muitas plantas, resistência a doenças está relacionada com a interação dos produtos de genes de resistência (*R*) na planta e genes de avirulência (*Avr*) no patógeno (teoria de gene-a-gene) (Flor, 1971). Segundo esta hipótese a reação de resistência é determinada pela expressão simultânea de um gene de avirulência do patógeno (*Avr*), com o correspondente gene de resistência da planta (*R*) (Staskawicz, 1995). Para cada gene

dominante determinando resistência (gene *R*) no hospedeiro existe um gene dominante de avirulência no patógeno (gene *Avr*) (Lauge e De Wit, 1998).

Em correspondência com esse modelo, um efetor específico (produto potencial de um gene *Avr*) é reconhecido por um receptor (produto potencial de um gene *R*) na planta resistente. Esta interação pode ativar vias de transdução de sinais que levem à ativação da resistência, geralmente envolvendo uma resposta de hipersensibilidade (HR) e expressão de genes de resistência a doenças (Scheel e Parker, 1990; Lamb, 1994). Este modelo de Flor é um dos mais simples descritos para explicar o mecanismo de reconhecimento dos produtos dos genes *Avr* por plantas carregando genes de resistência *R* (Keen, 1990; De Wit, 1992).

Entretanto, após muitas tentativas, não foi possível a demonstração de ligação direta entre as proteínas AVR e seu par correspondente R. Entre os exemplos já encontrados, estão o gene *R Pi-ta* de tomate e seu correspondente *AVR-Pita* de *Magnaporthe grisea* (Jia, 2000) e os genes *R* de *Arabidopsis thaliana* *RPS2* e *RPM1* e os respectivos genes *AvrRpt2* e *AvrB* (Leister e Katagiri, 2000).

Uma nova teoria foi criada, como uma complementação da teoria de Flor, baseando-se no fato de que muitas proteínas *Avr* estão aparentemente relacionadas com a virulência de patógenos, mas localizadas em hospedeiros onde o gene *R* correspondente não foi encontrado. Esta teoria é conhecida como “modelo do guardião” ou “modelo de vigilância” (Fig. 2). Proteínas *Avr* são efetores que interagem com proteínas alvo da planta a fim de manipular os processos fisiológicos do hospedeiro a favor do patógeno, inibindo assim as defesas basais da planta. Nesse modelo de interação, proteínas *R* são componentes do sistema de defesa das plantas e atuam como “guardiãs” que reconhecem os complexos de proteínas *Avr*. Esse reconhecimento levaria ao início do processo de defesa da planta. È como se as proteínas *R* ficassem “vigiando” a planta como um todo contra moléculas estranhas à planta.

As proteínas *Avr* não se ligam diretamente com as proteínas *R*, nesse caso, mas com outros receptores do sistema de defesa primário da planta, impedindo a resposta de defesa do hospedeiro. Esse complexo formado pelas proteínas *Avr* e do sistema defensivo da planta é então reconhecido pela proteína *R*, que ativa a cascata de reações que originará uma defesa efetiva (Dangl e Jones, 2001).

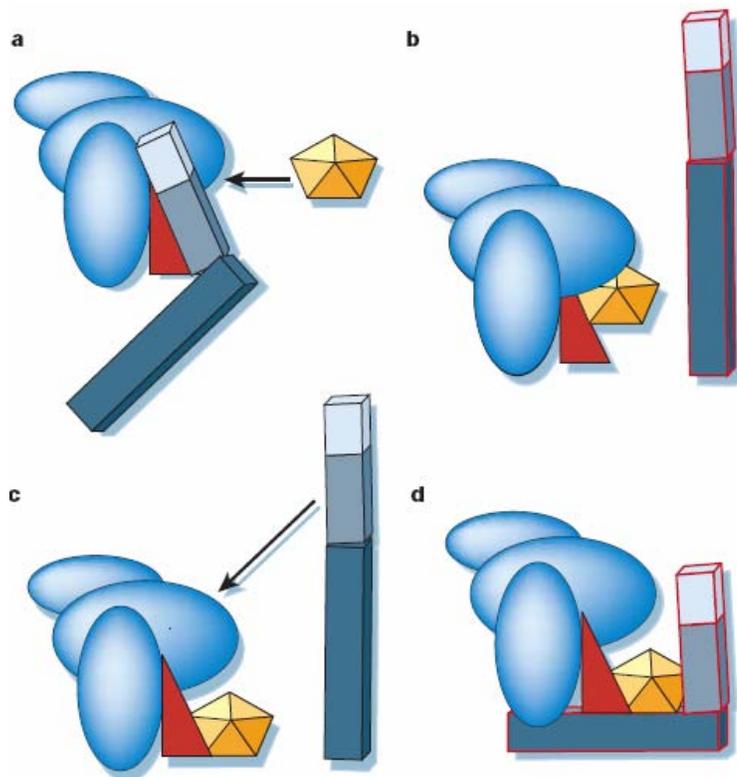


Figura 2. Teoria do Guardião para uma proteína R

a) Um complexo protéico celular (azul), que inclui a molécula guardiã (vermelho) e uma proteína R (3 tons de cinza) para a molécula elicitora do patógeno (laranja). **b)** Ligação do elicitor com sua molécula-alvo, que resulta em desassociação e ativação da proteína R, com conseqüente resistência a doença. **c)** Em outros casos, a proteína R pode não estar incluída no complexo protéico até a ligação com o elicitor **d)** O recrutamento ao complexo protéico/elicitor ativaria a proteína R e desencadearia defesa. Retirado de (Dangl e Jones, 2001).

Ao invés de desenvolver receptores que reconheçam todos e quaisquer efetores possíveis, as plantas hospedeiras evoluíram mecanismos para monitorar alvos em comum dos hospedeiros. Vigiando possíveis modificações em seu interior, assim como a presença de moléculas estranhas, as proteínas R detectam indiretamente a atividade de múltiplos efetores (Van der Biezen e Jones, 1998).

Genes *R* estão descritos localizados em um complexo loci cromossômico, e estão localizados em clusters, o que foi proposto para servir como repositório de diversidade genética para geração de novos genes *R* com novas especificidades, aumentando assim o espectro de moléculas patogênicas reconhecidas. Do outro lado, os patógenos produzem diferentes moléculas elicitoras, a fim de camuflá-las das defesas dos hospedeiros. Todas as

espécies testadas dentro da classe dos oomicetos secretam mais de uma proteína elicitora, de aproximadamente 10 kDa, chamadas elicinas e que induzem respostas de hipersensibilidade e resistência em plantas (Yu, 1995).

Apesar do constante estudo sobre elicitores e sua relação na interação patógeno-hospedeiro, pouco se foi encontrado experimentalmente com relação ao modo de atuação destas moléculas no interior da planta. Por outro lado, eventos iniciais desencadeados após o reconhecimento de elicitores por células de plantas, já estão caracterizados. Entre esses eventos, pode-se incluir fosforilação e/ou ativação de proteínas da membrana plasmática (alterando o fluxo de entrada de íons na célula), ativação de proteínas kinase, *burst* oxidativo, mobilização ou geração de moléculas sinais (como cálcio livre - Ca^{2+} , óxido nítrico - NO e espécies reativas de oxigênio - ROIs). Estas mudanças atuam na regulação de inúmeros processos, interconectando processos que amplificam e especificam a resposta fisiológica da planta, através de alterações metabólicas e transcricionais (Garcia-Brugger, 2006).

O aumento do influxo de cálcio na célula, causado por alterações na membrana celular após contato com elicitores, assim como o aumento do nível de íons cálcio no interior celular, são necessários para estimulação do *burst* oxidativo, com geração de espécies reativas de oxigênio - EROs (Jabs *et al.*, 1997). EROs podem atuar diretamente como toxinas aos patógenos, como também estão envolvidas na sinalização tardia de reações de defesa, como síntese de fitoalexinas e ativação de genes de defesa (Scheel, 1998).

Alterações na biossíntese de fitormônios são um dos principais meios de modificação dos processos fisiológicos da planta hospedeira, levando a mudanças transcricionais apropriadas. Entre os hormônios utilizados, as plantas podem apresentar respostas de defesa contra patógenos dependentes de etileno (ET), ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA). Sinalização dependente de etileno é importante na resposta de plantas a patógenos, ferimentos mecânicos e ferimentos induzidos por herbivoria, já o ácido salicílico é crítico no estabelecimento de resistência local e sistêmica a bactérias, enquanto a sinalização dependente de JA é induzida em resposta a ferimentos mecânicos e predação por herbívoros (Thomma *et al.*, 2001).

Com os resultados obtidos até o momento, pode-se observar que a interação entre um patógeno e seu hospedeiro a nível molecular é extremamente complexa, e que as reações induzidas por essa interação não é linear. Ao contrário, as reações que se seguem ao reconhecimento de um invasor são amplificadas por uma complexa rede com muitos braços, cada um controlado por uma combinação de mensageiros secundários que podem incluir Ca^{2+} , AOS, NO, alterações no pH citosólico e no potencial da membrana celular, cGMP, cADPR, AS, JA, ET e provavelmente produtos do metabolismo primário (Garcia-Brugger, 2006).

No final, os caminhos de transdução de sinais induzidos por elicitores podem culminar em espessamento da parede celular, produção de metabólitos microbianos (como fitoalexinas), de proteínas relacionadas à patogenicidade (PR) e de enzimas de proteção ao stress oxidativo; lignificação das paredes celulares; e resposta de hipersensitividade (HR) (Scheel, 1998).

HR constitui a resposta local primária de plantas e está geralmente associada com a resistência a doenças. Acontece, geralmente, como uma rápida necrose localizada, gerada por uma morte celular programada no local de infecção a fim de limitar a invasão do patógeno (Staskawicz, 1995; Lorrain *et al.*, 2003). Estas respostas de defesa podem levar a uma resistência sistêmica adquirida (Tyler *et al.*) duradoura, em toda a planta, dependente de AS e efetiva contra ampla gama de patógenos (Galiana *et al.*, 1997).

Dentro do amplo universo de proteínas elicitoras, foram descritas proteínas indutoras de necrose ou fatores de necrose com alto grau de similaridade na seqüência de aminoácidos. Esta semelhança sugeriu a existência de uma família de proteínas indutoras de necrose, presente em diversos organismos filogeneticamente distantes como bactérias, fungos e oomicetos. A primeira proteína descrita dessa ampla família de elicitores é NEP1 (Necrosis and Ethylen Inducing Protein 1), do ascomiceto *Fusarium oxysporum* (Bailey, 1995), e por este motivo a família passou a se chamar NLP (NEP1 Like Protein). A família das NLPs possui o domínio conservado NPP1, descrito em primeiro lugar em *Phytophthora parasitica* (Fellbrich *et al.*, 2002).

Proteínas da família NLPs foram descritas em espécies diversas, como *Bacillus* (Takami e Horikoshi, 2000), *Erwinia* (Bell *et al.*, 2004), *Verticillium* (Wang *et al.*, 2004), *Pythium* (Veit *et al.*, 2001), and *Phytophthora* (Fellbrich *et al.*, 2002; Qutob *et al.*, 2002).

Apesar da diversa distribuição filogenética, NLPs possuem grande similaridade de seqüência e a muitos membros da família possuem habilidade de induzir morte celular em mais de 20 espécies de dicotiledôneas (Pemberton e Salmond, 2004; Kamoun, 2006).

NLPs desencadeiam uma resposta de defesa em plantas e, subsequentemente, morte celular, caracterizada por uma necrose localizada no local da infecção. NLPs são proteínas relativamente pequenas (~25kDa) que exibem alto grau de similaridade de seqüência, incluindo um par de cisteínas que possivelmente formam uma ponte dissulfeto. Estudos demonstram que NLPs ativam respostas associadas a defesa em plantas, como a síntese de fitoalexinas e etileno, acúmulo de transcritos relacionados com a defesa, formação de lesões necróticas e morte celular (Veit *et al.*, 2001; Fellbrich *et al.*, 2002).

Uma análise realizada por Qutob e colaboradores, 2006, sobre os genes da planta hospedeira induzidos com a infecção por NLP, indica a expressão de proteínas relacionadas à resistência a doenças e a patógenos, e receptores de proteína kinase, além de genes relacionados à produção de hormônios vegetais como ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno. Estes hormônios são conhecidos por participarem da sinalização de vários processos de defesa em plantas (Pieterse e Van Loon, 2004).

Em *Moniliophthora perniciosa* foram detectados três genes que codificam para proteínas com significativa similaridade às proteínas da família de NLPs, todos localizados num mesmo cromossomo do genoma (Garcia *et al.*, 2007). Estes genes mostraram similaridade significativa à proteína NEP1 (Bailey, 1995).

Dois genes de *Moniliophthora perniciosa* da família NLPs (denominados MpNEP1 e MpNEP2), foram clonados e seus produtos protéicos expressos em *E. coli* e purificados. A infiltração de folhas de cacaueteiro e de tabaco com estas proteínas gerou uma reação de necrose localizada e indução da produção de etileno (Garcia *et al.*, 2007).

Cerato-platanina

Recentemente foi descoberta uma proteína denominada cerato-platanina, pertencente a uma nova família de proteínas, com alguns de seus membros descritos com função de elicitores de necrose (Pazzagli *et al.*, 1999).

Cerato-platanina é uma proteína de 12,4 kDa, com 40% de resíduos hidrofóbicos e quatro cisteínas, que formam duas pontes dissulfeto. Esta proteína foi descoberta no extrato total do fungo ascomiceto *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *platani*, causador do Mal-do-facão em cacaueiros. Cerato-platanina induz a produção de fitoalexina e a morte celular em plantas hospedeiras e não hospedeiras do fungo, agindo como um provável elicitor de respostas de defesa em plantas, além de localizar-se nas paredes celulares do fungo (Pazzagli *et al.*, 1999; Boddi *et al.*, 2004).

