

JILDETE KARLA DOS SANTOS

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E REGULAÇÃO DE GENES QUE
CODIFICAM PECTATO LIASE EM *Crinipellis perniciosa*, AGENTE
ETIOLÓGICO DA VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO (*Theobroma
cacao*).**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S237i
2006

Santos, Jildete Karla dos, 1976-

Isolamento, caracterização e regulação de genes que codificam pectato liase em *Crinipellis pernicioso*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao*) / Jildete Karla dos Santos. – Viçosa : UFV, 2006.

ix, 111f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 87-111.

1. Fungos - Genética. 2. Enzimas pectinolíticas.
3. Pectato liase. 4. Regulação de expressão gênica.
5. *Crinipellis pernicioso*. 6. Vassoura-de-bruxa (Fito-
patologia). I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 571.2959

JILDETE KARLA DOS SANTOS

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E REGULAÇÃO DE GENES QUE
CODIFICAM PECTATO LIASE EM *Crinipellis perniciosa*, AGENTE
ETIOLÓGICO DA VASSOURA-DE-BRUXA DO CACAUEIRO (*Theobroma
cacao*).**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de "Doctor Scientiae".

APROVADA: 10 de abril de 2006.

Profª Elza Fernandes de Araújo
(Conselheira)

Prof. Robert Weingart Barreto
(Conselheiro)

Prof. João Lúcio de Azevedo

Prof. Maurício Dutra Costa

Profª. Marisa Vieira de Queiroz
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização deste curso.

À Prof^a. Marisa Vieira de Queiroz, cuja confiança e entusiasmo foram preciosos para a realização deste trabalho.

À Prof^a. Elza Fernandes de Araújo, pelos inúmeros ensinamentos, dentro e fora da sala de aula.

Aos professores Robert Barreto e Maurício Costa, pelas valiosas contribuições neste trabalho e pela participação na Banca de Defesa de Tese.

Ao Prof^o João Lúcio de Azevedo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) por, gentilmente, ter participado como membro da Banca de Defesa de Tese.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, cujos exemplos de dedicação, competência e amor ao trabalho levarei sempre comigo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro desde minha Iniciação Científica.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular e dos demais laboratórios, cujos nomes não poderei citar, pois são muitos ao longo destes quase 10 anos, por todos os papos sérios e furados e agradáveis momentos de convivência que tornaram o ambiente de trabalho sempre muito alegre.

Às secretárias Nilcéia, Laura e Aparecida, pela atenção e competência com que cuidam de nossa vida acadêmica e a todos os demais funcionários do Departamento de Microbiologia.

Ao meu querido amigo João Batista, pela amizade e apoio em muitas etapas desta nossa caminhada.

À minha mãe, pela grande dedicação e carinho por seus filhos, pelo apoio e pelo exemplo de força inabalável em todos os momentos.

Aos meus irmãos e toda minha família, que sempre me apoiaram em tudo.

Ao Serginho, por todos estes anos juntos e ao nosso filhinho, Luís Vítor, cujo sorriso enche nossas vidas de luz.

E, finalmente, a Deus pela presença constante em nossas vidas e por todas estas, e muitas outras, graças concedidas.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	01
2. <u>REVISÃO DE LITERATURA</u>	03
2.1 – IMPORTÂNCIA E MECANISMOS DA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA PAREDE CELULAR DE PLANTAS POR PATÓGENOS.....	03
2.2 – ENZIMAS PECTINOLÍTICAS COMO FATORES DE PATOGENICIDADE EM FUNGOS FITOPATOGÊNICOS.....	13
2.3 – O PATÓGENO: <i>Crinipellis pernicios</i> a.....	21
3. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	32
3.1 – MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	32
3.2 – EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL E CLONAGENS.....	33
3.3 – CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO E ISOLAMENTO DE GENES QUE CODIFICAM PECTATO LIASE.....	33
3.3.1 – Digestão parcial do DNA total com a enzima de restrição <i>Sau3A</i>	34
3.3.2 – Separação dos fragmentos de restrição de DNA em gradiente de sacarose.....	34

3.3.3 – Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor λ EMBL3 e empacotamento in vitro.....	35
3.4 – ISOLAMENTO DOS GENES <i>PEC1A</i>, <i>PEC1B</i> E <i>PEC2</i> QUE CODIFICAM PECTATO LIASE EM <i>C. pernicioso</i>.....	35
3.4.1 – Sondas utilizadas.....	35
3.4.2 – Isolamento dos fagos recombinantes do Banco Genômico.....	36
3.4.3 – Extração e caracterização dos fragmentos de DNA dos fagos recombinantes.....	36
3.4.4 – Subclonagem dos fragmentos de DNA dos fagos recombinantes, sequenciamento e caracterização.....	37
3.5 – ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO GENE PECTATO LIASE EM DIFERENTES ISOLADOS DE <i>C. pernicioso</i>.....	37
3.6 – EXPRESSÃO DOS GENES <i>PEC1A</i>, <i>PEC1B</i> E <i>PEC2</i> QUE CODIFICAM PECTATO LIASE EM DIFERENTES CONDIÇÕES <i>in vitro</i>.....	38
4. <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>.....	40
4.1 – ISOLAMENTO DE GENES QUE CODIFICAM PECTATO LIASE.....	40
4.1.1 – Construção do Banco Genômico.....	40
4.1.2 – Construção das sondas de DNA e organização dos genes que codificam pectato liase no genoma de <i>C. pernicioso</i>	40
4.1.3 – Clonagem e sequenciamento dos genes <i>pec1A</i> , <i>pec1B</i> e <i>pec2</i> de <i>C. pernicioso</i>	45

4.2 – CARACTERIZAÇÃO DOS GENES <i>PEC1A</i> , <i>PEC1B</i> E <i>PEC2</i>	46
4.3 – CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DEDUZIDAS DE <i>pec1A</i> , <i>pec1B</i> E <i>pec2</i> DE <i>C. perniciosus</i>	57
4.4 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>pec1A</i> , <i>pec1B</i> E <i>pec2</i> <i>IN VITRO</i>	71
5. <u>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</u>	85
6. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	87

RESUMO

SANTOS, Jildete Karla dos, D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2006. **Isolamento, caracterização e regulação de genes que codificam pectato liase em *Crinipellis perniciosa*, agente etiológico da vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao*)**. Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Conselheiros: Elza Fernandes de Araújo e Robert Weingart Barreto.

Neste trabalho, genes que codificam a enzima pectinolítica pectato liase foram isolados do genoma do fungo *Crinipellis perniciosa*, agente etiológico da doença vassoura-de-bruxa do cacauero. Enzimas pectinolíticas vêm sendo correlacionadas com a patogenicidade de alguns fungos fitopatogênicos. Buscas preliminares realizadas no Banco de Dados do Projeto Genoma “Vassoura de Bruxa”, revelaram a presença de seqüências, no genoma de *C. perniciosa*, com similaridade à pectato liases de diferentes fungos. Duas seqüências, com similaridade com a pectato liase A de *Aspergillus niger* e a pectato liase D de *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, foram utilizadas para a construção de oligonucleotídeos específicos. Os fragmentos de DNA amplificados foram utilizados como sondas homólogas na determinação do número de cópias destes genes no genoma de *C. perniciosa* e no isolamento de genes que codificam pectato liase em um Banco Genômico de *C. perniciosa*, construído no bacteriófago λ EMBL3. Análise de hibridização com DNA total de *C. perniciosa*, clivado com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Xba*I, revelaram a presença de, pelo menos, 2 cópias do gene que codifica pectato liase com similaridade à pectato liase A de *A. niger* e uma cópia do gene que codifica pectato liase com similaridade à pectato liase D de *F. solani* f. sp. *pisi*. Com base nesta caracterização inicial três genes, *pec1A*, *pec1B* e *pec2*, foram isolados no Banco Genômico de *C. perniciosa* e caracterizados. Os genes *pec1A* e *pec1B* possuem, respectivamente, regiões codificadoras de 1141 e 1346 pb e são ambas interrompidas por 7 íntrons. O gene *pec2* possui uma região codificadora de 936 pb e está interrompida por apenas 3 íntrons. A completa análise dos promotores não foi possível, entretanto, alguns cis-elementos envolvidos na regulação de genes puderam ser identificados em *pec1B* e *pec2*. As proteínas codificadas por *pec1A*, *pec1B* e *pec2* possuem

respectivamente, 244, 307 e 253 aminoácidos. As proteínas PEL1A, PEL1B apresentaram 60% identidade entre si, mas baixa identidade, 4,3 e 4,6%, respectivamente, com PEC2. Quando comparadas com outras pectato liases de fungos, PEC1A E PEC1B apresentaram maior identidade com pectato liase A de *A. niger* e *A. fumigatus*. A enzima PEC2, por sua vez apresentou maior identidade com proteínas de um novo grupo de pectato liases, representado pela família multigênica que codificam pectato liases em *F. solani* f. *psi*. Alinhamentos múltiplos entre as pectato liases de *C. pernicioso* e de diferentes fungos fitopatogênicos, bem como a análise filogenética realizada, sugerem que PEC2 realmente pertence a uma nova classe de pectato liase, juntamente com as pectato liases de *F. solani* f.sp. *psi*. Os genes *pec1A* e *pec1B* foram expressos em todas as fontes de carbono avaliadas, como em pectina, pectina e glicose, glicose e polpa de cacau, bem como em pectina em pH 4,0, 6,8 e 8,0. Entretanto, diferenças no nível de expressão destes genes foram detectadas, como a maior expressão dos genes *pec1A* e *pec1B* em valores de pH igual à 8,0. Já *pec2* não foi expresso em nenhuma das condições avaliadas. A maior atividade enzimática detectada no extrato de proteínas do micélio, juntamente com a observação de que os genes que codificam pectato liase de *C. pernicioso* não respondem à repressão catabólica, sugerem que algumas destas enzimas podem estar ligadas à parede celular e, assim, sujeitas a um controle pós-traducional. Este é o primeiro relato do isolamento e caracterização de genes que codificam pectato liase em basidiomicetos.