A recentemente descrita família Cerato-Platanina (CP), cujo membro fundador é a proteína cerato-platanina, possui até agora 40 entradas no InterPro (IPR010829). Esta família é caracterizada por proteínas secretadas de baixo peso molecular, com alta similaridade de seqüências de aminoácidos e a presença de quatro cisteínas conservadas que podem formar duas pontes dissulfeto. Apesar da homologia de seqüências na família e de todas as proteínas serem produzidas por fungos, a função molecular das proteínas parece não possuir muita similaridade. Alguns membros são patógenos de animais, patógenos de plantas ou fungos saprotróficos não patogênicos.

Como exemplo, são membros dessa família o alérgeno Asp f13 de *Aspergillus fumigatus*, causador de reações alérgicas em humanos (Rementeria *et al.*, 2005), o elicitor de respostas de defesa em plantas Epl1 de *Hypocrea (Trichoderma) atroviridis* (Seidl *et al.*, 2006), a proteína Snodprot1 de *Phaeosphaeria nodorum*, que é expressa durante infecções de folhas de trigo (Hall, 1999), a proteína Sp1 de *Leptosphaeria maculans* que causa uma doença em canola (Wilson, 2002) e o antígeno CS de *Coccidioides immitis*, causador de coccidiose em humanos (Pan e Cole, 1995). Devido à grande similaridade de seqüências e à presença do mesmo domínio protéico, consideramos a família de proteínas Snodprot inserida dentro da família CP (Jeong *et al.*, 2007).

JUSTIFICATIVA e OBJETIVOS

Os mecanismos de comunicação celulares têm-se diversificado como resultado da interação patógeno-hospedeiro. Um dos mecanismos propostos é que proteínas elicitoras produzidas pelo patógeno são reconhecidas pela planta. Uma vez acontecida esta interação, desencadeia-se uma cascata de sinais que pode levar a respostas de defesa ou susceptibilidade. Uma possível resposta de defesa da planta é a indução de necrose localizada a fim de isolar o patógeno no sítio de invasão. A identificação e caracterização de proteínas elicitoras permitiriam entender mais a fundo a natureza dessas interações planta-patógeno.

A caracterização de proteínas causadoras de necrose, em uma doença como a Vassoura-de-Bruxa em que a necrose de tecidos é um dos principais sintomas, é de extrema importância, uma vez que este mecanismo pode ser crucial para o desenvolvimento da doença.

Nosso grupo e outros pesquisadores fizeram a caracterização de proteínas indutoras de necrose produzidas por patógenos que atacam os cacaueiros, entre estas as proteínas MpNeps em *Moniliophthora perniciosa* (Garcia *et al.*, 2007), NPP1 em *Phytophthora parasítica* (Bailey, 1995) e da cerato-platanina em *Ceratocystis fimbriata* (Pazzagli *et al.*, 1999). Recentemente, encontrou-se nas seqüências genômicas de *M. perniciosa* uma proteína homóloga à cerato-platanina, da recém descrita família de mesmo nome com função elicitora e causadora de necrose em plantas. Esta nova classe de proteínas de *M. perniciosa*, denominadas MpCPs, é o objeto do presente estudo.

Clonagem, expressão e purificação de MpCP1, confirmação de sua expressão *in situ* por *M. perniciosa* e a confirmação de uma possível função elicitora dessa proteína, são os principais objetivos do estudo.

A caracterização funcional e estrutural, assim como comparações entre as proteínas da família MpCPs com as MpNeps, com possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos, serão de grande valor para a compreensão do modo de atuação das proteínas no desenvolvimento da doença.

MATERIAIS e MÉTODOS

1. Materiais biológicos e condições de crescimento

A cepa usada nesse trabalho deriva de uma cultura originária de um único esporo de *Moniliophthora perniciosa*, do isolado CP-02, selecionado para o projeto genoma (Rincones *et al.*, 2003). A fim de obter micélio saprotrófico, esporos foram inoculados diretamente em um meio contendo glicose (1%), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1%), KCl (0.2%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2%), extrato de levedura (0.5%), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.05%) e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.001%), e mantido a 28°C. O micélio do tipo biotrófico foi obtido através da germinação de esporos em um meio especial pobre em nutrientes (Meinhardt *et al.*, 2006), com glicerol como única fonte de carbono, a fim de manter o fungo crescendo em hifas mononucleadas.

As plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) utilizadas pertencem à variedade SR1 – petit havana e foram crescidas em uma sala mantida a 25°C com controle de luminosidade (18hs claro e 6hs escuro), no laboratório do professor Michel Vincentz, CBMEG, Unicamp. As plântulas de cacau (*Theobroma cacao*) utilizadas são provenientes da fazenda Almirante Cacau (Almirante Cacau Agrícola, CP 55, Itajuípe, BA, Brasil). As plantas de cana-de-açúcar utilizadas são provenientes da Alelix.

2. Extração do material genético de *M. perniciosa*

O DNA genômico foi extraído dos micélios biotrófico e saprotrófico, de acordo com (Specht *et al.*, 1982). O RNA total foi obtido de ambos os micélios através da utilização de Trizol (Ausubel *et al.*, 1998). O RNA total de tecidos de cacauzeiros infectados e controle foi extraído de acordo com protocolo recentemente descrito por nosso grupo (Gesteira Ada *et al.*, 2003). As amostras de RNA foram então tratadas com DNase RNase-free como descrito pelo fabricante (Invitrogen, CA). O material genético extraído foi quantificado por espectrometria (A260/A280).

3. Amplificação do gene *MpCPI*

A ORF do gene *MpCPI*, sem a sequência do peptídeo sinal, encontrada com o programa SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004), foi amplificada do DNA genômico de *M.*

perniciosa utilizando-se os *primers* MpCP-F (5'CGGGATCCGCTGTGAAACTC3') e MpCP-R (5'GGAATTCTTACGACTGGCGTTTCG3'). Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000). Os *primers* foram desenhados para gerar produtos com extremidades coesivas (sublinhado), para facilitar a posterior clonagem em vetores de expressão.

Os ciclos da reação utilizados para amplificação foram: 5 min. a 95°C, seguido por 35 ciclos de 50 seg. a 94°C, 50 seg. a 53°C e 60 seg. a 72°C, finalizando com 3 min. a 72°C. As reações de PCR foram realizadas com uma unidade de Taq polimerase no tampão providenciado pelo fabricante (Invitrogen, CA), contendo 0,25 mM de dNTPs e 2mM de MgCl₂. O tamanho da banda amplificada foi verificado por eletroforese em gel.

4. Análise de expressão *ex planta* de MpCP1

A fim de determinar a expressão relativa de MpCP1 *in vitro*, aproximadamente 10 µg de RNA total dos micélios biotrófico e saprotrófico foram utilizados para a confecção de cDNA. Ambos os micélios foram crescidos no mesmo meio de cultura (Meinhardt *et al.*, 2006). O material genético foi reversamente transcrito usando um kit de subtração de cDNA selecionado por PCR, seguindo as instruções do fabricante (Clontech). Os *primers* utilizados para amplificação de *MpCPI* foram MpCP-F e MpCP-R. Foram então preparadas reações em volume final de 100 µL com os cDNAs, e divididas em sete alíquotas de 15 µL para realização de PCR (com mesmo ciclo e *primers* descritos no tópico “amplificação do gene *MpCPI*”). Uma alíquota de 15 µL foi retirada a cada cinco ciclos da reação, a partir do 15º ciclo.

A calibração da quantidade de cDNA utilizada no experimento foi realizada com a utilização de um fragmento de 216 pb do gene da actina de *M. perniciosa*, amplificado com os *primers* MpAc-F (5'CCACAATGGAGGACGAAGTCG3') e MpAc-R (5'CCCGACATAGGAGTCCTTCTG3'). Para isso assumimos que a expressão do gene de actina pelo fungo é igual tanto no micélio biotrófico quanto saprotrófico.

As análises foram realizadas através de Dot-blot das reações de PCR em uma membrana de náilon (Hybond N+, Amersham Biosciences NJ) e posterior hibridação com as sondas correspondentes, obtidas com os respectivos *primers* (descritos acima) desenhados para o gene *MpCPI*. As membranas foram pré-hibridizadas durante 6 horas a

43°C e então hibridizadas *overnight* a 43°C em um tampão contendo 50% Formamida; 0,12 M Na₂HPO₄, pH 7,2; 0,25 M NaCl; 7% (p/v) SDS; 1 mM EDTA; 10% PEG 8000 e 0,2 mg de DNA de esperma de salmão. A sonda correspondente foi obtida pela marcação com *primers* aleatórios na presença de [32P]γATP (Feinberg e Vogelstein, 1983). As membranas foram então lavadas de acordo com instruções do fabricante e expostas a um filme de revelação (IBF-Medix). Em todas as análises, o produto de amplificação do PCR foi analisado por eletroforese em gel para confirmar o tamanho da banda.

5. Clonagem de MpCPI

A seqüência do gene *MpCPI* amplificada sem o peptídeo sinal, foi digerida com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* e clonada no plasmídeo pET-28a(+) (Novagen, San Diego CA), previamente digerido com as mesmas enzimas, resultando no plasmídeo pMpCPI. Os produtos das reações de PCR, assim como os plasmídios utilizados na clonagem, foram purificados utilizando-se o kit da Qiagen, de acordo com instruções do fabricante.

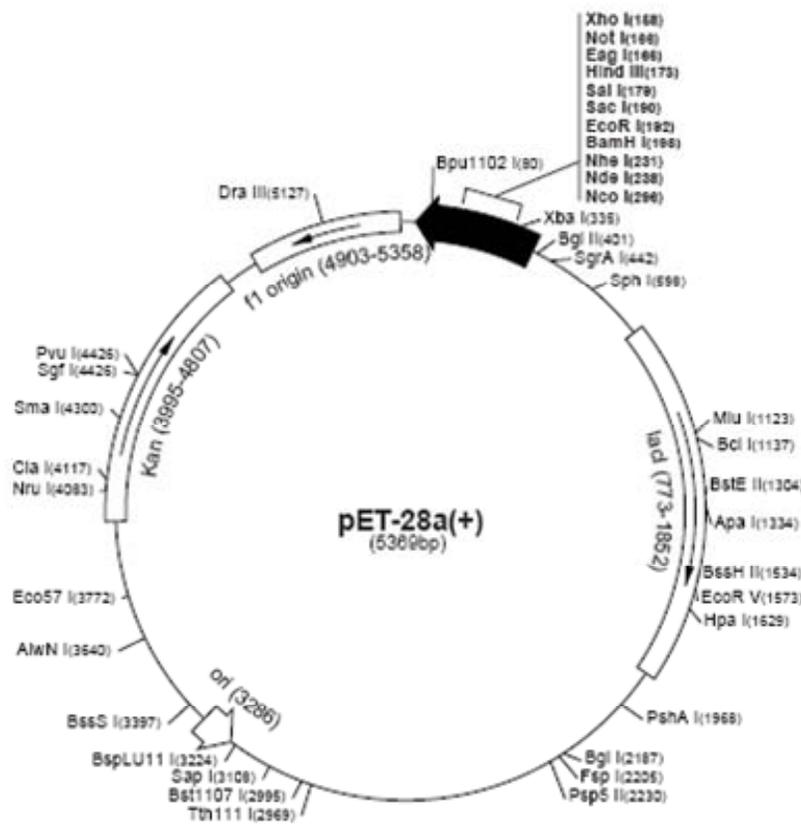


Figura 3. Mapa do plasmídeo pET-28a(+), retirado de www.novagen.com

A cepa DH10b de *E.coli* foi usada na clonagem e durante a procura por colônias com plasmídios contendo o gene MpCP1. O sucesso da clonagem foi conferido por gel de eletroforese, comparando-se os possíveis clones com o plasmídio sem inserto. Os clones positivos foram confirmados por seqüenciamento. Todas as manipulações de DNA, incluindo digestão com enzimas de restrição, eletroforese em gel de agarose, purificação de fragmentos de DNA e ligação com T4 DNA ligase, foram realizadas de acordo com Sambrook (Sambrook, 2002).

6. Expressão de MpCP1

Células da linhagem de expressão de *E. coli* BL21(DE3) pT-Trx com o plasmídio pMpCP1 foram crescidas em meio LB (Luria Bertani) com os antibióticos kanamicina (15mg/mL) e cloranfenicol (34mg/mL) a 30°C e 250 rpm. A expressão foi induzida com a adição de 1 mM de isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) durante três horas a 30°C e 250 rpm. A indução de expressão foi realizada quando as bactérias encontravam-se em meio à fase *log* de crescimento ($OD_{600} = 0,8$). Devido à utilização do vetor pET-28a(+), a proteína MpCP1 foi expressa fusionada a uma cauda com seis histidinas (His-tag) na porção amino-terminal, a fim de facilitar a purificação da proteína.

7. Purificação de MpCP1

As células foram coletadas por centrifugação a 6000 g e 4°C durante 10 minutos e ressuspendidas em 10 mL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, contendo 150 mM NaCl e 5 mM imidazol). As células foram então sonicadas e permaneceram sob agitação a 4°C por 30 minutos com 0,2 g de Sulfato de estreptomicina. Os restos celulares foram removidos por centrifugação durante 40 minutos a 18000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi então carregado em uma coluna de afinidade a metais HiTrap (Amersham Biosciences, NJ) de 5 mL, previamente carregada com íons Ni^{2+} de acordo com instruções do fabricante, a um fluxo constante de 3,5 mL/min. Após lavagem com o mesmo tampão, foi realizado um gradiente de imidazol 30-200 mM, até a eluição da proteína em estudo.

A análise da pureza da proteína expressa, assim como de seu tamanho, foi realizada por gel de eletroforese (SDS-PAGE) 12,5% (Laemmli, 1970) e a especificidade foi confirmada por Western Blot utilizando-se anticorpo contra His-tag.