ABSTRACT

SANTOS, Jildete Karla dos, D.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2006.
Isolation, characterization and regulation of genes encoding pectate lyase in *Crinipellis pernicioso*, etiological agent of the witches' broom in cocoa (*Theobroma cacao*). Adviser: Marisa Vieira de Queiroz.
Committee members: Elza Fernandes de Araújo and Robert Weingart Barreto.

In this work, genes encoding the pectinolytic enzyme pectate lyase were isolated from the genome of the fungus *Crinipellis pernicioso*, etiological agent of the witches' broom disease of cocoa. Pectinolytic enzymes have been correlated with the pathogenicity of some phytopathogenic fungi. Preliminary database searches of the Genome Project "Witches' broom", revealed the presence of sequences, in the *C. pernicioso* genome, with similarity to the pectate lyases of different fungi. Two sequences with similarity to the *Aspergillus niger* pectate lyase A and the *Fusarium solani* f. sp. *pisi* pectate lyase D, were used for the construction of specific oligonucleotides. The DNA fragments amplified were used as homologous probe in the copy number determination of these genes in the *C. pernicioso* genome and in the isolation of genes encoding pectate lyase from *C. pernicioso* genomic library constructed in the λ EMBL3 bacteriophages. Hybridization analysis with *C. pernicioso* total DNA cleaved by the enzymes *Bam*HI, *Eco*RI e *Xba*I, revealed the presence of at least 2 copies of the gene encoding pectate lyase with similarity to the *A. niger* pectate lyase A and one copy of the gene encoding pectate lyase with similarity to the *F. solani* f. sp. *pisi* pectate lyase D. Based on this initial characterization three genes, *pec1A*, *pec1B* and *pec2*, were isolated from the *C. pernicioso* genomic library and characterized. The *pec1A* and *pec1B* genes have, respectively, open read frames of 1141 and 1346 pb and are both interrupted by 7 introns. The *pec2* gene has one open read frame of 936 pb and is interrupted by only 3 introns. The complete promoter analysis was not possible; however, some cis-elements involved in the regulation of genes could be identified in *pec1B* and *pec2* genes. The proteins encoding by *pec1A*, *pec1B* and *pec2* have respectively, 244, 307 and 253 amino acids. The proteins

PEL1A and PEL1B presented 60% identities among themselves, but lower identities, 4,3 and 4,6%, respectively, with PEC2. When compared with other fungi pectate lyases, PEC1A and PEC1B presented high identities with *A. niger* and *A. fumigatus* pectate lyase A. The PEC2 enzyme presented the highest identities with proteins from a new pectate lyase group, represented by the multigenic family encoding pectate lyases in *F. solani* f. sp. *pisi*. Multiple alignments between the *C. pernicioso* and the different phytopathogenic fungi pectate lyases, as well as the phylogenetics analyses, suggest that PEC2 really belongs to a new class of pectate lyase, represented by the *F. solani* f. sp. *pisi* pectate liases. The *pec1A* and *pec1B* genes were expressed in all carbon resources evaluated, as in pectin, pectin and glucose, glucose and cocoa pulp, as well as in pectin in pH 4,0, 6,8 e 8,0. However, differences in the level of expression of these genes were detected, as the highest expression of the *pec1A* and *pec1B* genes in pH values equal to 8,0. The *pec2* gene was not expressed in any of the evaluated conditions. This is the first report of isolation and characterization of genes encoding pectate lyase in basidiomycets.

1. INTRODUÇÃO

Em função dos grandes prejuízos econômicos que a doença vassoura-de-bruxa do cacau (*Theobroma cacao*) provocou na produção de cacau no Estado da Bahia, o fungo fitopatógeno *Crinipellis perniciosa* vem sendo, desde a implementação do Projeto Genoma “Vassoura de Bruxa”, alvo de estudos genéticos por muitos grupos de pesquisadores no Brasil. Estes estudos visam à identificação de fatores responsáveis pela variabilidade genética e pela patogenicidade, que possam auxiliar no entendimento dos processos de patogênese, bem como no desenvolvimento de medidas realmente efetivas para o controle da doença.

O isolamento de mutantes com a patogenicidade alterada é sem dúvida o método mais eficiente para a identificação de genes importantes no processo de infecção e desenvolvimento da doença. Muitos genes de patogenicidade já identificados, em sua maioria pela aplicação de técnicas de mutagênese insercional, têm papel funcional na formação de estruturas fúngicas de infecção, em vias de sinalização, na supressão de respostas de defesa da planta, nas respostas ao ambiente interno do hospedeiro, na produção de toxinas e na degradação de componentes da parede celular.

A parede celular é considerada a primeira barreira imposta pelo hospedeiro para a infecção, colonização e disponibilização de nutrientes. Para transpor esta barreira, os fungos fitopatogênicos secretam inúmeras enzimas extracelulares, com destaque para as enzimas pectinolíticas, que atuam degradando a pectina da lamela média e parede celular primária das plantas.

As enzimas pectinolíticas são importantes fatores de patogenicidade para fungos e bactérias fitopatogênicas e têm sido correlacionadas com a indução de resposta de defesa pela planta, como a síntese de proteínas inibidoras de enzimas pectinolíticas. Um grupo de proteínas bem caracterizado são as proteínas inibidoras de poligacturonases (PGIPs). Tais proteínas, sintetizadas pelas plantas no início da infecção, retardam as funções das poligacturonases, prevenindo a degradação da parede e limitando o crescimento do fungo e a colonização dos tecidos. A demonstração de que as enzimas pectinolíticas são fatores de patogenicidade para alguns fungos, associada ao conhecimento de proteínas inibidoras destas enzimas, abre novas perspectivas de produção de variedades comerciais de plantas resistentes a fungos fitopatogênicos.

O isolamento de genes que codificam enzimas pectinolíticas em *C. pernicioso*, bem como a inativação destes genes, associados à uma avaliação da capacidade infectiva em plantas de cacaueteiro, possibilitará determinar se estes genes codificam fatores de patogenicidade neste importante patógeno. A identificação de genes de patogenicidade de *C. pernicioso* será importante não somente para auxiliar na compreensão dos processos da doença, mas também porque os produtos destes genes podem se tornar alvos potenciais para o controle da doença.

Os objetivos deste trabalho foram isolar e caracterizar genes que codificam pectato liase em *C. pernicioso*, bem como analisar a expressão destes genes *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. IMPORTÂNCIA E MECANISMOS DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DA PAREDE CELULAR DE PLANTAS POR PATÓGENOS

O desenvolvimento de doenças em plantas, causadas por microrganismos, é caracterizado pela ocorrência de eventos sucessivos e ordenados, denominados por Amorin (1995), de “ciclo das relações patógeno-hospedeiro”. Neste ciclo estão incluídos os processos de sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução do patógeno (Quadro 1). O processo de infecção, como definido por Gaumann (1950), se estende da germinação do patógeno até o estabelecimento das relações parasitárias, quando então tem início a colonização, ou seja, o desenvolvimento do patógeno no hospedeiro, com a invasão de seus tecidos e interferência em sua fisiologia. Os eventos morfogênicos envolvidos na fase de infecção dependem de sinais específicos presentes na superfície da planta e são pré-requisitos para um particular mecanismo de reconhecimento do hospedeiro e de penetração, podendo até mesmo estabelecer se a planta é hospedeira ou não (Mendgen *et al.*, 1996).

Um passo crucial para o sucesso de um fitopatógeno, além de “encontrar” seu hospedeiro, é a penetração no tecido vegetal. Entretanto, anterior a este processo, e considerado evento pré-infeccional, a adesão dos esporos e de estruturas especializadas de infecção também é substancialmente determinante para o sucesso do processo de infecção (Epstein e Nicholson, 1997; Lebeda *et al.*, 2001). Estudos com mutantes com reduzida capacidade de adesão indicam que este evento é importante para a patogenicidade para *Nectria haematococca* (Jones e Epstein, 1990) e em *Colletotrichum graminicola* (Mercure *et al.*, 1994) a severidade da doença foi reduzida em condições ambientais nas quais a adesão era reduzida. A adesão dos esporos deve ser mediada por interação hidrofóbica, uma vez que as partes aéreas das plantas são cobertas com cutícula hidrofóbica composta de cutina e ceras.

Quadro 1 – Processos, subprocessos e mecanismos envolvidos no ciclo de relações patógeno-hospedeiro.

Processos	Subprocessos	Mecanismos
Sobrevivência		Estruturas especializadas
		Atividades saprofiticas Plantas Vetores
Disseminação	Liberação	Ativa ou passiva
	Dispersão	Ar, água, homem, insetos
	Deposição	Sedimentação, impacto, turbulência
Infecção	Pré-penetração	Aberturas naturais
	Penetração	Ferimentos Direta
	Relações parasitárias	
Colonização		Intercelular
		Intracelular
Reprodução		Sexuada
		Assexuada

Fonte: Amorin (1995)

Seguindo a adesão, o esporo inicia a formação do tubo germinativo. O crescimento deste tubo germinativo para uma particular localização (tigmotropismo) e/ou a formação de estruturas especiais de infecção (tigmodiferenciação), como apressórios, podem ser induzidos por características topográficas da superfície da planta (Hoch *et al.* 1987; Epstein *et al.*, 1997; Idnurm e Howlett 2001). Hoch *et al.* (1987) criaram substratos artificiais que reproduziam características indutíveis para o crescimento e formação de apressório e assim determinaram as dimensões e localização dos sinais topográficos presentes na superfície e nas células-guarda que sinalizam,

respectivamente, o crescimento orientado de *Uromyces appendiculatus* para os estômatos e a diferenciação do tubo germinativo em apressório.