A proteína MpNEP2 foi expressa e purificada como descrito anteriormente (Garcia *et al.*, 2007). As proteínas purificadas MpCP1 e MpNEP2 foram concentradas a aproximadamente 0,5 mg/mL através de diálise reversa contra PEG 8000 e dializadas contra o tampão de aplicação (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, contendo 50 mM NaCl).

8. Produção de anticorpo contra MpCP1

Para a obtenção de soro policlonal específico para a proteína recombinante MpCP1, foram imunizados coelhos machos da Nova Zelândia, utilizando doses crescentes e subcutâneas de antígeno. A primeira imunização foi administrada com Adjuvante de Freund completo e as outras duas com adjuvante de Freund incompleto. Realizada a sangria de prova, deu-se um *booster*, procedendo-se posteriormente à sangria branca via punção cardíaca 7 a 10 dias após a última imunização. O sangue foi centrifugado, o soro foi separado e inativado (inativação das proteínas do sistema complemento) em banho de 56°C por 1 hora, sendo depois estocado no freezer à -20°C.

A quantificação do soro policlonal foi determinada através do teste de ELISA indireto (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay). O ensaio foi realizado utilizando concentrações constantes de 2mg/mL de antígeno na sensibilização das placas contra diferentes diluições do soro policlonal.

Este experimento foi realizado no laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Imunologia e Microbiologia, Instituto de Biologia, Unicamp, sob coordenação da professora Dagmar Stach-Machado.

9. Testes de atividade de necrose

Nos testes em folhas de tabaco, utilizou-se uma seringa hipodérmica de 1 mL e 30-50 µL de proteína a 0,5 mg/mL em tampão de inoculação (10 mM Tris-HCl em pH 8,0 contendo 50 mM NaCl) foram injetados na parte inferior das folhas de plantas com cinco semanas de idade, próximo à nervura central, como descrito anteriormente (Garcia *et al.*, 2007). Tentou-se inocular as proteínas em folhas de cacauero com o mesmo método descrito em tabaco, mas devido à grossura das folhas, não foi possível. Por esse motivo, folhas de mudas de cacauero com quatro meses de idade foram colocadas em contato com uma solução de proteína (0,3 mg/mL em tampão de inoculação), através de seus pecíolos

recém cortados, dentro de um tubo *falcon* vedado com Parafilm “M” (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, EUA) para evitar desidratação. A fim de testar o efeito de MpCP1 em monocotiledôneas, a proteína (0,5 mg/mL em tampão de inoculação) foi inoculada próximo à nervura central de folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp). O modo de inoculação foi semelhante ao realizado em folhas de tabaco. Em todos os experimentos de inoculação, utilizou-se como controle negativo uma amostra contendo apenas o tampão de inoculação e outra amostra com água destilada, e como controle positivo a proteína MpNEP2, na mesma concentração de MpCP1.

10. Análises filogenéticas

Seqüências com similaridade significativa (e-value 1e-4) a MpCP1 foram encontradas no banco de dados do NCBI com o auxílio de BlastP e tBlastX (Altschul *et al.*, 1990; McGinnis e Madden, 2004). Seqüências adicionais foram encontradas nas seqüências genômicas dos basidiomicetos *Laccaria bicolor* (<http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.info.html>), *Phanerochaete chrysosporium* (<http://genome.jgi-psf.org/whiterot1/whiterot1.info.html>) e *Coprinus cinereus* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/coprinus_cinereus/Info.html), que não estão presentes no banco do NCBI. A busca dentro destes genomas foi realizada localmente, com auxílio das ferramentas tBlastN e tBlastX. A região do peptídeo sinal de todas as seqüências utilizadas foi predita com o programa Signal P3. Seqüências adicionais de possíveis proteínas da família CP foram procuradas dentro do genoma de *M. perniciosa* utilizando-se BlastX e tBlastX, e a predição gênica foi realizada com auxílio do programa Genezilla_v6x (Majoros *et al.*, 2004).

As seqüências de aminoácidos foram alinhadas usando-se o programa ClustalW com as opções básicas (Higgins *et al.*, 1996), com exceção da matriz de substituição PAM. A região correspondente ao peptídeo sinal (posição 1 a 33), assim como regiões com alinhamento fraco (posições 88, 100 a 109 e 157 a 163), foram removidas, resultando em um alinhamento de 110 aminoácidos (Fig. 6A). A numeração utilizada corresponde à primeira linha na figura 6A.

A seqüência de nucleotídeos correspondente ao alinhamento de 110 aa foi usada para a construção de uma árvore filogenética. O modelo de substituição de nucleotídeos

GTR foi selecionado para a construção da árvore usando-se o programa MrAIC.pl (Nylander, 2004). A árvore filogenética foi construída com o método de máxima semelhança usando-se o modelo de evolução e a distribuição gama com o parâmetro alfa fixado em dois, com o programa PhyML (Guindon e Gascuel, 2003). A robustez da árvore inferida foi testada por análises de *bootstrap* com 1000 tentativas (Felsenstein, 1985).

11. Análises estruturais

Espalhamento Dinâmico de Luz – Dynamic light scattering (DLS)

As medições de DLS foram conduzidas sob temperatura controlada no aparelho DynaPro DLS (Protein Solutions, CA). Os dados foram analisados usando o programa DYNAMICS, versão 6, da Protein Solutions. Cada medição consistiu em pelo menos 500 leituras independentes, sendo cada leitura de 10 seg. de duração. Uma alíquota de 100 μ L da proteína MpCP1 em 10 mM Tris-HCl, pH 8 foi centrifugada a 15.000 g por 1 h a 4°C, e então uma alíquota de 60 μ L do sobrenadante foi carregada em uma cubeta de quartzo. Todas as medições ocorreram a 25°C.

Espectroscopia de dicroísmo circular – Circular dichroism spectroscopy

As medições de dicroísmo circular foram realizadas em um aparelho espectropolarímetro JASCO J-810, equipado com um controlador de temperatura tipo Peltier e um termostato. Espectros de luz ultravioleta longa foram lidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de largura, em uma concentração de proteína de 0,18 mg/mL. A proteína estava em tampão 10 mM Tris-HCl a pH 8,0. Cinco leituras consecutivas foram acumuladas e o espectro médio utilizado nas análises. Os dados foram corrigidos quanto a contribuição do tampão e as elipses observadas foram convertidas em elipses residuais médias $[\theta]$ baseando-se na massa molecular média por resíduos de 107,5 Da. Os experimentos de denaturação térmica foram realizados aumentando-se a temperatura de 20 a 95 °C a 1 °C por minuto, permitindo um equilíbrio da temperatura de cinco minutos, antes da medição de cada espectro. A T_m representa a temperatura no ponto médio da transição de denaturação.

RESULTADOS

Análises genômicas

A seqüência do gene que codifica a proteína indutora de necrose cerato-platanina de *Ceratocystis fimbriata* (GI:121624696) foi utilizada para a investigar a presença de homólogos em *M. perniciosa*. A busca mostrou a presença de pelo menos cinco cópias diferentes com similaridade significativa à família CP (Fig. 4A), que foram denominadas *Moniliophthora perniciosa* Cerato-Platanina (MpCP). Podemos observar a presença de uma região de peptídeo sinal (retângulos no início das seqüências), assim como quatro cisteínas conservadas (triângulos pretos) em todas as cópias. Para duas dessas seqüências, MpCP1 e MpCP2, foram encontrados ESTs correspondentes nas bibliotecas de cDNA, indicando que são genes expressos pelo fungo.

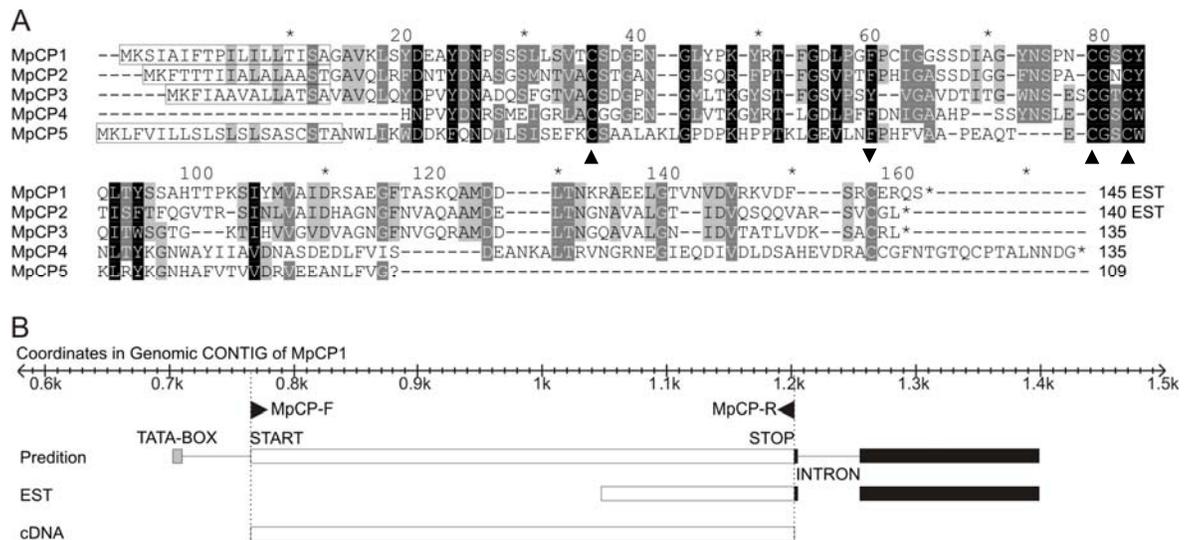


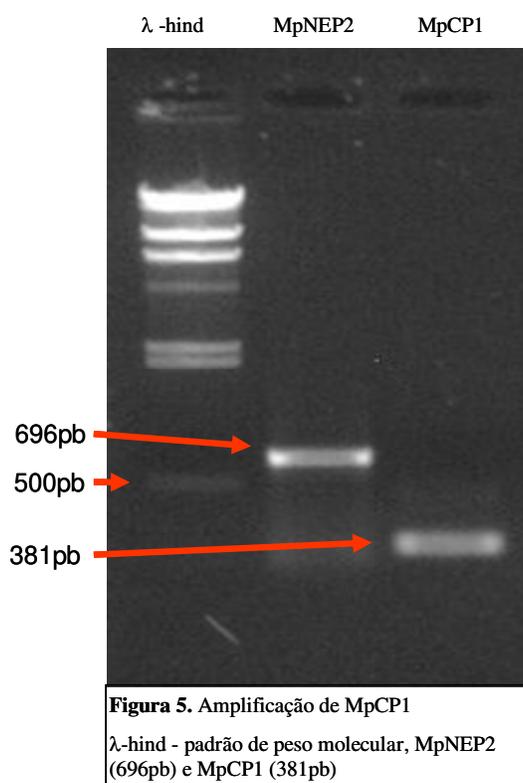
Figura 4. Estudos das seqüências de MpCPs

A) Alinhamento das seqüências protéicas de *M. perniciosa* com similaridade significativa aos membros da família CP. As cores do *background* indicam o nível de conservação de cada aminoácido (preto: 100% conservado, cinza escuro: mais que 80% conservado, cinza claro: mais que 60% conservado). Retângulos no início da seqüência indicam a região do peptídeo sinal. Setas pretas indicam as cisteínas conservadas. EST após cada seqüência indica a existência de uma seqüência correspondente de EST em nosso banco de dados. B) Alinhamento das seqüências do contig genômico de MpCP1; predição (Genezilla) do gene MpCP1, indicando a seqüência do TATA Box (cinza), os codons de início (start) e de terminação (stop), a região 3' UTR (preto) e a presença de um íntron; a seqüência do EST de MpCP1 e a seqüência expressa de MpCP1 (branco). Os locais de alinhamento dos *primers* estão indicados com triângulos pretos.

Comparações entre as seqüências genômicas e de ESTs correspondentes indicam a presença de íntrons nesses dois genes. Curiosamente, em MpCP1, o íntron foi encontrado na região não transcrita (3'UTR) (Fig. 4B). As seqüências de MpCP1, MpCP2 e MpCP3 estão completas em nosso banco de dados.

MpCP1 tem seu seqüenciamento completo em nossas seqüências genômicas e de ESTs, e é a seqüência que apresenta maior similaridade à proteína cerato-platanina. Por essas razões esta seqüência foi escolhida para futuras análises genômicas e de expressão. Foram desenhados *primers* a fim de tentar o isolamento desse gene, agora denominado MpCP1, do DNA genômico total de *M. pernicioso*.

Após a reação de amplificação por PCR, observamos no gel de eletroforese (Fig. 5) uma banda com tamanho ao redor de 381 pares de base (pb), tamanho este esperado para a seqüência de MpCp1 sem a seqüência do peptídeo sinal. Como efeito de comparação, podemos observar uma banda de aproximadamente 700 pb representando a proteína MpNEP2.