Os fitopatógenos podem penetrar nos tecidos hospedeiros por três vias principais: direta, aberturas naturais e ferimentos em tecidos (Amorim, 1995). O mecanismo de penetração direta na planta ocorre por meio de ação mecânica, exercida pelas hifas especializadas denominadas de *peg* de penetração, e também está associada a uma ação química exercida por enzimas extracelulares. As aberturas naturais presentes nas plantas, como lenticelas, estômatos e hidatódios nas folhas, estígmias e nectários nas flores, são as principais vias de acesso para muitos fungos e são alvos principais para bactérias fitopatogênicas. A penetração por ferimentos é amplamente utilizada por bactérias, vírus, fitoplasmas, nematóides e fungos para penetrar em seus hospedeiros (Amorim, 1995).

Uma vez estabelecida a infecção, tem-se o início do parasitismo ou da colonização, com conseqüente retirada de nutrientes da planta. Em função das relações nutricionais estabelecidas com o hospedeiro, os fungos fitopatogênicos podem ser classificados como biotróficos, hemibiotróficos ou necrotróficos. Fungos biotróficos compreendem as espécies que, em sua maioria, extraem nutrientes das células vivas com auxílio de estruturas especializadas em absorção, denominadas haustórios. Na emissão dos haustórios para o interior das células ocorre a dissolução da parede celular, seguida da invaginação da membrana celular das células hospedeiras. A retirada de nutrientes pelos fungos biotróficos altera a fisiologia da planta e, conseqüentemente, sua saúde, sem, no entanto, causar a morte celular. Fungos hemibiotróficos caracterizam-se por uma fase biotrófica, de crescimento intercelular, e uma fase saprofítica ou necrotrófica em que o crescimento das hifas passa a ser, predominantemente, intracelular e os nutrientes são obtidos dos tecidos vegetais mortos. Fungos necrotróficos, por sua vez, matam o hospedeiro antes mesmo de invadi-lo e o desenvolvimento do patógeno ocorre sempre pela atividade saprofítica, com retirada de nutrientes de células mortas. Tais organismos se caracterizam por um grande arsenal de enzimas extracelulares que causam maceração dos tecidos, por apresentarem atividade toxigênica e também por, geralmente, possuírem baixa especificidade por hospedeiros, o que, geralmente, reflete em um maior gama de hospedeiros (Amorim *et al.*, 1995).

Dentro deste contexto, a parede celular das plantas representa tanto uma primeira barreira à penetração, quanto uma barreira à disponibilização de nutrientes presentes no protoplasma celular ou mesmo pode ser um substrato a ser utilizado para o desenvolvimento do patógeno. Uma vez que os fitopatógenos devem, repetidamente, encontrar e penetrar a parede celular, eles produzem grande variedade de enzimas que atuam na degradação de seus componentes. Um entendimento mínimo da estrutura e composição da parede celular torna-se assim um pré-requisito para a avaliação da importância das enzimas que degradam a parede celular na penetração, colonização e na aquisição de nutrientes.

As paredes celulares vegetais são, química e estruturalmente, complexas e, de maneira geral, divididas em 3 regiões estruturais: lamela média, que compreende a região entre as paredes celulares vizinhas; parede primária, localizada entre a membrana plasmática e a lamela média; e a parede secundária, localizada internamente à parede primária, formada após o término do crescimento celular (Amorin *et al.*, 1995).

A parede primária, embora possua de 20-30% de celulose, caracteriza-se por ser constituída principalmente de polissacarídeos pécticos, à semelhança da lamela média. Já a parede secundária é constituída quase exclusivamente de celulose e em alguns tecidos, como endoderme e xilema, a parede celular pode possuir outros polímeros como suberina ou lignina, respectivamente. Uma representação esquemática da parede celular e a distribuição quantitativa de seus principais componentes estão demonstradas na Figura 1.

Os polímeros pécticos correspondem a 34% da massa da parede celular (Goodman *et al.*, 1986) e são considerados como “cimento celular”, por manterem coesas as células vegetais (Amorim *et al.*, 1995). De acordo com Albersheim (1975), os polímeros pécticos se ligam, covalentemente, às xiloglicanas (hemiceluloses), que por sua vez se ligam às fibras de celulose por meio de pontes de hidrogênio.

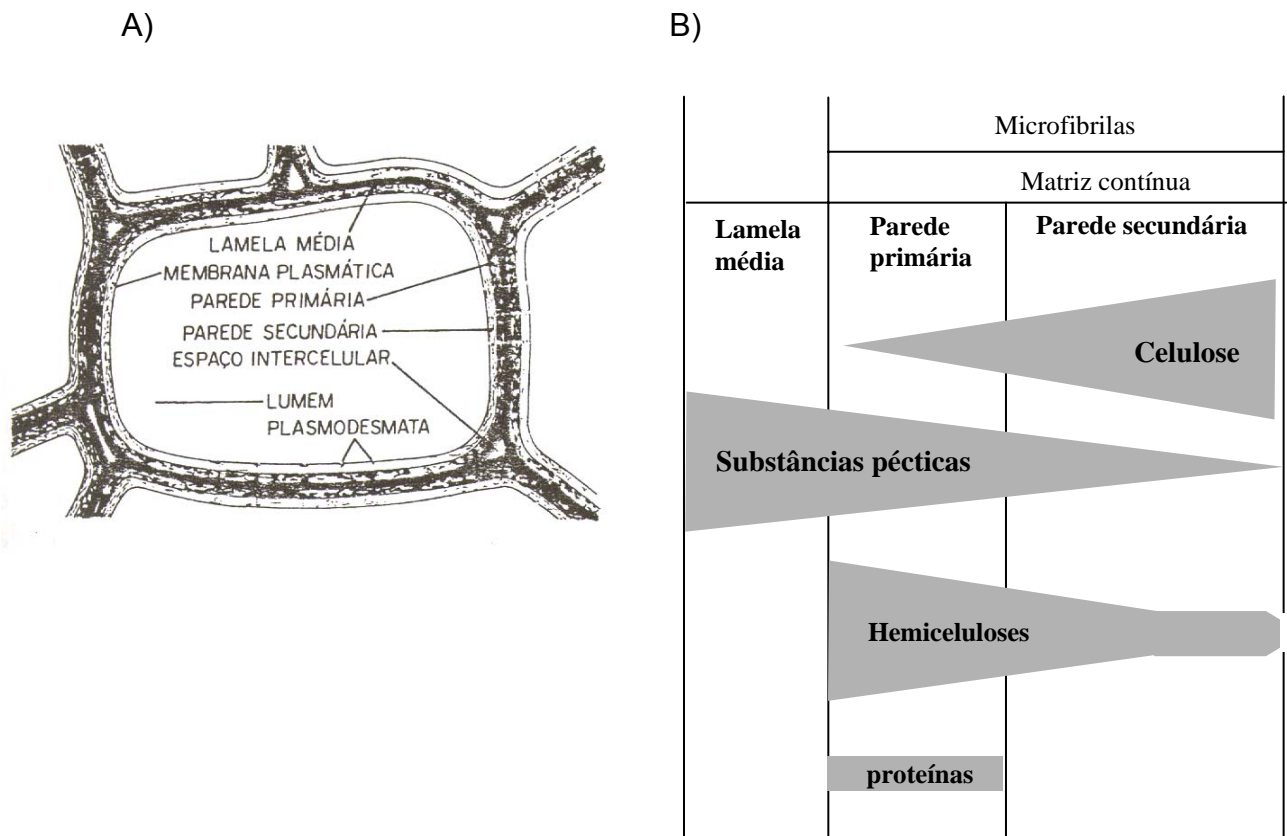


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura básica (A) e distribuição dos principais componentes (B) das paredes celulares vegetais. Adaptado de Amorin (1995).

Os polímeros pécicos, ou simplesmente pectina, são polissacarídeos formados por longas cadeias de ácido D-galacturônico, ligados entre si por ligações glicosídicas α -1,4 e inter espaçados por resíduos de L-ramnose, ligados entre si por ligações glicosídicas α -1,2 (Benen *et al.*, 2000). A pectina possui duas diferentes regiões, como demonstrado na Figura 2. A cadeia principal, sem ramificações, denominada de homogalacturanas, é caracterizada apenas pelos resíduos de ácido D-galacturônico (Herron *et al.*, 2000). As homogalacturanas podem ser metilados no carbono 6 ou acetilados, nos oxigênios 2 ou 3 (Vidal *et al.*, 2000). A outra região é composta pelos resíduos de ácido D-galacturônico intercalados com resíduos de L-ramnose altamente ramificado e é denominada de ramnogalacturanas.

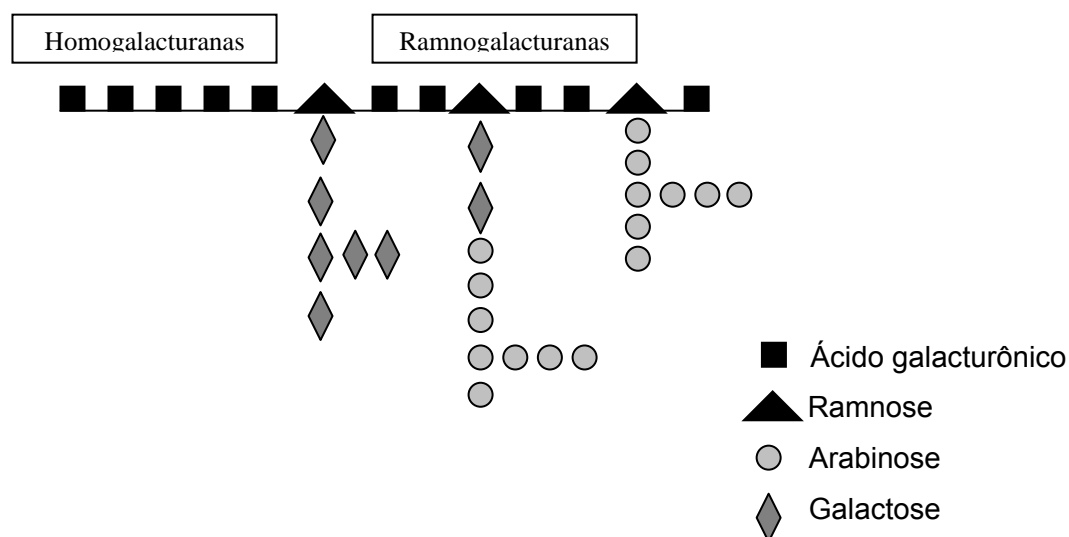


Figura 2 – Representação simplificada das regiões encontradas na molécula de pectina (adaptado de de Vries e Visser, 2001; Korner *et al.*, 1998).