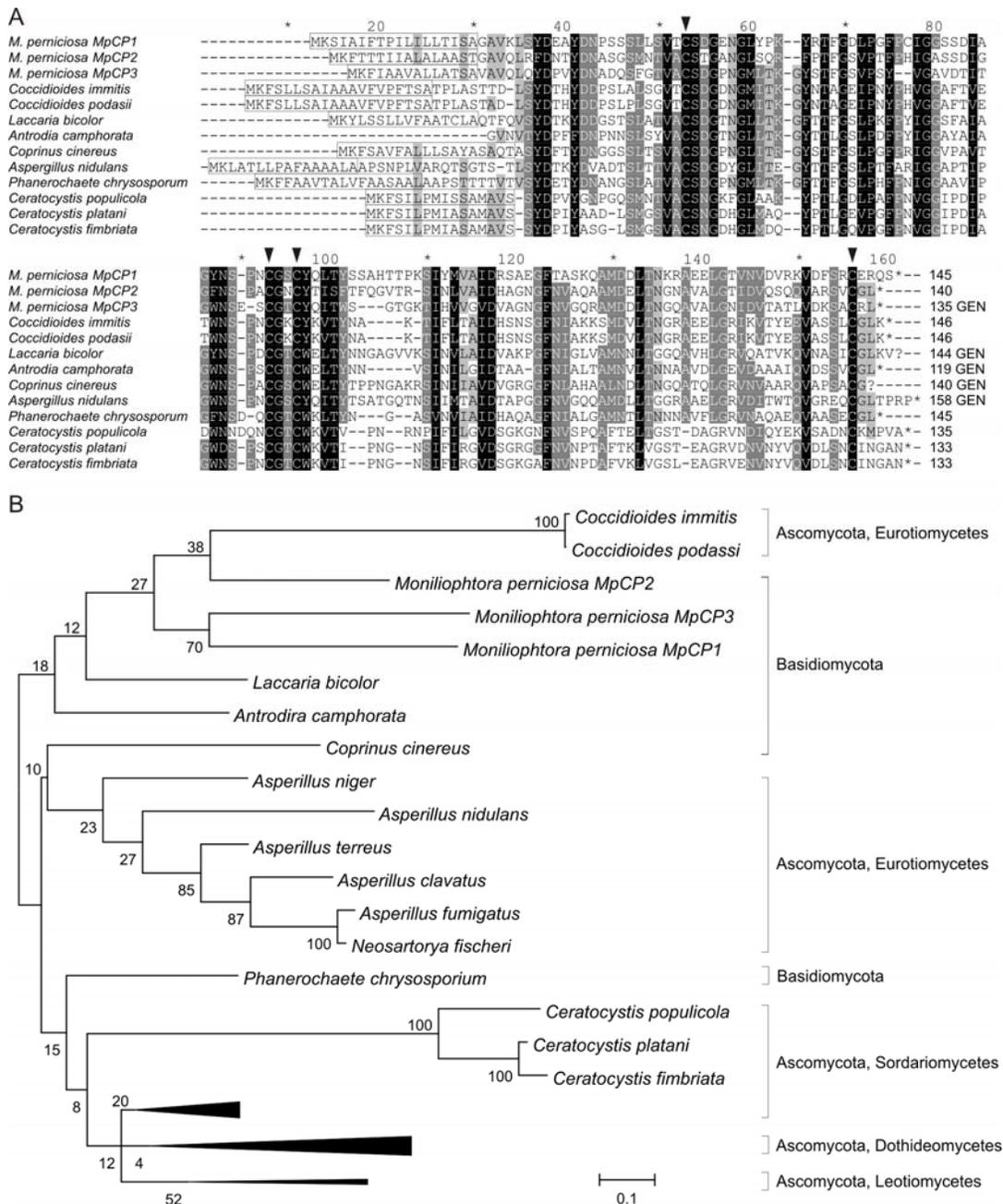
Comparação de seqüências e análises filogenéticas de MpCP1

Para realizar uma comparação entre as seqüências da família Cerato-platanina (CP) e MpCP1, foi realizado um alinhamento de proteínas de diferentes espécies de fungos pertencentes à família (Fig. 6A). As espécies utilizadas no alinhamento estão listadas na Tabela 2. Esse alinhamento mostra que os membros de CP possuem alta similaridade de seqüências (representadas pelo fundo preto e cinza escuro). Proteínas CP possuem um peptídeo sinal (retângulos sólidos) indicando que são secretadas. Todas as proteínas publicadas dessa família possuem quatro cisteínas conservadas em suas seqüências (setas pretas).

Foram feitas buscas nos genomas de fungos basidiomicetos depositados em bancos públicos ou disponíveis na Internet. Foram achadas proteínas dessa família em *Antrodia camphorata*, *Laccaria bicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Coprinus cinereus*, nenhuma espécie patogênica de animais ou vegetais. Em nenhum caso existe algum dado comprovando a atividade da proteína, são apenas dados genômicos ou de ESTs. Por outro lado, não foi encontrada proteína semelhante nos genomas de *Cryptococcus neoformans* e *Ustilago Maydis*.

Análises filogenéticas das proteínas CP (Fig. 6B) não refletem a relação filogenética entre as espécies de fungo utilizadas na análise, não sendo possível uma discriminação entre as diferentes classes.

Figura 6. Análises da família CP



A) Alinhamento das seqüências de proteínas da família CP usadas nas análises filogenéticas. As cores do *background*, retângulos e setas pretas possuem o mesmo significado da figura 4A. GEN após cada seqüência significa que essa seqüência foi obtida apenas de seqüenciamento genômico. B) Árvore filogenética de proteínas de membros da família CP. A raiz foi colocada entre os Ascomicetos e Basidiomicetos (com exceção das seqüências *M. perniciosa*). Os números de *bootstraps* estão indicados sobre os braços da árvore. Na parte baixa da árvore, seqüências de algumas espécies de Ascomicetos apresentando baixos *bootstraps* foram agrupados de acordo com a ordenação taxonômica e representadas por triângulos pretos.

Tabela 2: membros da família ceratoplatanina

Organismo	Número de Acesso	Taxonomia	e-value
<i>Moniliophthora perniciosa</i> MpCP1		Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes	-
<i>Moniliophthora perniciosa</i> MpCP2			-
<i>Moniliophthora perniciosa</i> MpCP3			-
<i>Antrodia camphorata</i>	GI:47156029		3e-16
<i>Coprinus cinereus</i>			Local BLAST
<i>Laccaria bicolor</i>			Local BLAST
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>			Local BLAST
<i>Aspergillus nidulans</i>	GI:67540205	Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes	3e-28
<i>Aspergillus terreus</i>	GI:115384119		3e-28
<i>Coccidioides immitis</i>	GI:119193607		9e-27
<i>Aspergillus fumigatus</i>	GI:71001827		1e-26
<i>Neosartorya fischeri</i>	GI:119481376		6e-26
<i>Coccidioides posadasii</i>	GI:25528648		6e-26
<i>Aspergillus niger</i>	GI:145231638		1e-25
<i>Aspergillus clavatus</i>	GI:121715869		7e-16
<i>Gibberella zeae</i>	GI:46139380		3e-23
<i>Chaetomiun globosum</i>	GI:116198414		1e-19
<i>Magnaporthee grisea</i>	GI:39940863	1e-15	
<i>Neurospora crassa</i>	GI:85091040	1e-14	
<i>Gibberella zeae</i>	GI:46137392	7e-12	
<i>Gibberella pulicaris</i>	GI:56181486	2e-10	
<i>Hypocrea virens</i>	GI:93009003	Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes	1e-14
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	GI:121624696		2e-13
<i>Hypocrea virens</i>	GI:73672052		6e-13
<i>Ceratocystis platani</i>	GI:121624715		2e-12
<i>Hypocrea atroviridis</i>	GI:92112037		4e-12
<i>Trichoderma viride</i>	GI:118402815		4e-12
<i>Ceratocystis populicola</i>	GI:121624693		3e-11
<i>Trichoderma atroviride</i>	GI:118402803		1e-04
<i>Cochliobolus lunatus</i>	GI:37003430		6e-27
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	GI:3329508		2e-20
<i>Leptosphaeria maculans</i>	GI:27085248	7e-19	
<i>Botrytis cinerea</i>	GI:5828302	Ascomycota; Pezizomycotina; Leotiomycetes	8e-16

Análise de expressão de MpCP1 *ex planta*

Para confirmar a expressão de MpCP1, foi realizado um experimento de Dot-blot semi-quantitativo (Fig. 7), usando cDNA dos meios biotrófico e saprotrófico como molde. Para assegurar uma quantificação mais equilibrada do molde para cada reação de PCR, cDNA de cada micélio foi usado para amplificar o gene da actina (MpActin) de *M. perniciosa*. As amostras dos diferentes ciclos de PCR foram transferidas para uma

membrana e hibridizadas com a sonda de actina (Fig. 7, painel superior). As concentrações de cDNA que produziram um perfil de expressão similar de actina em ambos os micélios foram consideradas equivalentes, assumindo que esse gene é similarmente expresso em ambos micélios biotrófico e saprotrófico. Com essa informação, nós observamos como resultado do experimento de Dot-blot, que MpCP1 é mais expressa no micélio biotrófico do que no saprotrófico (Fig. 7, painel inferior).

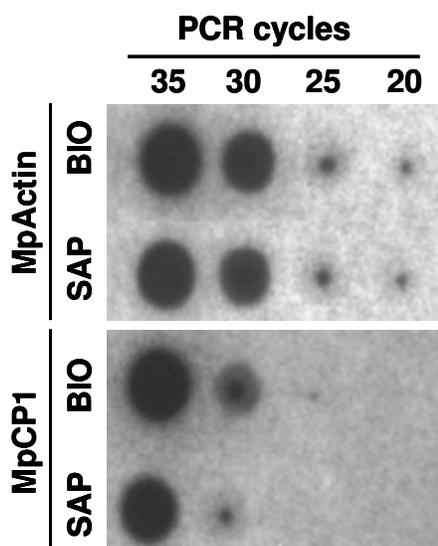
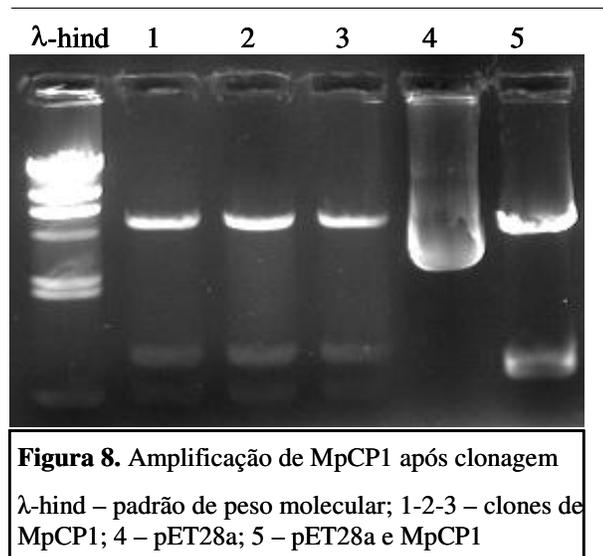


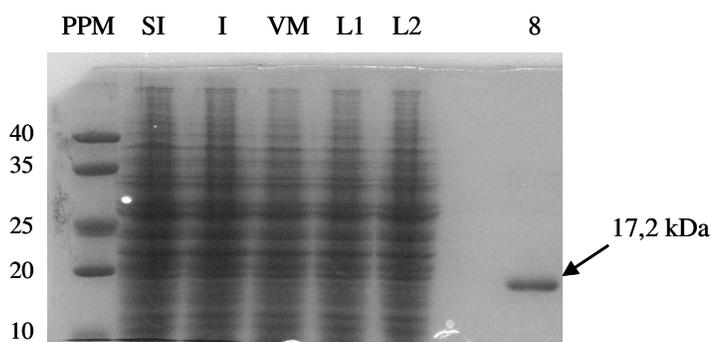
Figura 7. Análise de expressão *ex planta* de MpCP1. Acima: normalização do cDNA por expressão de actina. O RNA foi extraído dos micélios biotróficos (Bio) e saprotrófico (Sap) e convertido a cDNA. Alíquotas foram retiradas após específicos ciclos de PCR, como indicado (PCR cycles). Os produtos de amplificação com sinais equivalentes foram utilizados para a validação da expressão de MpCP1 (painel inferior).

Clonagem, expressão e purificação de MpCP1

O gene MpCP1 sem o peptídeo sinal foi amplificado, utilizando-se *primers* específicos, do DNA genômico de *M. perniciosa*. MpCP1 foi clonado (Fig. 8) e expresso em *E. coli* no vetor pET-28a(+) fusionado a uma cauda de histidina (His-tag). A proteína recombinante foi purificada usando uma coluna quelante a His-tag. A figura 9 mostra um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com o resultado da expressão e purificação de MpCP1.



Esta figura mostra três dos clones digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, a fim de liberar o possível inserto com o gene MpCP1 do vetor pET-28a(+). No pocinho n° 5 podemos observar duas bandas, uma representando o plasmídeo pET-28a(+) purificado, e outra o gene MpCP1 direto da reação de amplificação por PCR. Os três primeiros pocinhos mostram clones positivos, com o inserto liberado de tamanho esperado, comprovando o sucesso da clonagem.



Podemos observar no pocinho nº 8, o resultado da purificação de MpCP1 (união das frações 4 a 16 do processo de purificação), mostrando uma única banda de tamanho próximo à banda do marcador que indica 15 kDa. O tamanho esperado para a proteína MpCP1 sem o peptídeo sinal é de 13,56 kDa. Inserida no vetor no sítio de restrição *Bam*HI e fusionada a cauda de histidina o tamanho esperado é de 17,2 kDa, pois existe um acréscimo de 34 aminoácidos na proteína de fusão.

Testes de agregação

Para analisar a formação de oligômeros por MpCP1, foi realizada uma análise em gel de poliacrilamida, sob condições não-denaturantes (Fig. 10). Podemos observar que MpCP1 apresenta pelo menos três bandas, duas delas com tamanho superior ao esperado com a proteína sob forma monomérica (17,2kDa). Esses resultados sugerem que MpCP1 existe em forma de oligômeros em solução. A proteína MpNEP2 sem His-tag foi utilizada como controle. O mesmo experimento foi realizado e as proteínas foram transferidas para uma membrana Hy-bond N+ para análise de western blot (Fig. 11). O anticorpo utilizado foi anti-His-Tag-HRPP conjugado com peroxidase. A figura mostra bandas de peso semelhante à formação de oligômeros, confirmando a especificidade do experimento.

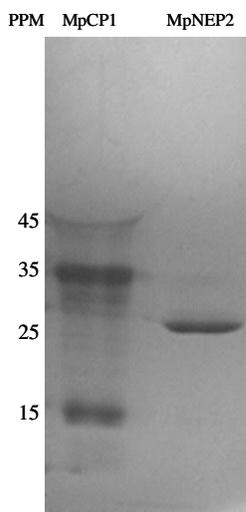


Figura 10. PAGE não denaturante PPM – padrão de peso molecular (kDa)

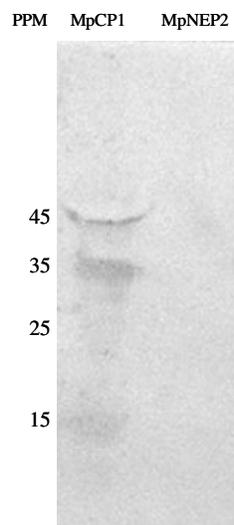


Figura 11. Western Blot – anti Histag PPM – padrão de peso molecular (kDa)

A fim de clarificar os resultados sobre a formação de oligômeros, foram realizados experimentos com uma técnica mais apurada, DLS. Com essa técnica obtivemos o raio de giro da molécula de proteína, e uma estimativa do seu peso molecular em solução. O raio de giro obtido para MpCP1 foi 3,3 nm, correspondente a uma proteína esférica de peso molecular 57 kDa. Como o peso molecular de MpCP1, quando monômero, é de 17,2 kDa, esse resultado de DLS sugere que a proteína se apresente como um oligômero em solução, provavelmente um trímero. Estudos preliminares, utilizando espalhamento de raio-X de baixo ângulo (SAXS), mostraram que MpCP1 é um dímero em solução.

Análises da atividade biológica de MpCP1

A proteína Cerato-platanina está descrita como sendo indutora de necrose quando inoculada em folhas de tabaco. Para verificar se MpCP1 também possui esta habilidade, 0,5 mg/mL de proteína foi inoculado em folhas de tabaco usando-se uma seringa hipodérmica. A figura 12 mostra uma folha 24 horas após a inoculação MpCP1, comprovando que foi capaz de induzir sintomas de necrose nas folhas de tabaco. Como controle negativo foi utilizado tampão de inoculação (10 mM Tris-HCL, pH 8,0 contendo 50 mM NaCl), que não ocasionou efeitos necrotróficos. Este experimento foi repetido várias vezes e sempre foram obtidos os mesmos resultados.

Uma vez que *M. pernicioso* é um patógeno de cacaueiros, e não de tabaco, o experimento foi repetido utilizando-se folhas de cacaueiro, mas com outra forma de inoculação, devido à espessura da folha, que impossibilita a inoculação com o uso de seringas. Desta forma, os pecíolos recém cortados de folhas de cacaueiro foram mergulhados em uma solução contendo MpCP1, e os resultados estão na figura 13.

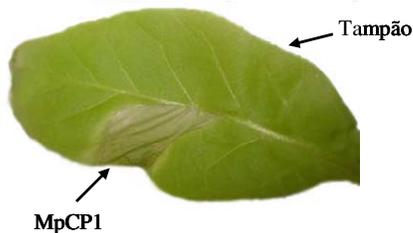


Figura 12. Efeitos biológicos de MpCP1 em tabaco



Figura 13. Efeitos biológicos de MpCP1 em cacau

A atividade de MpCP1 foi também testada em plantas monocotiledôneas, inoculada em folhas de cana-de-açúcar. Nenhuma atividade necrotrófica foi observada. Os controles (tampão de inoculação e água destilada) também não apresentaram alterações (dados não mostrados).

Uma vez que MpCP1 e MpNEP2 são co-expressas pelo fungo durante a infecção de plantas de cacau, foram realizados testes com o efeito dessas proteínas aplicadas em conjunto em folhas de tabaco e de cacau. Em primeiro lugar, ambas as proteínas foram inoculadas em folhas de tabaco (Fig. 14) e os efeitos necrotróficos, assim como a cinética das reações e efeitos de concentração foram comparados.

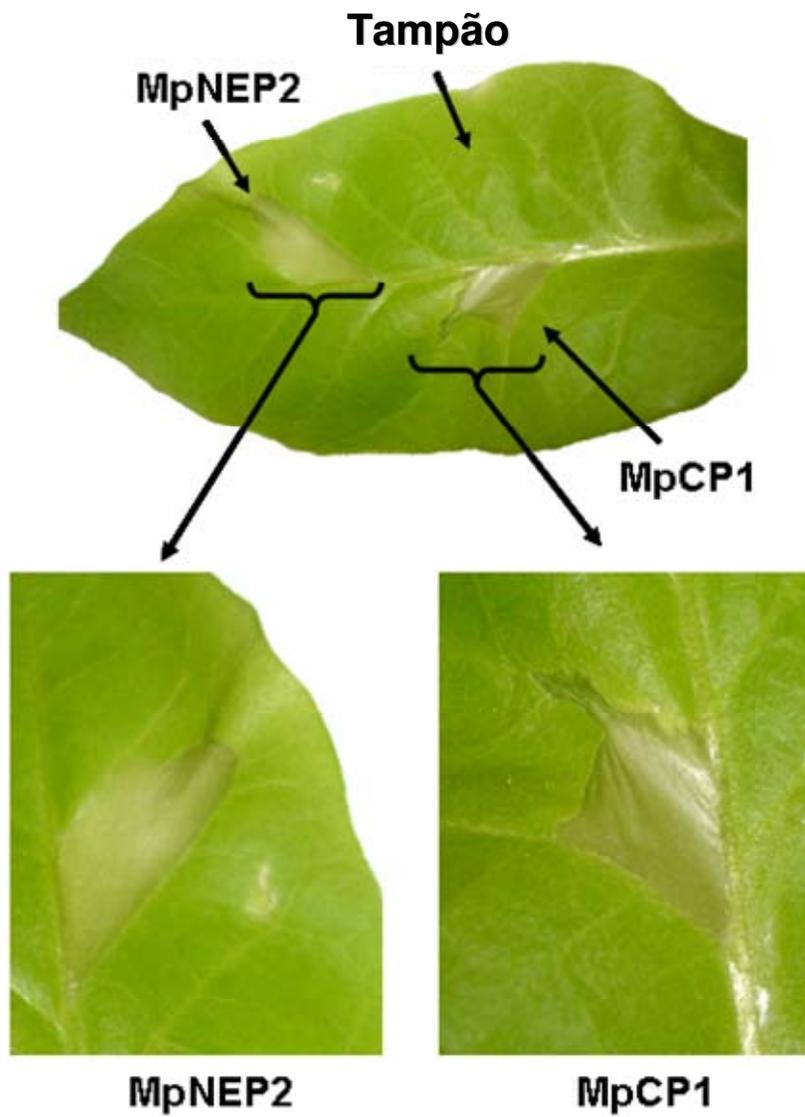


Figura 14. Diferenças entre o efeito de MpCP1 e MpNEP2 em tabaco

Pode-se observar que o efeito de necrose ocasionado por MpCP1 e MpNEP2 tem a mesma intensidade. Experimentos foram realizados com variações na concentração das proteínas (0,01, 0,05, 0,1, 0,3 e 0,5 mg/mL) inoculadas em folhas de tabaco, e o efeito de necrose observado foi sempre o mesmo. No caso de MpCP1, nenhum sintoma foi observado nas concentrações abaixo de 0,1 mg/mL, enquanto com MpNEP2 todas as concentrações testadas geram necrose.

È importante frisar que apesar de possuírem a mesma intensidade, visualmente o sintoma de necrose causado por ambas as proteínas é diferente. Enquanto a necrose causada

por MpNEP2 permanece no local da inoculação sem passar através de nervuras laterais (Fig. 14 zoom da esquerda), a necrose causada por MpCP1 vai além, atravessando as nervuras (Fig. 14 zoom da direita). Esses experimentos incluem réplicas e foram realizados várias vezes, e resultados similares foram sempre obtidos.

O mesmo experimento de comparação entre os efeitos de MpCP1 e MpNEP2 foi realizado em folhas de cacauero (Fig. 15). Comparações entre os tratamentos mostram diferenças entre a intensidade da necrose, mas não no tempo. Os sintomas começam a aparecer 12 horas após a inoculação em ambos os tratamentos, como um leve descolorir da superfície da folha na região de contato com as proteínas.

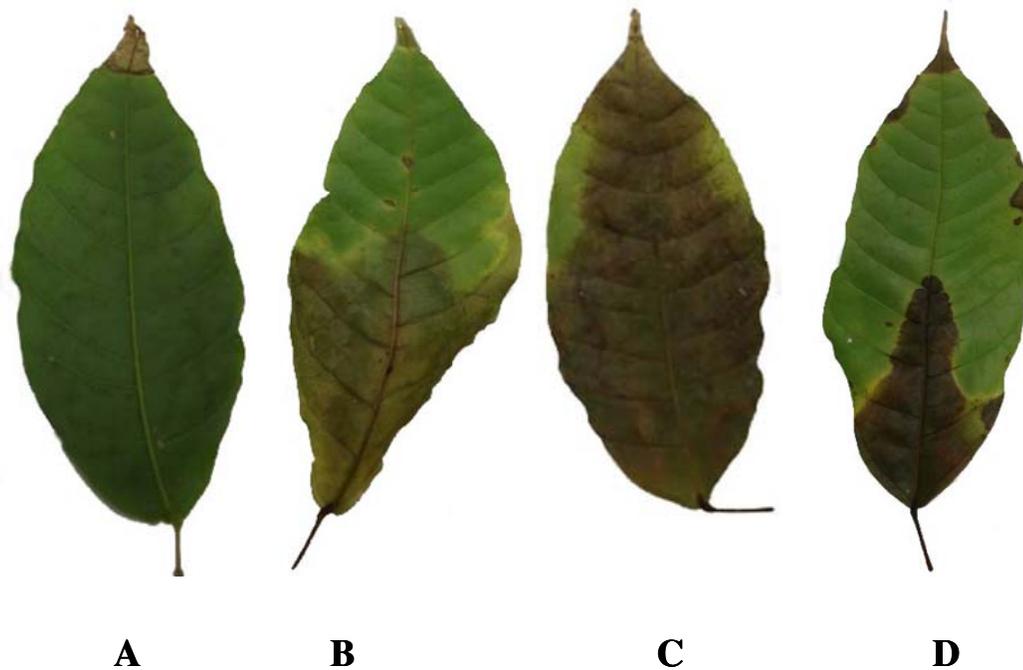


Figura 15. Diferenças entre o efeito de MpCP1 e MpNEP2 em folhas de cacau. Folhas de cacauero com duas semanas após o contato com A) tampão de diluição, B) MpNEP2, C) MpCP1 e D) MpCP1 e MpNEP2 juntas. As soluções possuem as mesmas concentrações finais de proteína em todos experimentos.

Podemos observar claras diferenças na aparência da necrose causada por cada uma das proteínas assim como pela combinação de ambas. Enquanto MpCP1 produz uma necrose mais espalhada, por toda a superfície da folha, MpNEP2 causa uma necrose mais localizada, próxima ao local de entrada da proteína. A mistura de proteínas ocasionou uma

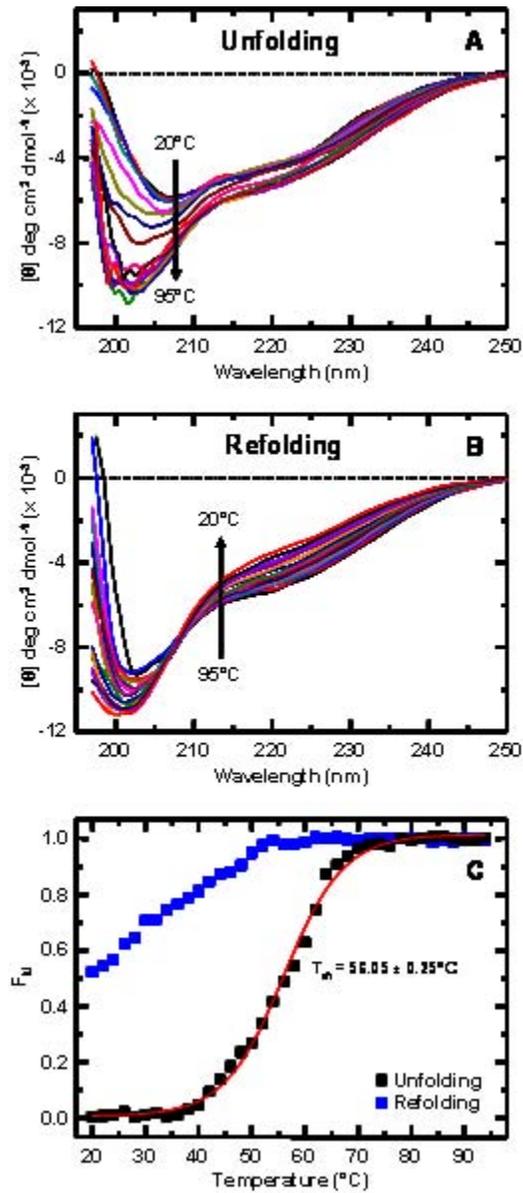
necrose mais escura, com a presença de regiões descontínuas necrosadas nas extremidades superiores da folha, o que não ocorre com as proteínas aplicadas isoladamente. Além disso, observamos que MpCP1 causa uma necrose mais intensa na veia central, quando comparada com MpNEP2.

Análises estruturais

As análises de dicroísmo circular (CD) revelaram que MpCP1 a 20°C apresenta um mínimo relativo a 207 nm e um ombro centralizado a 220 nm (Fig. 16A, linha preta). Durante o aquecimento, o mínimo coloca-se a comprimentos de ondas curtos com um ganho em intensidade negativa final a 202 nm a 95°C, e o ombro apesar de um ganho em intensidade negativa não apresenta outra mudança significativa (Fig. 16A).