Com base nos resíduos de açúcares que formam as cadeias laterais, as ramnogalacturanas (RG) podem ser classificadas em RG I e RG II. Na RG I as cadeias de ácido galacturônico são interrompidas pelos resíduos de ramnose, onde longas cadeias de arabinanas (L-arabinose, unidos por ligações α -1,5) e galactanos (D-galactose, unidos por ligações β -1,4), se ligam ao oxigênio 4. A RG I pode representar de 7-14% da parede celular (Schols e Voragen, 1994). A RG II consiste da cadeia principal de ácido D-galacturônico com 4 cadeias laterais. Os componentes de tais cadeias laterais já foram determinados e têm em comum açúcares raros, como 2-o-metil-L-frutose, 3-deoxi-D-mano-2-ácido octulosônico, entre outros; entretanto como RG II se liga à cadeia principal de pectina permanece desconhecido (Herve du Penhoart *et al.*, 1999).

Para a degradação da parede celular, microrganismos saprófitas e fitopatogênicos possuem inúmeras enzimas extracelulares (Quadro 2). Como a pectina é o componente mais abundante da parede celular, as enzimas pecticas ou pectinolíticas são consideradas como o mais importante grupo de enzimas degradadoras de parede produzidas por fungos fitopatogênicos (Lebeda *et al.*, 2001).

Quadro 2 – Principais grupos de enzimas, produzidas por fungos, que degradam parede celular.

Enzimas
Enzimas pectinolíticas
<p>Hidrolases Endopoligalacturonase Exopoligalacturonase Ramonogalacturonase</p> <p>Liases Endopectato liase Exopectato liase Endopectina liase Exopectina liase</p> <p>Esterases Pectinametilsterase Ramnogalacturana acetilsterase</p>
Celulases
Endo- β - 1,4-glucanase (carboximetilcelulase) Exo- β - 1,4-glucanase Endo - β - 1,4-glucan celobiohidrolase β -glucosidase
Depolimerases para matriz de polissacarídeos
Endo- α -1,5-arabinase α -L-arabinofuranosidase Endo - β - 1,4-xilanase β - xilosidase Endo- β - 1,4-glucanase Exo- β -1,4-glucanase β -glucosidase Exo- β -1,3-glucanase (laminarase) Exo- β -1,3-1,6-glucanase (cinereanase/laminarase) Endo- β -1,6-glucanase β -1,4-galactanase α -galactosidase

Fonte: Lebeda *et al.* (2001)

As celulases são raramente correlacionadas com a patogênese, pois, usualmente, aparecem durante os últimos estádios da infecção. A natureza insolúvel e a localização podem explicar a infreqüente participação de celulases na patogênese (Cooper, 1983). Enzimas como cutinases, que

degradam a cutina presente nas superfícies das plantas, são sugeridas como fator de patogenicidade em fungos que necessitam penetrar diretamente através da superfície do hospedeiro (Idnurm e Howlett, 2001). Muitos estudos, envolvendo expressão heteróloga, inativação de genes e inibição por anticorpos, têm avaliado o papel de cutinases na patogenicidade, entretanto, estes experimentos não foram conclusivos ou refutaram tal hipótese (Shaykh *et al.*, 1977; Koller *et al.*, 1982; Kolattukudy, 1985; Stahl e Schafer, 1992; Rogers *et al.*, 1994; Koller *et al.*, 1995; van Kan *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 2000).

As enzimas pectinolíticas podem ser classificadas em hidrolases, liases e esterases, de acordo com o substrato e mecanismo de ação; e também subdivididas em formas que reconhecem regiões internas da cadeia (endo-) ou regiões terminais (exo-) (Cooper, 1983). Nas duas principais classes, hidrolases e liases, são encontradas enzimas específicas para homogalacturanas, como pectato liase (PL), pectina liase (PNL) e poligalacturonases (PG) e enzimas específicas para ramnogalacturanas, como ramnogalacturanas liases e ramnogalacturonases. As hidrolases, como poligalacturonases, incorporam uma molécula de água durante a clivagem das ligações glicosídicas entre os ácidos galacturônicos (Figura 3A), já as liases, pectina e pectato liase, clivam as ligações glicosídicas via reação de β -eliminação (Figura 3B). As esterases incluem enzimas que atuam sobre os grupos metil e etil presentes na pectina (Figura 3C) (Benen *et al.*, 2000). A pectinametilesterase (PME) hidrolisa as ligações éster dos grupos metil da pectina, produzindo metanol e ácido poligalacturônico, e reduzindo assim o grau de esterificação (Gert-Van *et al.*, 2003). Sua atividade é considerada muito importante para a completa degradação da pectina por PGs e PLs, uma vez que estas enzimas não são capazes de reconhecer e clivar pectina metil-esterificada (Christgau *et al.*, 1996).

A enzima pectina liase tem como substrato moléculas de pectina altamente esterificadas, enquanto pectato liases são específicas para moléculas de pectato, a forma não metilada da pectina (Wattad *et al.*, 1997; Scavetta *et al.*, 1999). Entretanto, recentemente, Soriano *et al.* (2006) demonstraram que pectato liase C de *Bacillus subtilis* é capaz de atuar sobre pectinas com grau de esterificação variando de 22 a 89%. Uma outra característica que distingue pectina e pectato liase é o requerimento desta última por íons cálcio para sua atividade catalítica (Scavetta *et al.*, 1999).

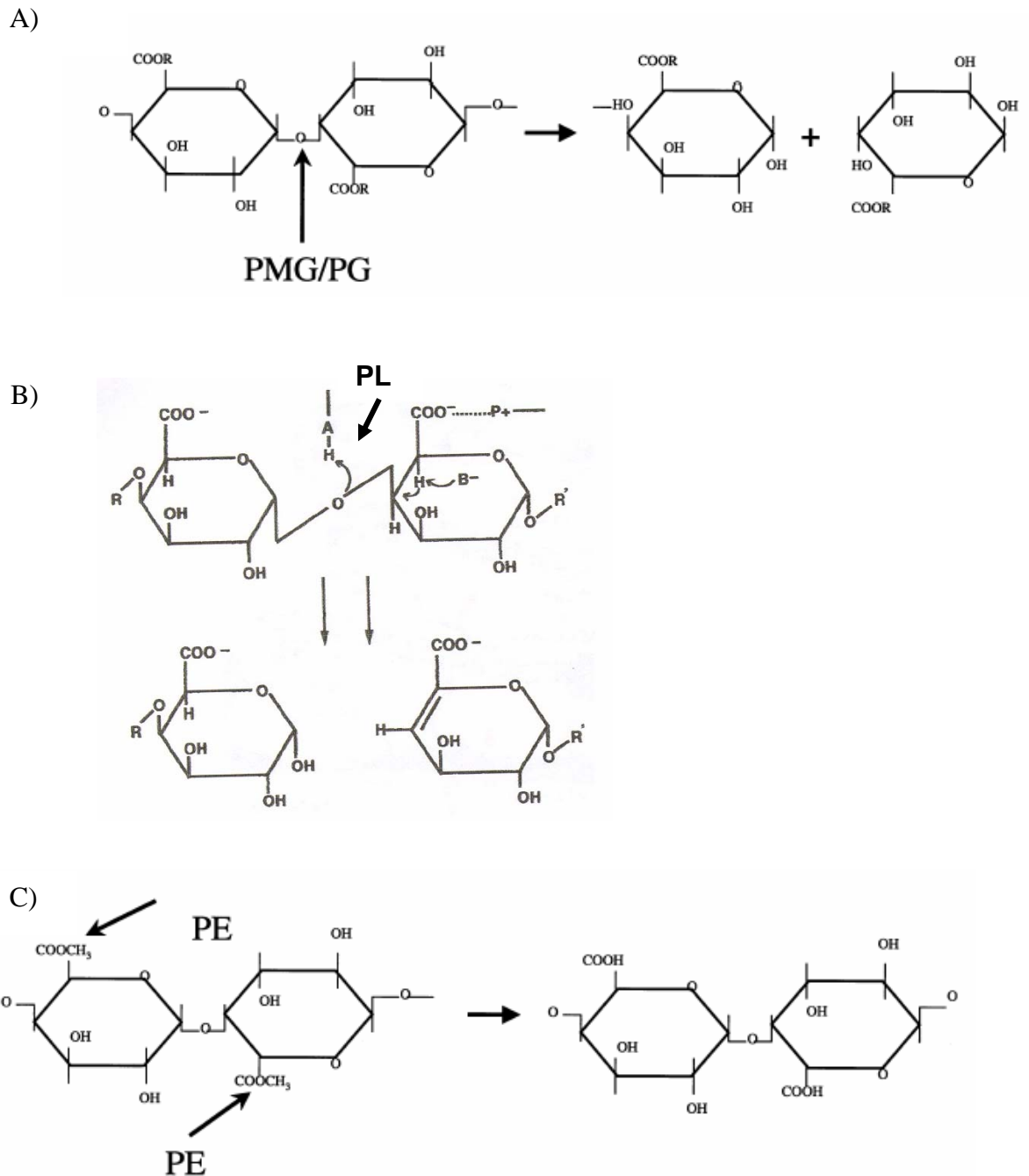


Figura 3 - Diferentes pectinases e modo de ação sobre pectina. (A) Polimetilgalacturonase (PGM) e poligalacturase (PG) (Adaptado de Sathyanarayana *et al.*, 2003). (B) Mecanismo de β -eliminação proposto para as enzimas pectina e pectato liases, que são esperadas contribuir com pelo menos 3 grupos: P^+ , o qual neutraliza a carga do grupo carboxílico; B, uma base que retira um próton do C5; e A, o qual está envolvido na transferência do próton (H^+) para o oxigênio, levando à formação de dupla ligação entre os C4 e C5 (Adaptado de Herron *et al.*, 2000). (C) Pectinesterases (PE) (Adaptado de Sathyanarayana *et al.*, 2003).