O retorno da proteína a temperaturas próximas à temperatura ambiente mostra uma recuperação lenta das características originais do espectro original a 20°C (Fig. 16B). Uma análise mais quantitativa do processo de denaturação e renaturação de MpCP1 é apresentada na figura 16 C. O processo de denaturação parece possuir apenas uma transição, indicando que a proteína possa ser composta por apenas um domínio que denatura uniformemente (Fig. 16C, quadrados pretos). A temperatura de denaturação foi calculada em $56,05 \pm 0,25^\circ\text{C}$. A renaturação de MpCP1 (Fig. 16C, quadrados azuis) foi muito mais lenta e a proteína não teve tempo de atingir sua forma nativa durante o tempo do experimento. Esse dado indica que o processo de denaturação é reversível e que a renaturação é cineticamente mais lenta do que a denaturação.

Figura 16. Estudos de renaturação térmica de MpCP1



Baseando-se nos resultados obtidos por CD, folhas de tabaco foram tratadas com 0,5 mg/mL de MpCP1 após permanecer 30 minutos em banho-maria em água fervendo, a fim de testar-se a habilidade necrotrófica após renaturação.



Figura 17. Testes do efeito de MpCP1 após renaturação

Podemos observar que os efeitos de necrose causados pela proteína MpCP1 são iguais, tanto com a proteína tratada termicamente (MpCP1-A) como sem o tratamento (MpCP1-B). Tampão de inoculação aquecido também foi utilizado, para verificar o efeito de inoculação de uma solução em alta temperatura na folha, e nenhum sintoma foi observado.

DISCUSSÃO

O contato com microorganismos ocorre constantemente com todas as plantas, e por isso necessitam de um amplo e eficiente sistema de defesa. Para serem patogênicos, a maioria dos microorganismos precisa acessar o interior da planta hospedeira, seja penetrando pela superfície das folhas ou raízes diretamente ou entrando por ferimentos ou aberturas naturais como estômatos. Uma vez que tenham conseguido acesso ao interior da planta, os microorganismos precisam ultrapassar a parede celular, para então entrar em contato com a membrana celular do hospedeiro (Chisholm *et al.*, 2006; Qutob *et al.*, 2006).

Na superfície da membrana celular existem receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos, ou PAMPs. O reconhecimento dos microorganismos por parte dos receptores da planta inicia a chamada “PAMP-triggered immunity” (PTI) ou

imunidade desencadeada por PAMPs, que na maioria das vezes impede o desencadear da doença (Chisholm *et al.*, 2006).

Apesar dessa defesa inicial, microorganismos patogênicos evoluíram meios de suprimir a PTI, interferindo com o reconhecimento dos receptores das plantas ou secretando proteínas efetoras que alteram a sinalização ou a resposta de defesa dos hospedeiros. Uma vez que os patógenos adquiriram a capacidade de suprimir as defesas primárias, as plantas desenvolveram um mecanismo mais especializado que detecta invasores, denominado “effector-triggered immunity” (ETI) ou imunidade desencadeada por efetores. ETI envolve o reconhecimento direto, teoria gene-a-gene (Flor, 1971), ou indireto, teoria da vigilância (Van der Biezen e Jones, 1998), das proteínas secretadas pelos patógenos no interior da planta. Esse reconhecimento se dá por proteínas de defesa da planta (R). O reconhecimento das proteínas efetoras secretadas pelo patógeno se dá por proteínas de defesa das plantas (R), e uma vez que são ativadas, desencadeiam uma resposta de combate à proliferação do invasor e de resistência sistêmica.

Alguns patógenos, não surpreendentemente, adaptaram efetores para interferir a resposta ETI. Pela sua ação coletiva, existe uma hipótese de que efetores alteram a fisiologia das células de hospedeiros susceptíveis para manter a proliferação do patógeno. Alguns efetores conhecidos possuem atividade enzimática, e seriam responsáveis pela modificação das proteínas de defesa do hospedeiro, aumentando a virulência do patógeno e escapando do sistema de detecção do hospedeiro (Chisholm *et al.*, 2006).

Por outro lado, a maioria dos efetores não possui uma função conhecida descrita e pouco se sabe sobre sua interação com receptores extracelulares, modo de penetração nas células e sua real atividade no interior do hospedeiro. A maioria dos efetores de fungo conhecidos são pequenas proteínas de função desconhecida, com um peptídeo sinal para secreção no apoplasto.

Recentemente nosso grupo de trabalho encontrou seqüências no fungo *M. perniciosa* correspondentes a proteínas pertencentes à família das NLPs, uma classe de proteínas secretadas, descritas com funções elicitoras do sistema de defesa de plantas (Garcia *et al.*, 2007).

A descoberta de uma nova proteína indutora de necrose em *Moniliophthora perniciosa*, pertencente a outra família de elicitores além da já descrita família das NEPs, é

mais um sinal de que essa classe de proteínas possui alguma função de extrema importância em organismos fitopatogênicos. A exata função ainda permanece desconhecida, mas cada vez mais os pesquisadores concordam com o fato de que este tipo de proteína está relacionado com a resposta de defesa a patógenos, em organismos patogênicos. Por outro lado, este tipo de proteínas é também encontrado em organismos não patogênicos e, portanto, deva exercer uma outra função primária no patógeno.

Encontramos em *Moniliophthora perniciosa* a presença de seqüências correspondentes a proteínas com alta similaridade (e-value $2e-13$) à proteína cerato-platanina, descrita em *C. fimbriata* como causadora de necrose em plantas. Estes recém-descobertos possíveis genes foram denominados MpCPs (*Moniliophthora perniciosa* Cerato-Platanina). Com o interesse em maior compreender proteínas elicitoras de fungos fitopatogênicos, como *C. fimbriata* e *M. perniciosa*, ambos patógenos de cacauzeiros, escolhemos uma dessas seqüências para futuras análises (que denominamos MpCP1).

De acordo com as análises do draft do genoma e das seqüências de ESTs de *M. perniciosa* em nosso banco de dados, existem pelo menos cinco cópias de MpCPs (Fig. 4). Duas seqüências, MpCP1 e MpCP2, possuem ESTs correspondentes, o que significa que são genes expressos pelo fungo. Comparações entre as seqüências genômicas e de ESTs correspondentes indicam a presença de íntrons em MpCP1 e MpCP2. Curiosamente, em MpCP1, o íntron foi encontrado na região não transcrita (3'UTR) (Fig. 4B). A presença de íntrons na região 3'UTR é muito rara, ocorrendo em apenas 1,23% das espécies de fungos analisadas (Pesole *et al.*, 2001). As seqüências de MpCP1, MpCP2 e MpCP3 estão completas em nosso banco de dados.

Todas as cópias apresentam as quatro cisteínas conservadas características da família CP, o que indica uma grande importância desses resíduos na conformação estrutural dessas proteínas. Pazzagli *et al* confirmaram a formação de pontes dissulfeto entre esses quatro resíduos, comprovando sua importância no enovelamento protéico.

A presença de mais de uma cópia no genoma mostra a relevância desta família de proteínas para o fungo, seja na efetivação da doença ou em outra função ainda não descrita. Esta característica ocorre também com outros elicitores descritos, assim com as proteínas da família NLPs, que possui muitas cópias nos genomas, com mais de vinte cópias em

alguns oomicetos por exemplo (Kamoun, 2003) e no próprio *M. perniciosa*, com três cópias descritas (Garcia *et al.*, 2007).

As seqüências primárias dessas proteínas são muito semelhantes, enquanto a seqüência de nucleotídeos não, indicando duplicações gênicas que sofreram mutações, mas que mantém uma estrutura básica da proteína, como a presença dos quatro resíduos de cisteínas conservados. Estas duplicações podem estar relacionadas a um “banco genômico para mutações e diferenciação”, como ocorre no sistema imunológico de animais com imunoglobulinas. Dessa maneira, mutações podem ocorrer em cada proteína, sem que o fungo seja prejudicado caso a mutação impeça a expressão protéica, e ao mesmo tempo novas proteínas podem ser formadas a fim de escapar do reconhecimento por parte das moléculas de defesa da planta. Exatamente o que acontece com o sistema imune de animais e seus patógenos.

Comparações filogenéticas das proteínas com outros membros da família CP mostram algumas inconsistências em relação à classificação dos organismos. Isto se pode dever ao fato de que as proteínas analisadas são pequenas, o que dificulta as análises filogenéticas.

A família CP é composta por fungos basidiomicetos e ascomicetos, não patogênicos e patogênicos tanto de plantas como de animais (tabela 2). A função de virulência das proteínas da família CP parece ter o mesmo mecanismo: a ativação do sistema defensivo, seja o imunológico em animais como o pouco compreendido sistema de defesa de plantas. As proteínas da família CP devem exercer uma função primária, não claramente descrita em literatura, uma vez que esta proteína encontra-se na maioria dos fungos, patogênicos ou não.

Análises estruturais mostram que MpCP1 está presente como um dímero em solução. Esta conformação pode estar relacionada com a alta resistência dessa proteína ao stress térmico, assim como à possível resistência ao stress encontrado no interior da planta durante a infecção. Foi mostrado recentemente que MpCP1 é capaz de se auto-agregar num padrão semelhante ao de hidrofobinas com papéis na formação de hifas aéreas (Carresi *et al.*, 2006; Sbrana *et al.*, 2007). MpCPs (1-3) possuem alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos (45-48%) comparáveis com o de hidrofobinas. Estudos de auto-agregação e imunolocalização de MpCPs poderiam ajudar a elucidar a sua função. Pazzagli e

colaboradores (1999) descrevem a proteína cerato-platanina de *C. fimbriata* como uma possível função de hidrofobina, devido a seu tamanho, hidrofobicidade e semelhança com a hidrofobina cerato-ulmin. Apesar dessas semelhanças, nenhuma comprovação experimental foi encontrada com relação a esta função. Boddi e colaboradores (2004) sugerem possíveis funções estruturais para a mesma proteína, após identificar sua presença nas paredes celulares e conídeos do fungo.

Entretanto, não foi verificado envolvimento de nenhuma proteína da família CPs com funções de hidrofobina ou mesmo estruturais (Jeong *et al.*, 2007).

Em fungos patogênicos, após o constante contato de moléculas no interior dos hospedeiros, o sistema de defesa pode ter passado a reconhecer estas proteínas como PAMPs, e então desencadeado uma resposta de defesa contra. Por outro lado, estas proteínas CP podem ter evoluído em fungos patogênicos como uma forma de driblar o sistema de defesa dos hospedeiros, agindo como uma arma ativa contra PTI.

O fato dessas proteínas não estarem presentes em alguns fungos, como por exemplo os basidiomicetos *Cryptococcus neoformans*, *Ustilago Maydis*, *Filobasidiella neoformans* e todos os fungos do gênero *Saccharomycotina*, pode estar relacionado a perdas gênicas, em organismos não patogênicos, e mostraria que a segunda função a essas proteínas, parece não ser crucial para a sobrevivência dos fungos em geral.

A expressão de MpCP1 foi verificada a fim de confirmar se é realmente um gene expresso e se sua expressão pode estar relacionada com a fase de vida do fungo, como descrito para genes da família das NLPs em *P. sojae* (Qutob *et al.*, 2002) e no próprio fungo *M. pernicioso* (Garcia *et al.*, 2007). Com o resultado obtido, concluímos que *MpCPI* é um gene expresso pelo fungo, e que sua expressão varia entre as fases de vida, sendo mais expresso na fase biotrófica do que na saprotrófica.

Em parasitas hemibiotróficos, como *Moniliophthora pernicioso* e as espécies de *Phytophthora*, a mudança do ciclo de vida ocorre quando as células infectadas morrem. A proteína elicitora causadora de necrose facilita a colonização dos tecidos do hospedeiro, através da indução da morte celular no momento da mudança de fase do fungo. Em alguns casos, a expressão da proteína estudada acompanha a transição entre as fases biotrófica e saprotrófica do organismo (Qutob *et al.*, 2002). Já que durante a fase saprotrófica do desenvolvimento, o organismo necessita de tecidos mortos no hospedeiro, essa proteína

parece estar amplamente relacionada com a fase crítica da infecção, durante a qual a planta é necrosada e o patógeno se reproduz, infectando outros hospedeiros ao redor.

Uma maior expressão na fase biotrófica do fungo, no caso de MpCP1, pode significar uma constante manutenção do sistema de defesa da planta, impedindo novas infecções por outros fungos durante a vassoura-verde.

Esta manutenção do sistema de defesa por parte da planta passaria a ativação do sistema defensivo e uma necrose generalizada quando o fungo muda de fase e o número de hifas aumenta consideravelmente, aumentando conseqüentemente por amostragem no interior da planta a quantidade de MpCP1, como no caso de MpNEP2 (Garcia *et al.*, 2007).

A proteína MpCP1 é resistente a altas temperaturas, mantendo sua atividade mesmo após permanecer 30 minutos em banho-maria a 100 °C. Esta resistência pode estar relacionada com seu forte enovelamento e a presença das duas pontes dissulfeto em sua estrutura, assim como à formação de oligômeros quando em solução. As pontes dissulfeto podem estar relacionadas com uma maior estabilidade conformacional, sugerindo o envolvimento na resistência ao stress gerado pela planta durante as fases iniciais da infecção, como a produção de Eros e alterações no pH (Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

Através de testes realizados tanto em tabaco como em plântulas de cacauero, constatou-se que a proteína MpCP1 tem habilidade de causar necrose nas folhas de ambas as espécies. Com esses dados, descrevemos o primeiro caso de uma proteína da família Cerato-platanina presente em um fungo basidiomiceto com efeitos fisiológicos comprovados experimentalmente. Testes foram realizados em cana-de-açúcar e nenhum sinal de necrose foi detectado, confirmando o fato de que essa família protéica não afeta plantas monocotiledôneas.