Embora o cálcio se ligue diretamente à enzima, seu papel na reação de clivagem ainda não está esclarecido; entretanto é sugerida sua participação como elemento estrutural, alinhando os aminoácidos no sítio catalítico ou como agente neutralizante das cargas negativas do substrato (Scavetta *et al.*, 1999).

As estruturas tridimensionais de pectato liase de diferentes microrganismos já foram descritas, como para as diferentes pectato liases bacterianas, PELC e PELE de *Erwinia chrysanthemi* (Kim *et al.*, 1989; Lietzke *et al.*, 1994) e pectato liase de *B. subtilis* (Pickersgill *et al.*, 1994). Todas estas enzimas compartilham uma estrutura não usual, a “ β -hélice paralela”, no qual fitas β são formadas em uma super-hélice voltada para a direita (Yoder *et al.*, 1993). A estrutura em “ β -hélice paralela” também foi encontrada em 2 pectina liases de *A. niger*, PLA (Mayans *et al.*, 1997) e PLB (Vitali *et al.*, 1998) e em outras enzimas pectinolíticas, como ramnogalacturonase de *A. aculeatus* (Petersen *et al.*, 1997) e poligalacturonase de *A. niger* (van Santen *et al.*, 1999).

O alinhamento múltiplo de várias proteínas relacionadas a pectato liase revelou a presença de potenciais sítios catalíticos, como resíduos conservados de aminoácidos, não só em torno do sítio de ligação do íon cálcio, bem como em uma região denominada vWiDH, presente no centro da “ β -hélice paralela” (Heffron *et al.*, 1995; Henrissat *et al.*, 1995). Mutações sítio direcionadas realizadas em *pelC* de *E. chrysanthemi* demonstraram que a função pectinolítica envolve os aminoácidos próximos ao sítio de ligação do cálcio, e não as seqüências de aminoácidos vWiDH (Kita *et al.*, 1996). Os mesmos autores sugerem que a seqüência vWiDH está envolvida com a secreção ou montagem da proteína no periplasma, uma vez que enzimas com mutações nesta região permaneceram associadas à membrana plasmática bacteriana e foram pobremente exportadas para o periplasma.

Sugere-se que morte celular observada durante a patogênese ocorra principalmente pela ação de endopoligalacturonases e endopectato liases, que ocasionam separação das células ou maceração, devido à destruição da integridade estrutural da lamela média. A desestruturação e enfraquecimento da parede celular, provocadas pela ação destas enzimas, ocasionariam alterações irreversíveis na permeabilidade seletiva da membrana plasmática e, conseqüentemente, a morte celular (Amorin *et al.*, 1995).

2.2. ENZIMAS PECTINOLÍTICAS COMO FATORES DE PATOGENICIDADE EM FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

O papel das enzimas pectinolíticas vem sendo extensivamente avaliado para determinar se estas atuam como fatores de patogenicidade em diferentes sistemas planta-patógeno. Nesta revisão, a definição de genes ou fatores de patogenicidade é o mesmo adotado por Idnurm e Howlett (2001), que os definiram como “genes necessários para o desenvolvimento da doença, mas não essencial para o patógeno completar seu ciclo de vida *in vitro*”. Tradicionalmente, o papel de enzimas pectinolíticas na patogenicidade era investigado por meio da purificação, caracterização e avaliação do efeito destas enzimas purificadas sobre células vegetais; entretanto estes métodos não resultaram em quaisquer conclusões definitivas, e atualmente novas e mais conclusivas abordagens na avaliação do papel destas enzimas na patogenicidade envolvem o uso de técnicas de DNA recombinante.

Embora existam muitas informações sobre o papel de pectinases como fator de virulência em doenças causadas por bactérias (Kelemu e Collmer, 1993; Lojkowska *et al.*, 1995), a primeira evidência molecular para o envolvimento de uma enzima pectinolítica de fungo na patogenicidade ocorreu quando Shieh *et al.* (1997) demonstraram que a poligalacturonase P2c de *Aspergillus flavus* contribui para a invasão e colonização do algodoeiro. Desde então, já foi demonstrado que poligalacturonases são requeridas para total virulência de *Botrytis cinerea* em diferentes hospedeiros (ten Have *et al.*, 1998) e de *Alternaria citri* em frutos cítricos (Isshiki *et al.*, 2000). Mutantes não patogênicos de *Claviceps purpurea*, cujo gene que codifica poligalacturonase foi inativado, tiveram a patogenicidade em arroz restaurada pela complementação com cópias do gene selvagem (Oeser *et al.*, 2002).

Também foi demonstrado que pectato liase é um fator de patogenicidade requerido para a infecção de *Pisum sativum* por *N. hematococca* (Rogers *et al.*, 2000). A inativação do gene *peIA* (induzido por pectina) ou *peID* (induzido pela planta) resultou em mutantes ainda patogênicos, mas a inativação de ambos os genes resultou em mutantes com reduzida patogenicidade. A inativação de *peIB* em *C. gloeosporioides* também resultou em mutantes com reduzida patogenicidade em frutos de abacate e a expressão heteróloga do gene *peIB*

em *C. magma* promoveu a patogenicidade deste fungo em frutos de abacate (Yakoby *et al.* 2000; Yakoby *et al.*, 2001).

Poucas PME's têm sido purificadas e caracterizadas até o presente momento e os principais grupos de microrganismos em que as PME's têm sido estudadas incluem bactérias, como *Erwinia*, fungos, como *Aspergillus* sp e *Botrytis*, e algumas leveduras (Christgau *et al.*, 1996; Gert-Van *et al.*, 2003). Como a atividade de PME é requerida para atividade de enzimas como PG e PL, sua importância na patogenicidade de fungos fitopatogênicos não pode ser descartada. Em *B. cinerea* a inativação do gene *Bcpme1*, que codifica uma pectinametilesterase, reduziu a patogenicidade em várias plantas hospedeiras, demonstrando que *Bcpme1* é importante determinante de patogenicidade (Vallete-Collet *et al.*, 2003).

Em alguns fungos, entretanto, a inativação destes genes não afetou a patogenicidade, como demonstrado para os genes que codificam poligalacturonases em *Cochliobolus carbonum* (Scott-Craig *et al.*, 1990; 1998), em *Cryphonectria parasitica* (Gao *et al.*, 1996) e em *Penicillium oilskin* (Wagner *et al.*, 2000). Pectina liase também não é requerida para a patogenicidade de *C. carbonum* em milho (Bowen *et al.*, 1995).

Entretanto, deve ser ressaltado que o fato destas enzimas serem, em sua maioria, codificadas por famílias multigênicas ou por mais de um gene não correlacionado e, também, pela atuação muitas vezes sinérgica de diferentes enzimas, dificulta a comprovação do seu papel na patogenicidade, uma vez que a inativação de um determinado gene pode não ter efeito na patogenicidade, pois outros genes podem mascarar sua inatividade (Lebeda *et al.*, 2001; Willians *et al.*, 2002). Em *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* a inativação de dois genes que codificam endopoligalacturonases e um gene que codifica uma exopoligalacturonase, expressos durante a infecção, não teve qualquer efeito detectável na virulência sobre plantas de tomate. Estes mutantes exibiam ainda alguma atividade extracelular de poligalacturonase, embora reduzida em comparação com o selvagem, o que sugere a presença de genes adicionais no genoma de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (García-Maceira *et al.*, 2001).

Muitos dos genes que codificam enzimas pectinolíticas em fungos fitopatogênicos já foram clonados, caracterizados e tiveram sua expressão em condições de cultura e de infecção avaliada (Guo *et al.*, 1995a; Guo *et al.*,

1995b; Centis *et al.*, 1996; Wubben *et al.*, 2000; Cano-Canchola *et al.*, 2000; Willians *et al.*, 2002). Em espécies do gênero *Colletotrichum* sp., um fungo hemibiotrófico, o desenvolvimento da fase necrotrófica está intimamente relacionado a um aumento na expressão de enzimas como endopoligalacturonases e pectina liases (Perfect *et al.*, 1999; Shih *et al.*, 2000).

Os mecanismos que regulam a expressão das enzimas pectinolíticas em fungos saprófitas ou fitopatogênicos são invariavelmente complexos, pois estão relacionados a um ou mais fatores como fontes de carbono e nitrogênio, pH ou mesmo pelo modo de infecção e colonização. Fungos modelos, como *A. nidulans* e *A. niger*, já tiveram a expressão dos genes que codificam pectinases avaliada nas mais diversas condições (Dean e Timberlake, 1989a, 1989b; Kusters-van *et al.*, 1991; Faowle e Odunfa, 2003; Flipphi *et al.*, 2003; Panda *et al.*, 2004). Geralmente esses genes são induzidos por pectina ou outros compostos pécticos e reprimidos por fontes de carbono, prontamente metabolizáveis, como glicose e sacarose. Tanto em *A. nidulans*, quanto *A. niger*, os genes são regulados por repressão catabólica, uma vez que na presença de glicose os mRNAs específicos não são identificados, enquanto na presença de pectina, altos níveis de transcrito e de atividade enzimática são detectados (Dean e Timberlake, 1989a; Kusters-van *et al.*, 1991). O perfil de expressão de 26 genes que codificam enzimas pectinolíticas em *A. niger* revelou que, com exceção de feroil esterase, todos os genes são induzidos por ácido galacturônico, pectina e/ou ácido poligalacturônico (de Vries *et al.*, 2001).

A repressão catabólica tem sido proposta como a explicação para o crescimento difásico de alguns hemibiotróficos; como por exemplo, durante a infecção inicial do feijão por *C. lindemuthianum*, onde poucos sintomas são visíveis. No entanto a subsequente maceração dos tecidos, quando ocorre o início da fase saprofítica, foi correlacionada com aumento na produção de enzimas pectinolíticas (Wijesundera *et al.*, 1984; Perfect *et al.*, 1999; Shih *et al.*, 2000). Enquanto a expressão destes genes em fungos biotróficos e hemibiotróficos pode depender do controle por repressão catabólica, em fungos necrotróficos, como *B. alli* e *Rhizoctonia solani*, a produção de enzimas pectinolíticas ocorre no início da infecção ou mesmo a precede, sugerindo que para alguns patógenos é possível evitar a repressão catabólica (Cooper, 1983; Marcus *et al.*, 1986). A expressão constitutiva de genes pectinolíticos também já foi descrita em vários outros fungos, como, por exemplo, em três genes que

codificam poligalacturonases em *A. alliaceus* (Mikhailova *et al.*, 2000) e dois genes que codificam poligalacturonases de *A. niger* (Parenicova *et al.*, 2000). Dos quatro genes que codificam pectato liase em *F. solani* f. sp. *pisi*, o gene *pelB* foi expresso em todas as fontes de carbono avaliadas (Guo *et al.*, 1995a) e entre dois genes, *pel-1* e *pel-2*, isolados de *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae*, o gene *pel-2* foi expresso em meio de cultura contendo glicose (Shih *et al.*, 2000).

Além destas evidências de que a regulação em nível de transcrição possa variar de acordo com a estratégia de patogênese, existem evidências de que em patógenos biotróficos ocorre também regulação em nível de atividade enzimática. A restrição da atividade destas enzimas aos sítios de infecção, por meio de imobilização por interações iônicas com a parede celular, pode ser uma estratégia para evitar sua difusão através da matriz e assim uma extensa maceração dos tecidos vegetais e, conseqüentemente, a morte celular, bem como uma estratégia de controle sobre os oligouronídeos gerados, que poderiam atuar como elicitores de respostas de defesa (Mendgen *et al.*, 1996).

Diferenças no padrão de regulação destes genes também são encontradas quando se avalia a expressão *in vitro* e *in vivo* (planta). Quatro genes que codificam pectato liase foram clonados em *F. solani* f. sp. *pisi* - *peIA*, *peIB*, *peIC* e *peID* – que possuem as seguintes características: *peIA* é induzido por pectina, reprimido por repressão catabólica e é expresso nos primeiros estádios da doença; *peIB* é constitutivamente expresso em baixos níveis, não responde a repressão catabólica e atuaria gerando oligouronídeos que induzem *peIA*; *peIC* codifica, provavelmente, uma pectato liase intracelular que atuaria degradando oligouronídeos gerados, com o objetivo de evitar a indução de resposta de defesa da planta e *peID* é expresso somente na planta após o estabelecimento da colonização (Guo *et al.*, 1996; Rogers *et al.*, 2000). Por serem induzíveis, os genes *peIA* e *peID* foram selecionados como candidatos à fatores de patogenicidade e a inativação de ambos os genes gerou mutantes com patogenicidade alterada, provando que pectato liase é fator de patogenicidade em *F. solani* f. sp. *pisi* (Rogers *et al.* 2000).

Existem alguns exemplos de genes, assim como *peID* de *F. solani*, que são expressos somente na planta e em determinados estádios da doença, e os sinais da planta envolvidos em tais induções são os aspectos menos compreendidos do processos de infecção. Recentemente, Yang *et al.* (2005)

identificaram os sinais indutores da expressão de *pelD* como sendo homoserina e asparagina, dois aminoácidos unicamente encontrados em grande quantidade em mudas de ervilhas.

Os genes que codificam pectato liase (*pel-1* e *pel-2*) e o gene que codifica poligalacturonase de *C. gloeosporioides* tiveram suas expressões comparadas em cultura e durante a infecção necrotrófica (Shih *et al.*, 2000). Transcritos de *pel-1* e *pel-2* e PG foram detectados em culturas contendo pectina ou extrato de planta e, interessantemente, transcritos de *pel-2* também foram detectados em meio de cultura contendo glicose. Na planta apenas transcritos de *pel-2* foram detectados no início da fase necrotrófica, o que sugere que este gene está associado com a maceração dos tecidos, observadas ao final da fase biotrófica, e que não é reprimido pelos açúcares liberados durante a infecção. Além de *pel-2* de *C. gloeosporioides* e *pelB* de *F. solani* f. sp. *pisi*, existem outros exemplos onde genes que codificam enzimas pectinolíticas, expressos durante a infecção, não estão sujeitos a repressão catabólica, como *P2c* de *A. flavus* e *Bcpg 1* de *B. cinerea* (Guo *et al.*, 1995a; Shieh *et al.*, 1997; ten Have *et al.*, 1998; Shih *et al.*, 2000).

Cano-Canchola *et al.* (2000), relatam diferenças no nível de expressão de genes que codificam pectato liase, poligalacturonase e celulase em *Ustilago maydis*, quando diferentes partes da planta *Zea mays* são fornecidas como substratos. Os autores relatam também que a indução das enzimas é seqüencial e, provavelmente, está sob um complexo mecanismo de regulação. Os primeiros estádios da doença, que correspondem a clorose dos tecidos, correlacionam-se com alta atividade de pectato liase, posteriormente tem-se a expressão de poligalacturonase e, finalmente, o surgimento das galhas coincide com a máxima atividade de celulase.

O pH é outro fator que claramente regula a expressão de diferentes enzimas pectinolíticas e também de isoformas que são codificadas por famílias multigênicas (Wubben *et al.*, 2000). O pH é uma das principais características ambientais que podem determinar o sucesso do patógeno em colonizar seu hospedeiro (Prusky e Yakoby, 2003). O pH não só faz parte do complexo sistema de regulação da expressão de genes, como também pode determinar a secreção de enzimas. Os patógenos muitas vezes possuem também a habilidade de, ativamente, aumentar ou diminuir o pH ao seu redor, para valores que melhor se ajustem ao seu arsenal de fatores de patogenicidade.

Um efeito do pH observado em *A. nidulans* e em muitos outros fungos é a expressão preferencial de poligalacturonases a baixos valores de pH e de pectato liase em altos valores de pH (Dean e Timberlake, 1989b; Wubben *et al.*, 2000). Em *A. nidulans*, as maiores atividades de PG foram observadas em valores de pH de 4 a 6, e as atividades de pectato liase foram maiores em valores de pH igual a 7, atingindo o máximo em pH igual a 9.

A capacidade de um patógeno alterar o pH externo é considerada importante determinante de patogenicidade em alguns fungos fitopatogênicos (Prusky *et al.*, 2001). Evidências de que o pH dos tecidos infectados afeta a expressão destes genes foram fornecidas por Prusky *et al.* (2001) que relatam a produção de altos níveis de NH_4^+ por *C. gloeosporioides*, como mecanismo de alcalinização dos tecidos e Kramer-Haimovich *et al.* (2006) que sugerem que esta alcalinização dos tecidos durante a infecção por *C. gloeosporioides* induz a expressão de *pelB* e está, intimamente, relacionada com a mudança da fase biotrófica para necrotrófica. O gene *pelB* de *C. gloeosporioides* codifica uma pectato liase, que juntamente com a habilidade deste patógeno de produzir NH_4^+ , são considerados fatores de virulência durante a colonização de frutos de abacate e, interessantemente, a patogenicidade é dependente de sua habilidade de secretar PL em determinado pH e não somente da expressão do gene *pelB* (Yakoby *et al.*, 2000; Drori *et al.*, 2003). Mutantes Nit de *C. gloeosporioides*, os quais não podem utilizar KNO_3 como fonte de nitrogênio, não secretam amônia, não alcalinizam o meio e não secretam pectato liase (Kramer-Haimovich *et al.*, 2006). Eshel *et al.* (2002) também verificaram que NH_4^+ regula a expressão de endopoligalacturonases e a virulência de *A. alternata*.

No fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, a secreção de poligalacturonase, codificada pelo gene *pgl3* e a redução do pH externo, por meio da produção de ácido oxálico, são também considerados importantes determinantes da patogenicidade (Cotton *et al.*, 2003). A transcrição do gene *pgl3* não é regulada por carbono, característica de muitos fungos necrotróficos, mas estritamente controlada pelo pH. Duas funções são sugeridas para o ácido oxálico durante a patogênese: 1) acidificação do meio externo, que criaria condições de pH que favorecem a ativação da transcrição e a atividade enzimática de poligalacturonases e, 2) atuação como agente quelante de íons Ca^{+2} , o que

enfraqueceria os polímeros pécticos, favorecendo o acesso das enzimas aos seus substratos (Cotton *et al.*, 2003).

Alguns fatores de transcrição como CreA, envolvido na repressão catabólica, e PacC, que regula a expressão de genes dependentes de pH, atuando como ativador de genes expressos em pH externo alcalinos e repressor de genes que são expressos em pH externo ácido, já foram clonados e suas seqüências alvos nos promotores determinadas (Cubero e Scazzocchio, 1994; Tilburn *et al.*, 1995; Maccabe *et al.*, 1996). Seqüências consenso para reconhecimento de CreA (5' SYGGRG 3') e de PacC (5' GCCARG 3') estão presentes nos promotores de genes que codificam endopoligalacturonase em *B. cinerea* (Wubben *et al.*, 2000). No promotor do gene *peIB* de *C. gloeosporioides* foram detectados nove seqüências consenso putativas para ligação de *Pac1* (homólogo a PacC de *A. nidulans*) e os níveis de transcritos de *Pac1* e *peIB* aumentaram em função do pH (Drori *et al.*, 2003; Kramer-Haimovich *et al.*, 2006).