Uma vez que o fungo *Moniliophthora perniciosa* secreta durante a doença, pelo menos duas diferentes classes de proteínas elicitoras, que comprovadamente causam necrose em folhas de cacauero, realizamos testes com uma proteína de cada família (MpNEP2 e MpCP1).

Comparando os efeitos de ambas as proteínas quando inoculadas em folhas de tabaco, observamos diferenças na característica e intensidade da necrose causada, e nenhuma diferença no tempo de início do surgimento dos sintomas. Comparações entre as duas proteínas mostraram que MpNEP2 causa necrose mesmo em baixas concentrações

(0,01 mg/mL), enquanto MpCP1 causa necrose apenas em concentrações superiores a 0,3 mg/mL. Este resultado pode estar relacionado com uma maior especificidade ou eficiência de MpNEP2.

Estes dados sugerem que a necrose realmente é desencadeada pela planta, como uma resposta tipo sim ou não, ou seja, a partir de determinada concentração da proteína elicitora, ocorre a ativação do sistema de defesa e a necrose ocorre. A intensidade de necrose, uma vez que esta ocorra (sim) é sempre a mesma.

Quando inoculadas na mesma quantidade na superfície de folhas de tabaco, MpCP1 espalha-se mais pela superfície e ultrapassa suas nervuras, enquanto a MpNEP2 permanece atuando restritamente no local da infiltração, com bordas claramente delimitadas pelas nervuras. Em folhas de cacau podemos observar que MpCP1 causa uma necrose mais intensa (escura) do que MpNep2. Além disso, observa-se que MpCP1 atinge a folha como um todo, com a necrose partindo da nervura central em direção às bordas da folha, enquanto MpNEP2 causa necrose a partir da base da folha em direção ao seu topo, ignorando a nervura central.

Em todos os tratamentos em que MpCP1 está inoculada, observamos que a nervura central da folha apresenta um aumento de necrose, sugerindo que MpCP1 pode estar sendo transportada pelo sistema vascular da planta (floema), em contraste com MpNEP2. As mesmas diferenças observadas entre MpCP1 e MpNEP2 nas características da necrose em folhas de tabaco, são observadas em folhas de cacau, com MpCP1 gerando necrose espalhando-se por toda a superfície da folha, enquanto MpNEP2 causa uma necrose mais localizada.

Estas diferenças nos sintomas causados entre as duas proteínas podem indicar diferenças em seus modos de atuação e na interação com as moléculas de defesa do hospedeiro. Este fato pode estar relacionado com uma maior mobilidade da proteína MpCP1 no interior da folha, sendo transportada pela nervura mais facilmente do que MpNEP2. A diferença de tamanho entre as duas proteínas (MpCP1 tem 13,56 kDa e MpNEP2 26 kDa) poderia estar favorecendo esta maior mobilidade por parte de MpCP1.

Quando testadas em conjunto, MpCP1 e MpNEP2 apresentam sintomas de necrose mais fortes e intensos na folha de cacau, sugerindo mais uma vez que cada proteína é reconhecida por uma via diferente dentro da planta hospedeira. Além disso, quando

aplicadas em conjunto, as proteínas geram um sintoma diferente, com a presença de regiões esparsas necrosadas nas extremidades superiores da folha, semelhante ao encontrado no campo. Com esses dados, podemos propor duas hipóteses: as proteínas em conjunto estão sendo transportadas através da folha, causando necrose apenas no local em que estacionam, ou os sinais desencadeados pelo reconhecimento pela planta dessas proteínas são reconhecidos em locais distantes ao da inoculação.

Estas duas hipóteses diferenciam os efeitos causados pelas proteínas quando em conjunto dos efeitos quando sozinhas. De alguma forma o efeito conjunto dessas duas proteínas impede que a necrose espalhe-se por toda folha durante seu transporte pela nervura central (no caso da primeira hipótese), ou as respostas de defesa geradas pelas duas proteínas em conjunto são mais intensas, a ponto de causar necrose nas extremidades da folha (no caso da segunda hipótese).

Estes resultados tornam-se mais interessantes quando associados com os sintomas causados pela doença *in situ*. No campo, plantas de *T. cacao* infectadas pelo fungo *M. perniciosa* mostram os primeiros sintomas de necrose (na mudança para a fase saprotrófica do ciclo de vida) na parte superior das folhas, longe do local de infecção, sintomas muito semelhantes aos encontrados em laboratório.

Mais testes são necessários para verificarmos se realmente ocorre interação entre as duas proteínas, ou se apenas os sinais desencadeados por cada uma delas causem um efeito na planta hospedeira que se complementem. As diferenças de sintomas e atuação das proteínas sugerem que MpCP1 e MpNEP2 podem incitar a morte celular no hospedeiro através de caminhos celulares distintos, e que deva existir um sinergismo entre as respostas de defesa induzidas por ambas as proteínas.

De alguma maneira ainda não conhecida, moléculas elicitoras são reconhecidas pelo hospedeiro, o que leva ao desencadeamento de uma resposta de defesa, normalmente de hipersensibilidade (HR).

Entre as angiospermas, todas as dicotiledôneas testadas apresentam sensibilidade a essa família de proteínas, enquanto nenhuma monocotiledônea é afetada. Qutob e colaboradores (2006), após uma série de experimentos, sugerem que o reconhecimento de NLPs pelas células hospedeiras não depende da parede celular, e que se dá na camada externa da membrana celular (lado apoplástico), provavelmente em algum sítio presente

apenas em dicotiledôneas. Apesar de ser provavelmente reconhecida pela membrana celular, outros experimentos demonstram que essa classe de proteína não é responsável pela formação de canais iônicos ou desestruturação da membrana celular a fim de causar sua morte.

Este fato pode justificar o fato de que até hoje não se encontrou nenhum receptor protéico correspondente a esses elicitores. Nenhuma interação clássica *Avr/R*, ou qualquer outra interação com proteínas do hospedeiro foi descrita.

Esta possível especificidade por sítios na membrana de plantas dicotiledôneas pode estar relacionada com o fato de que plantas monocotiledôneas não respondem a nenhuma proteína das famílias NLPs (Qutob *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2007) ou CPs (Jeong *et al.*, 2007) como descrito também em nossos experimentos.

Apesar de ser provavelmente reconhecida pela membrana celular, outros experimentos demonstram que essa classe de proteína não é responsável pela formação de canais iônicos ou desestruturação da membrana celular a fim de causar sua morte. Provavelmente, este reconhecimento se dá na membrana celular, e esta interação inicia uma reação em cascata que termina ativando ou inibindo a transcrição gênica responsável pela defesa contra invasores.

A proteína NLP_{pp}, de *Phytophthora parasítica* e membro da família NLPs, foi inoculada em plantas de tabaco juntamente com inibidores de transcrição de DNA (α -amantina) e da síntese protéica (cicloheximida) e nenhum efeito de necrose foi observado (Qutob *et al.*, 2006). Estes resultados sugerem fortemente que a necrose causada pelas NLPs é uma resposta ativa desencadeada por parte do hospedeiro após seu reconhecimento, com transduções de sinais e expressão gênica diferenciada. As moléculas secretadas pelo patógeno não funcionam simplesmente como uma toxina que causa a morte celular, mas realmente como elicitores. A utilização de um bloqueador da formação de canais de cálcio (LaCl_3) também inibiu a formação de necrose por parte das plantas, sugerindo que a formação de necrose necessita de cálcio livre no interior celular (Qutob *et al.*, 2006).

MpCP1 e MpNEP2 podem estar sendo usadas por *M. perniciosa* para suprimir PTI na fase inicial da infecção (fase biotrófica, na qual essas proteínas são mais expressas). Uma vez que nessa fase a presença de hifas é muito baixa, a concentração total de proteínas elicitoras pode não ser alta o suficiente para estimular ETI (elicitor-triggered immunity) no

hospedeiro. Quando o fungo muda de fase, a quantidade de hifas aumenta, aumentando a concentração de elicitores e esse ponto da infecção seria muito tarde para uma defesa efetiva da planta, uma vez que os elicitores são muito agressivos e matam as células da planta.

Além disso, *M. perniciosa* possui alguns mecanismos de escape contra as defesas iniciais, como a presença de uma oxidase alternativa (Thomazella *et al.*, em preparação) e proteínas anti-stress. As próprias proteínas MpCP1 e MpNEP2, são resistentes a altas temperaturas (o que pode estar relacionado a resistência ao stress), mantendo suas funções mesmo após permanecerem a 100°C, ao contrário de MpNEP1 e NPP1 de *Phytophthora* sp, que são mais expressas na fase necrotrófica, quando a planta não está mais combatendo arduamente o fungo (Qutob *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2007).

A partir desses dados, podemos propor que MpCP1 têm um papel ativo no desenvolvimento da doença Vassoura-de-Bruca, ou pelo menos no desencadeamento de seus sintomas (ocorrência de necrose nos ramos infectados). Também observamos uma relação entre os sintomas apresentados com MpCP1 e MpNEP2 atuando em conjunto e o encontrado no campo, o que implica em um sinergismo entre as duas classes de elicitores.

PERSPECTIVAS

- Expressão das outras cópias de MpCPs;
- Verificação de atividade das outras cópias de MpCPs;
- Verificação de uma possível interação entre as diferentes proteínas, e com as cópias de MpNEPs;
- Estudos de auto-agregação;
- Imunolocalização;
- Testes com inibidores de transcrição e tradução;
- Testes em células animais, uma vez que alguns membros da família são patógenos de animais.

Estas idéias visam uma maior compreensão das MpCPs e sua interação com o hospedeiro, assim como buscam uma possível função primária para essas proteínas além da já descrita elicitação do sistema de defesa.

REFERÊNCIAS:

- Aime, M. C. and Phillips-Mora, W. (2005). "The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae." *Mycologia* **97**(5): 1012-22.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* **215**(3): 403-10.
- Anderbrhan, T. (1987). "Rain-water as a factor in the dissemination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso* on cocoa seedlings." In: Disease Management in Cocoa. Comparative epidemiology of witches' broom. Eds. S. A. Rudgard, A. C. Maddison and T. Anderbrhan, Chapman & Hall, London.: 157-164.
- APSnet – The American Phytopathological Society -
<http://www.apsnet.org/online/common/names/cacao.asp>
- Ausubel, F. M. (2005). "Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?" *Nat Immunol* **6**(10): 973-9.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, A. J. and Struhl, K. (1998). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York-USA, Wiley & Sons Inc.
- Bailey, B. A. (1995). "Purification of a Protein from Culture Filtrates of *Fusarium oxysporum* That Induces Ethylene and Necrosis in Leaves of *Erythroxylum coca*." *Phytopathology* **85**(10): 1250-1255.
- Bartley, B. G. D. (1986). "Cacao, *Theobroma cacao*. In: Breeding for durable resistance in perennial crops." *Plant Production Papers*, 70. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome: 25-42.
- Bell, K. S., Sebahia, M., Pritchard, L., Holden, M. T., Hyman, L. J., Holeva, M. C., Thomson, N. R., Bentley, S. D., Churcher, L. J., Mungall, K., Atkin, R., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Clark, K., Doggett, J., Fraser, A., Hance, Z., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Norbertczak, H., Ormond, D., Price, C., Quail, M. A., Sanders, M., Walker, D., Whitehead, S., Salmond, G. P., Birch, P. R., Parkhill, J. and Toth, I. K. (2004). "Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(30): 11105-10.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. and Brunak, S. (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." *J Mol Biol* **340**(4): 783-95.
- Boddi, S., Comparini, C., Calamassi, R., Pazzagli, L., Cappugi, G. and Scala, A. (2004). "Cerato-platanin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and hyphae of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*." *FEMS Microbiol Lett* **233**(2): 341-6.
- Carresi, L., Pantera, B., Zoppi, C., Cappugi, G., Oliveira, A. L., Pertinhez, T. A., Spisni, A., Scala, A. and Pazzagli, L. (2006). "Cerato-platanin, a phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata*: expression in *Pichia pastoris*, purification and characterization." *Protein Expr Purif* **49**(2): 159-67.
- Bowers, J. H., Bailey, B. A., Hebbbar, P. K., Sanogo, S., Lumsden, R. D. 2001. "The impact of plant diseases on world chocolate production." *Plant Health Progress*
<http://www.apsnet.org/online/feature/cacao/>
- Carroll, L. (1960). *Alice's Adventures in Wonderland and Through the Looking-Glass*. New York, The New American Library.

CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira -
<http://www.ceplac.gov.br>

- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B. J. (2006). "Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response." *Cell* **124**(4): 803-14.
- Colas, V., Conrod, S., Venard, P., Keller, H., Ricci, P. and Panabieres, F. (2001). "Elicitin genes expressed in vitro by certain tobacco isolates of *Phytophthora parasitica* are down regulated during compatible interactions." *Mol Plant Microbe Interact* **14**(3): 326-35.
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G., Brasier, C.M. (2000). "A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes." *Fung. Genet. Biol.* **30**: 17-32.
- Dangl, J. L. and Jones, J. D. (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." *Nature* **411**(6839): 826-33.
- De Wit, P. J. (1992). "Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens." *Annu Rev Phytopathol* **30**: 391-418.
- Delgado, J. C. and Cook, A. A. (1976). "Nuclear Condition of Basidia, Basidiospores, and Mycelium of *Marasmius perniciosus*." *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **54**(1-2): 66-72.
- Erwin, D.C. e Ribeiro, O.K. (1996) "*Phytophthora* Diseases World-wide." St. Paul: APS Press.
- Evans, H. C. B., C. N (1979). "Uma reavaliação do ciclo de vida da vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciosus*) do cacau." *Fitopatologia Brasileira* **4**: 104.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations - <http://www.fao.org>
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal Biochem* **132**(1): 6-13.
- Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M. and Nurnberger, T. (2002). "NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*." *Plant J* **32**(3): 375-90.
- Felsenstein, J. (1985). "Confidence-Limits on Phylogenies - an Approach Using the Bootstrap." *Evolution* **39**(4): 783-791.
- Ferreira, F. A., Maffia, L.A., Ferreira, E.A. (2005). "Detecção rápida de *Ceratocystis fimbriata* em lenho infestado de eucalipto, mangueira e outros hospedeiros lenhosos." *Fitopatologia Brasileira* **30**(5).
- Flor, H. H. (1971). "Current status of the gene-for-gene concept." *Annu Rev Phytopathol* **9**: 275-296.
- Galiana, E., Bonnet, P., Conrod, S., Keller, H., Panabieres, F., Ponchet, M., Poupet, A. and Ricci, P. (1997). "RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitin." *Plant Physiol* **115**(4): 1557-67.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A. (2006). "Early signaling events induced by elicitors of plant defenses." *Mol Plant Microbe Interact* **19**(7): 711-24.
- Garcia, O., Macedo, J. A., Tiburcio, R., Zaparoli, G., Rincones, J., Bittencourt, L. M., Ceita, G. O., Micheli, F., Gesteira, A., Mariano, A. C., Schiavinato, M. A., Medrano, F. J., Meinhardt, L. W., Pereira, G. A. and Cascardo, J. C. (2007). "Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosus*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*." *Mycol Res* **111**(Pt 4): 443-55.

Gesteira Ada, S., Micheli, F., Ferreira, C. F. and Cascardo, J. C. (2003). "Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicioso*." *Biotechniques* **35**(3): 494-6, 498-500.

Gramacho, I. C. P., Magno, A. E. S., Mandarino, E. P. & Mato, A. (1992). *Cultivo e Beneficiamento do Cacau na Bahia*. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária do Brasil.

Grennan, A. K. (2006). "Plant response to bacterial pathogens. Overlap between innate and gene-for-gene defense response." *Plant Physiol* **142**(3): 809-11.

Guindon, S. and Gascuel, O. (2003). "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." *Syst Biol* **52**(5): 696-704.

Hall, N., Keon, J.P.R., Hargreaves, J.A. (1999). "A homologue of a gene implicated in the virulence of human fungal diseases is present in a plant fungal pathogen and is expressed during infection." *Physiological and molecular plant pathology* **55**: 69-73.

Head, B. (1903). *The Food of the Gods A Popular Account of Cocoa*. London.

Heylighen, F. (2000): "The Red Queen Principle", in: F. Heylighen, C. Joslyn and V. Turchin (editors): *Principia Cybernetica Web* (Principia Cybernetica, Brussels), URL: <http://pespmc1.vub.ac.be/REDQUEEN.html>

Higgins, D. G., Thompson, J. D. and Gibson, T. J. (1996). "Using CLUSTAL for multiple sequence alignments." *Methods Enzymol* **266**: 383-402.

INIAP - Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias - www.iniap-ecuador.gov.ec

Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1997). "Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4800-5.

Jackson, A. O. and Taylor, C. B. (1996). "Plant-Microbe Interactions: Life and Death at the Interface." *Plant Cell* **8**(10): 1651-1668.

Jeong, J. S., Mitchell, T. K. and Dean, R. A. (2007). "The *Magnaporthe grisea* snodprot1 homolog, MSP1, is required for virulence." *FEMS Microbiol Lett* **273**(2): 157-65.

Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., Valent, B. (2000). "Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance." *Embo J* **19**(15): 4004-14.

Kamoun, S. (2003). "Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes." *Eukaryotic Cell* **2**(2): 191-199.

Kamoun, S. (2006). "A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes." *Annu Rev Phytopathol* **44**: 41-60.

Kamoun, S., Huitema, E. and Vleeshouwers, V. G. (1999). "Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response?" *Trends Plant Sci* **4**(5): 196-200.

Kamoun, S., van West, P., de Jong, A. J., de Groot, K. E., Vleeshouwers, V. G. and Govers, F. (1997). "A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato." *Mol Plant Microbe Interact* **10**(1): 13-20.

Keen, N. T. (1990). "Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions." *Annu Rev Genet* **24**: 447-63.

Kolattukudy, P. E., Rogers, L. M., Li, D., Hwang, C. & Flaishman, M. A. (1995). "Surface Signaling in Pathogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 4080-4087.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.

- Lamb, C. J. (1994). "Plant disease resistance genes in signal perception and transduction." *Cell* **76**(3): 419-22.
- Lauge, R. and De Wit, P. J. (1998). "Fungal avirulence genes: structure and possible functions." *Fungal Genet Biol* **24**(3): 285-97.
- Leister, R. T. and Katagiri, F. (2000). "A resistance gene product of the nucleotide binding site - leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins in vivo." *Plant J* **22**(4): 345-54.
- Lima, J. O., dos Santos, J. K., Pereira, J. F., de Resende, M. L., de Araujo, E. F. and de Queiroz, M. V. (2003). "Development of a transformation system for *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants." *Curr Genet* **42**(4): 236-40.
- Lorrain, S., Vaillau, F., Balague, C. and Roby, D. (2003). "Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants?" *Trends Plant Sci* **8**(6): 263-71.
- Majoros, W. H., Pertea, M. and Salzberg, S. L. (2004). "TigrScan and GlimmerHMM: two open source ab initio eukaryotic gene-finders." *Bioinformatics* **20**(16): 2878-9.
- McGinnis, S. and Madden, T. L. (2004). "BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools." *Nucleic Acids Res* **32**(Web Server issue): W20-5.
- Meinhardt, L. W., Bellato Cde, M., Rincones, J., Azevedo, R. A., Cascardo, J. C. and Pereira, G. A. (2006). "In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*." *Curr Microbiol* **52**(3): 191-6.
- Melton, T. A. e Shew, H. D. 2000. "Black Shank", Tobacco Disease Information Note N°4. <http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/Tobacco/tadin004/tadin004.htm>
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - <http://www.agricultura.gov.br/>
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L. (2004). "Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences." *Immunol. Rev.* **198**: 249-266.
- Nylander, J. A. A. (2004). MrAIC.pl, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Orchard, J., Collin, H. A., Hardwick, K. and Isaac, S. (1994). "Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches-brooms on cocoa." *Plant Pathology* **43**(1): 65-72.
- Pan, S. and Cole, G. T. (1995). "Molecular and biochemical characterization of a *Coccidioides immitis*-specific antigen." *Infect Immun* **63**(10): 3994-4002.
- Pazzagli, L., Cappugi, G., Manao, G., Camici, G., Santini, A. and Scala, A. (1999). "Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani." *J Biol Chem* **274**(35): 24959-64.
- Pemberton, C. L. and Salmond, G. P. C. (2004). "The Nep1-like proteins - a growing family of microbial elicitors of plant necrosis." *Molecular Plant Pathology* **5**(4): 353-359.
- Penman, D., Britton, G., Hardwick, K., Collin, H. A. and Isaac, S. (2000). "Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*." *Mycological Research* **104**: 671-675.
- Pereira, J. L., deAlmeida, L. C. C. and Santos, S. M. (1996). "Witches' broom disease of cocoa in Bahia: Attempts at eradication and containment." *Crop Protection* **15**(8): 743-752.
- Pesole, G., Mignone, F., Gissi, C., Grillo, G., Licciulli, F. and Liuni, S. (2001). "Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions." *Gene* **276**(1-2): 73-81.
- Pieterse, C. M. and Van Loon, L. C. (2004). "NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways." *Curr Opin Plant Biol* **7**(4): 456-64.

- Purdy, L. H. and Schmidt, R. A. (1996). "Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology and management." *Annu Rev Phytopathol* **34**: 573-94.
- Qutob, D., Kamoun, S. and Gijzen, M. (2002). "Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy." *Plant Journal* **32**(3): 361-373.
- Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Kufner, I., Engelhardt, S., Gust, A. A., Luberacki, B., Seitz, H. U., Stahl, D., Rauhut, T., Glawischnig, E., Schween, G., Lacombe, B., Watanabe, N., Lam, E., Schlichting, R., Scheel, D., Nau, K., Dodt, G., Hubert, D., Gijzen, M. and Nurnberger, T. (2006). "Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins." *Plant Cell* **18**(12): 3721-44.
- Rementeria, A., Lopez-Molina, N., Ludwig, A., Vivanco, A. B., Bikandi, J., Ponton, J. and Garaizar, J. (2005). "Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence." *Rev Iberoam Micol* **22**(1): 1-23.
- Rincones, J., Mazotti, G. D., Griffith, G. W., Pomela, A., Figueira, A., Leal, G. A., Jr., Queiroz, M. V., Pereira, J. F., Azevedo, R. A., Pereira, G. A. and Meinhardt, L. W. (2006). "Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America." *Mycol Res* **110**(Pt 7): 821-32.
- Rincones, J., Meinhardt, L. W., Vidal, B. C. and Pereira, G. A. (2003). "Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*." *Mycol Res* **107**(Pt 4): 452-8.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." *Methods Mol Biol* **132**: 365-86.
- Sambrook, J. R. (2002). *Molecular cloning. A laboratory manual*.
- Sbrana, F., Bongini, L., Cappugi, G., Fanelli, D., Guarino, A., Pazzagli, L., Scala, A., Vassalli, M., Zoppi, C. and Tiribilli, B. (2007). "Atomic force microscopy images suggest aggregation mechanism in cerato-platanin." *Eur Biophys J*.
- Scarpari, L. M., Meinhardt, L. W., Mazzafera, P., Pomella, A. W., Schiavinato, M. A., Cascardo, J. C. and Pereira, G. A. (2005). "Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*." *J Exp Bot* **56**(413): 865-77.
- Scheel, D. (1998). "Resistance response physiology and signal transduction." *Curr Opin Plant Biol* **1**(4): 305-10.
- Scheel, D. and Parker, J. E. (1990). "Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation." *Z Naturforsch [C]* **45**(6): 569-75.
- Seidl, V., Marchetti, M., Schandl, R., Allmaier, G. and Kubicek, C. P. (2006). "Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors." *Febs J* **273**(18): 4346-59.
- Silva, S. D. V. M. and Matsuoka, K. (1999). "Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacauzeiros suscetível e resistente a vassoura-de-bruxa." *Fitopatologia Brasileira* **24**(1): 54-59.
- Specht, C. A., DiRusso, C. C., Novotny, C. P. and Ullrich, R. C. (1982). "A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi." *Anal Biochem* **119**(1): 158-63.
- Sreenivasan, T. N. D., S (1989). "Modes of penetration of young cocoa leaves by *Crinipellis pernicioso*." *Plant Disease* **73**(6): 478-481.

- Stahel, G. (1915). "*Marasmius perniciosus* nov. spec." Dept Landbouw in Suriname Bull **33**: 1–27.
- Staskawicz, B. J., Asubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. E. & Jones, J. D. G. (1995). "Molecular genetics of plant disease resistance." *Science* **268**: 661-667.
- Takami, H. and Horikoshi, K. (2000). "Analysis of the genome of an alkaliphilic *Bacillus* strain from an industrial point of view." *Extremophiles* **4**(2): 99-108.
- Taylor, M. 1998. "The World Cocoa Situation". International Forum in Cocoa, Lima, Peru, 28-29th October, 1998. LMC International, Ltd., London, UK.
- Thomazella, D. *et al.* Manuscripto em preparação. "An Alternative Oxidase is Preferentially Expressed in the Biotrophic Mycelium of the Hemibiotrophic Fungal Pathogen *Moniliophthora pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease of Cocoa".
- Thomma, B. P., Penninckx, I. A., Broekaert, W. F. and Cammue, B. P. (2001). "The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*." *Curr Opin Immunol* **13**(1): 63-8.
- Tyler, B. M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R. H., Aerts, A., Arredondo, F. D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J. L., Chapman, J., Damasceno, C. M., Dorrance, A. E., Dou, D., Dickerman, A. W., Dubchak, I. L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon, S. G., Govers, F., Grunwald, N. J., Huang, W., Ivors, K. L., Jones, R. W., Kamoun, S., Krampis, K., Lamour, K. H., Lee, M. K., McDonald, W. H., Medina, M., Meijer, H. J., Nordberg, E. K., Maclean, D. J., Ospina-Giraldo, M. D., Morris, P. F., Phuntumart, V., Putnam, N. H., Rash, S., Rose, J. K., Sakihama, Y., Salamov, A. A., Savidor, A., Scheuring, C. F., Smith, B. M., Sobral, B. W., Terry, A., Torto-Alalibo, T. A., Win, J., Xu, Z., Zhang, H., Grigoriev, I. V., Rokhsar, D. S. and Boore, J. L. (2006). "*Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis." *Science* **313**(5791): 1261-6.
- Valen, L. V. (1973). "A new evolutionary law." *Evolutionary Theory* **1**: 1-30.
- Van der Biezen, E. A. and Jones, J. D. (1998). "Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept." *Trends Biochem. Sci.* **23**: 454-456.
- Veit, S., Worle, J. M., Nurnberger, T., Koch, W. and Seitz, H. U. (2001). "A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco." *Plant Physiol* **127**(3): 832-41.
- Waggoner, B. 1995 "Introduction to the Oomycota"
<http://www.ucmp.berkeley.edu/chromista/oomycota.html>
- Wang, J. Y., Cai, Y., Gou, J. Y., Mao, Y. B., Xu, Y. H., Jiang, W. H. and Chen, X. Y. (2004). "VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting." *Appl Environ Microbiol* **70**(8): 4989-95.
- Wilson, L. M., Idnurm, A., Howlett, B.J. (2002). "Characterization of a gene (sp1) encoding a secreted protein from *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of *Brassica napus*." *Molecular Plant Pathology* **3**: 487-493.
- Yu, L. M. (1995). "Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4088-94.