A importância das enzimas pectinolíticas é evidenciada não somente pelos experimentos de inativação gênica, mas também pelo fato de que plantas superiores possuem um sistema de defesa especial contra este tipo de enzimas: as proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs) (Cervone *et al.* 1987). Tais proteínas, sintetizadas pelas plantas no início da infecção, não apenas retardam as funções das poligacturonases (PG), prevenindo a degradação da parede e limitando o crescimento do fungo e a colonização dos tecidos, como também previnem a completa degradação dos oligouronídeos gerados, que atuam como elicitores de resposta de defesa da planta (Cervone *et al.* 1987; Lorenzo e Ferrari, 2002; Oeser *et al.* 2002). A hipótese de que a interação PG-PGIP atue como sistema de reconhecimento, e não somente como complexo inibidor-enzima, é sugerido pelo fato de que a ação de endoPG purificada de *C. lindemuthianum* induz a síntese de proteínas de defesa com a mesma especificidade do próprio fungo, ou seja, no sistema *C. lindemuthianum*-feijoeiro o efeito da interação pode ser uma fenocópia da interação entre gene R da planta com gene *avr* do patógeno (Esquerrè-Tugayè *et al.*, 2000). Considerando a localização central da pectina na parede, a ampla ocorrência de endoPG, bem como de PGIP's, é provável que a interação PG-PGIP aplique-se a muitos sistemas patogênicos. Portanto, a expressão heteróloga de diferentes PGPI's poderia aumentar a resistência de uma planta

contra patógenos específicos, como demonstrado em tomates que, expressando o gene que codifica PGIP em pereiras, tiveram resistência contra *B. cinerea* aumentada (Powell *et al.*, 2002). Um decréscimo na suscetibilidade a este fungo também foi observada em plantas de *Arabidopsis* e tabaco super expressando genes que codificam PGIP (Lorenzo e Ferrari *et al.*, 2002).

As PGPI's são membros das famílias de proteínas ricas em repetições de leucina (LRR – Leucine Rich Repeat), uma característica encontrada em muitas proteínas que fazem interações proteína-proteína e ligante-receptor, que muitas vezes estão relacionadas com funções de transdução de sinal (Kosak e Jones, 2000; Di Matteo *et al.*, 2003). As informações estruturais obtidas a partir de estudos de cristalografia têm fornecido importantes bases moleculares para o entendimento de como as PGPI's interagem e inibem as PG's, compreensão de como as PG's das plantas não são afetadas pelas próprias PGIP's e, principalmente, pelo fato de que estas informações poderão ser utilizadas para o *design* de inibidores mais eficientes e para o entendimento e modelagem de outras proteínas LRR (Esquerrè-Tugayè *et al.*, 2000; Federici *et al.*, 2001; Lorenzo e Ferrari, 2002; Di Matteo *et al.*, 2003).

Qin *et al.* (2003) fizeram o primeiro relato de uma proteína, denominada XEGIP, isolada de tomate, que atua inibindo a atividade uma endoglucanase específica para xiloglucanas produzida por *A. aculeatus*. Embora não tenha sido relatada na literatura a identificação de proteínas inibidoras de pectato liase produzidas por plantas, a possibilidade de que elas existam e que possam atuar como mecanismo de resistência, não pode ser descartada. Entretanto, a existência de outros inibidores específicos não protéicos, como fitoalexinas, produzidos pela própria planta foi relatada. A primeira evidência do potencial da utilização destes genes no aumento de resistência à doença em plantas transgênicas, foi fornecida por Hain *et al.* (1993), onde plantas de tabaco, expressando genes envolvidos na biossíntese de fitoalexinas de videiras foram resistentes à infecção por diferentes fungos fitopatogênicos. Em *C. gloeosporioides*, epicatequina, uma fitoalexina produzida por abacate, foi o primeiro inibidor de pectato liase encontrado em plantas (Wattad *et al.*, 1994).

2.3. O PATÓGENO: *Crinipellis perniciosa*

O fungo *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (Agaricales, Tricholomataceae, Marasmeae) é um destrutivo patógeno, causador da vassoura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao*), representando, atualmente, um dos principais fatores limitantes à produção de cacau na América do Sul e Ilhas do Caribe. Este fungo tem sido considerado o mais importante fitopatógeno do cacauero, que se desenvolveu ou evoluiu, concomitantemente, com *T. cacao* (Pound, 1943), ambos endêmicos da Bacia Amazônica (Griffith *et al.*, 1994). A vassoura-de-bruxa foi descrita pela primeira vez por Alexandre Rodrigues Ferreira, entre os anos de 1785 e 1787, que denominou as más formações ocorridas nas plantas de “lagartos”, porém a doença só se tornou conhecida para a ciência no começo deste século, quando os sintomas ocorridos no Suriname em 1895, foram descritos por Went em 1904 (Griffith *et al.*, 1994). Em 1915, Stahel denominou o patógeno de *Marasmius perniciosus* Stahel e, em 1942, Singer, revisando o gênero *Marasmius*, renomeou-o de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (Griffith *et al.*, 1994). O cacauero foi introduzido na Bahia em 1746, porém a doença só foi detectada no sul do Estado em 1989. Em 1994, *C. perniciosa* infectava mais de 40% das lavouras de cacau do sul da Bahia e em 1995 mais de 70% das lavouras estavam infectadas (Camargo e Filho, 1995). Hoje, encontra-se disseminada em todos os 600.000 hectares de cultivo, provocando uma perda de, aproximadamente, 60% da produção. Na Bahia, o fungo encontrou condições propícias para se desenvolver, pois neste Estado podem ocorrer até seis ciclos da doença por ano, enquanto na Amazônia, as plantas estão sujeitas a um ciclo por ano. A doença vassoura de bruxa foi inicialmente constatada na Bahia, em um intervalo de 6 meses, em duas cidades, Camacã e Uruçuca, distantes uma da outra em 120 Km (Dias, 2001).

O controle da vassoura-de-bruxa, correntemente, depende das podas fitossanitárias (Rudgard, 1987; Wheeler, 1987; Bastos, 2000), remoção de vassouras infectadas, nos quais os basidiocarpos se formarão (Anderbrahn *et al.*, 1995), aplicação de fungicidas e seleção de plantas resistentes. Para a lavoura cacauera no sul da Bahia, por exemplo, a melhor solução tem sido a seleção, realizada pela CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), de cultivares resistentes a partir de germoplasmas selvagens, uma

vez que a adoção de práticas de podas fitossanitárias e a aplicação de fungicidas cúpricos recomendados não são suficientes para restringir o desenvolvimento da doença (Camargo e Filho, 1995; Anderbrahn *et al.*, 1995).

Na literatura, são descritos diversos compostos químicos que vêm sendo testados, ou utilizados, com os objetivos de prevenir ou erradicar a doença, porém estes não têm sido bem sucedidos porque o rápido aumento da superfície dos frutos, durante os dois ou três meses de desenvolvimento, exigem aplicações freqüentes do fungicida, o que é, especialmente, difícil em árvores muito altas (McQuilken *et al.*, 1988; Camargo e Filho, 1995; Bastos, 1997; Soberanis *et al.*, 1999; Resende *et al.*, 2000). Um biofungicida, denominado TRICOVAB foi desenvolvido pela CEPLAC/CEPEC, a partir do fungo micoparasita *Trichoderma stromatium*, para o controle biológico de *C. pernicioso* e tem se mostrado muito promissor, reduzindo com eficiência a produção de basidiocarpos por *C. pernicioso* e o número de frutos infectados (Bastos, 2000). Com objetivo de também avaliar o uso potencial de endófitos do cacauzeiro como controle biológico deste patógeno, Rubini *et al.* (2005) identificaram, por características morfológicas e por análise do rDNA, várias espécies de fungos endófitos e encontraram um fungo, *Gliocladium catenulatum*, capaz de reduzir em 70% a incidência da doença em mudas de cacauzeiro.

Em função dos grandes prejuízos econômicos que a doença vassoura-de-bruxa do cacauzeiro (*T. cacao*) causa na produção brasileira de cacau e das dificuldades em se controlar a doença, *C. pernicioso* vem sendo alvo de estudos por muitos grupos de pesquisadores no Brasil. Tais estudos visam à identificação dos fatores, como aqueles envolvidos na variabilidade genética e na patogenicidade, que possam auxiliar no entendimento dos processos de patogênese, bem como no desenvolvimento de medidas realmente efetivas para o controle deste patógeno.

No ano de 2000 teve início o Projeto Genoma “Vassoura-de-bruxa”, (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura) cujo principal objetivo é sequenciar o genoma de um isolado do biótipo C de *C. pernicioso*. Espera-se que as informações geradas pelo sequenciamento auxiliem e acelerem a identificação de processos moleculares chaves e a busca de mecanismos para bloquear o desenvolvimento da doença. Os principais trabalhos publicados, ou que estão sendo desenvolvidos pelos pesquisadores, estão também relacionados,

principalmente, com o desenvolvimento de técnicas como obtenção e regeneração de protoplastos, transformação, isolamento de mutantes e transposons e construção, sequenciamento e análise de bancos de cDNA da interação planta-patógeno (Santos, 2001; Lima *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003; Ignacchiti *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2003; Pereira, 2005; Rincones *et al.*, 2003; Rincones *et al.*, 2006). Estes estudos são importantes não só para a manipulação genética do patógeno, mas para estudos de variabilidade genética, de cariótipo molecular e para a identificação e isolamento de genes importantes para a patogenicidade. Até o presente momento, nenhum fator de patogenicidade foi identificado em *C. pernicioso*, entretanto, a identificação destes fatores é o objetivo de diferentes pesquisadores. Estudos das alterações fisiológicas, bioquímicas e estruturais que ocorrem no micélio do fungo e nos tecidos das plantas durante a infecção também vêm sendo realizados (Motilal *et al.*, 2003; Kilaru e Hasenstein, 2005; Scarpari *et al.*, 2005). O estudo da variabilidade genética por meio marcadores moleculares, como RAPD, RFLP e ERIC-PCR, entre os diferentes biótipos de *C. pernicioso* é também um dos principais interesses de muitos pesquisadores e o que tem gerado maior número de publicações.

O gênero *Crinipellis* compreende, aproximadamente, 63 espécies que são, em sua grande maioria, saprófitas. A constatação de que *C. pernicioso* possui uma ampla cadeia de hospedeiros alternativos, sugere que esta espécie possui cinco biótipos (Griffith *et al.*, 2003): o *biótipo-C*, que causa vassoura-de-bruxa no cacauzeiro; o *biótipo-S*, causador de vassoura-de-bruxa em solanáceas; o *biótipo-B*, causador de vassoura-de-bruxa em *Bixa orellana*; o *biótipo-L*, cujos basidiocarpos já foram encontrados em *Arrabidaea verrucosa* (cipó), embora sem qualquer evidência de sintomas da doença (Evans, 1978; Hedger *et al.*, 1987) e, finalmente, biótipo H (Griffith *et al.*, 2003). O *biótipo H* foi, recentemente, incluído a partir da identificação por Resende *et al.* (2000), de um novo hospedeiro de *C. pernicioso* em Minas Gerais, a espécie *Heteropterys acutifolia*, pertencente à família Malpighiaceae. Basidiósporos, produzidos naturalmente neste hospedeiro, induziram o desenvolvimento de sintomas da doença em mudas de cacau altamente susceptíveis.

Exames detalhados dos basidiocarpos dos biótipos L, C, S e B, não revelaram quaisquer diferenças morfológicas relevantes, exceto para o tamanho ligeiramente maior e a cor mais escura do basidiocarpo do biótipo-L

(Hedger *et al.*, 1987). Vários estudos sobre a variabilidade genética entre os biótipos de *C. perniciosa* foram realizados com o objetivo de compreender as diferenças genéticas entre os diferentes biótipos, bem como onde a doença originou e como ela se espalhou.

Diversas análises, como polimorfismo de isoenzimas (Griffith, 1989), compatibilidade somática (McGeary e Wheeler, 1988; Griffith, 1989) e análises de DNA mitocondrial (Griffith *et al.*, 1994) sugerem que a variação genética entre e dentro isolados dos biótipos C e S é pequena. Estudos filogenéticos mais recentes suportam esta hipótese, como a análise de várias regiões do rDNA que revelaram maior identidade entre os biótipos C e S, enquanto os biótipos L e H formaram grupos isolados (J. Nicholson, dados não publicados, em Griffith *et al.*, 2003) e análise da região IGS (região do espaçador intergênico), realizada por Arruda *et al.* (2003b), que revelou que os biótipos S e C são, geneticamente, mais relacionados um com outro do que com os demais biótipos.

O polimorfismo genético entre as populações de biótipo C no Brasil, estudado por RAPD (Yamada *et al.*, 1998; Anderbrahn *et al.*, 1999) e, principalmente por ERIC-PCR (Arruda *et al.*, 2003a), demonstrou que os agrupamentos correlacionam-se não só com os tipos de biótipos, separando patógenos pertencentes ao biótipo-C daqueles isolados pertencentes ao biótipo S e H, mas também com a origem geográfica dos hospedeiros. Um grande número de isolados da Amazônia apresentaram similaridades, e foram agrupados com isolados da Bahia, sugerindo que as populações patogênicas na Bahia, possivelmente, originaram-se diretamente da região amazônica, e não de hospedeiros alternativos, como proposto por Evans e Barreto (1996), citado por Arruda *et al.* (2003a). Anderbrahn *et al.* (1999) sugere ainda que a ocorrência da vassoura-de-bruxa na Bahia foi devido à duas introduções independentes do patógeno neste Estado. Estes dados foram reforçados pela análise do cariótipo molecular realizado por Rincones *et al.* (2003, 2006), onde todos os isolados apresentaram 8 cromossomos; entretanto, um polimorfismo de tamanho dependente da origem do isolado foi observado.

A observação, por Delgado e Cook (1975), de que culturas monospóricas de basidiósporos produzem grampos de conexão, após a formação do micélio secundário, indicaram que *C. perniciosa*, biótipo-C, é uma espécie homotática e Purdy *et al.* (1983) confirmaram esta natureza

homotática, produzindo basidiocarpos a partir de culturas monospóricas de basidiósporos. Esta observação contribui com mais uma característica que torna *C. perniciosa* incomum entre os basidiomicetos, pois, segundo Lemke (1969), somente 1% das espécies de basidiomicetos são homotáticos.

De acordo com Griffith e Hedger (1993) para as espécies de basidiomicetos que não possuem um mecanismo de produção assexual de esporos, uma estratégia de reprodução por homotalismo primário, como de *C. perniciosa*, dissemina o genótipo parental e evita a necessidade de um cruzamento com um micélio primário compatível (monocário) antes da formação do basidiocarpo. No caso de *C. perniciosa* toda infecção de sucesso é potencialmente fértil, permitindo um rápido espalhamento clonal de novos basidiósporos.

Embora Alexopoulos *et al.*, (1996), afirmem que homotáticos primários não possuem sistema de *mating-type*, Cotomacci (2004), por meio de uma análise dos dados gerados no Banco de Dados do Projeto Genoma “Vassoura de Bruxa”, encontrou 6 genes do sistema *mating-type*, que apresentaram homologias com genes de basidiomicetos como *Coprinus cinereus*, *C. bilanatus*, *Schizophyllum comune* e *U. maydis*. Dois genes codificam proteínas regulatórias Hd1 e Hd2, e quatro genes codificam receptores de ferormônios Rc1, Rc2, Rc3 e Rc4, onde se concluiu que a organização molecular do sistema *mating-type* de *C. perniciosa* é tetrapolar. Genes que codificam os ferormônios não foram encontrados. Entretanto, estudos de expressão destes genes não foram realizados, exceto para o gene Rc3 cuja expressão constitutiva foi detectada por *microarray*. Embora *C. perniciosa* não utilize este sistema para promover *outbreeding*, é sugerido por Cotomacci (2004) que este sistema tem a função de promover e manter a fase dicariótica, bem como promover o início da formação do basidiocarpo.

O biótipo-C de *C. perniciosa* possui um ciclo de vida hemibiotrófico, com duas distintas fases de crescimento. O fungo invade os tecidos meristemáticos dos hospedeiros como um biotrófico, mas depois cresce saprofiticamente, sobre os tecidos mortos. A infecção inicia-se quando tubos germinativos dos basidiósporos penetram em tecidos merismáticos da planta, como brotos apicais, flores e frutos (Orchard *et al.*, 1994; Muse *et al.*, 1996). Silva e Matsuoka (1999) e Kilaru e Hasenstein (2005) observaram que os basidiósporos de *C. perniciosa* germinavam, emitindo tubos germinativos

longos e vigorosos, sem nenhuma orientação específica. Entretanto, Frias *et al.* (1991) reportaram um crescimento trópico dos tubos germinativos em direção aos estômatos. Silva e Matsuoka (1999), ocasionalmente, encontraram o tubo germinativo penetrando através dos estômatos, sem a formação de apressório; já Kilaru e Hasenstein (2005) observaram que hifas primárias são também capazes de penetração direta.

Após a penetração dos tubos germinativos entre as células dos meristemas jovens, o fungo inicia sua fase de crescimento biotrófico, denominado de fase primária (Orchard *et al.*, 1994; Muse *et al.*, 1996). Nesta fase o fungo cresce intercelularmente, suas hifas medem de 5 a 8 μm , são irregularmente espessas, monocarióticas, sem grampos de conexão (Evans, 1980; Calle *et al.*, 1982; Orchard *et al.*, 1994; Muse *et al.*, 1996; Silva e Matsuoka, 1999) e não formam haustórios (Silva e Matsuoka, 1999). Esta fase de crescimento biotrófico ou fase primária se caracteriza pela fase em que o fungo retira nutrientes da plantas alterando sua fisiologia e, conseqüentemente sua saúde, sem, no entanto, causar morte celular.

Uma vez que o crescimento é intercelular, muitos patógenos possuem estruturas especializadas, como haustórios, que penetram a parede celular, mas não a membrana plasmática, e permanecem em íntimo contato com as células das quais os nutrientes serão translocados (Hahn e Mendgen, 2001). Silva e Matsuoka (1999), em seus estudos sobre a histologia da interação *C. pernicioso*-cacaueiro forneceram interessantes informações acerca da colonização durante a fase biotrófica. A colonização dos tecidos só foi visualizada após 30 dias de inoculação, com reduzido número de hifas exclusivamente intercelulares. Este período coincide com as primeiras reações visíveis do hospedeiro, em forma de clorose e intumescimento a partir do ponto de infecção. Assim como não foi observada formação de apressório, também não há formação de haustórios, sendo, aparentemente, desnecessário para o desenvolvimento de *C. pernicioso*, uma vez que a hifa intercelular tem a aparente capacidade de acumular nutrientes, como ocorre com *Cladosporium fulvum*, que também não possui haustório (Kenyon *et al.*, 1993).

As hifas intercelulares apresentam-se envolvidas por uma matriz eletrodensa, pouco relatada em fungos biotróficos, mas presentes em *C. fulvum* (Kenyon *et al.*, 1993) e em *C. lindemuthianum* (Perfect *et al.*, 1999). Uma hipótese para a função desta matriz, presente também nos haustórios e

ausente nas hifas na fase saprofítica, seria, além do armazenamento de nutrientes, o estabelecimento e manutenção da fase biotrófica e impedimento ou supressão das defesas da planta (Perfect *et al.*, 1999).

Durante este crescimento intercelular do micélio, mudanças morfológicas ocorrem na planta hospedeira em resposta a invasão e, segundo Evans (1980), é nesta fase primária que o fungo parece estimular tais respostas, embora os mecanismos não estejam completamente elucidados. A resposta do cacaueteiro é localizada no ponto de infecção, onde ocorre considerável espessamento dos tecidos, perda da dominância apical e desenvolvimento das vassouras-de-bruxa (Orchard *et al.*, 1994). Observações por microscopia eletrônica, feitas por Orchard *et al.* (1994), de tecidos infectados por *C. perniciosus* mostraram que a razão para o espessamento dos tecidos não era devido a um estímulo à divisão celular, mas devido ao aumento no tamanho de todos os tipos celulares, bem como uma considerável desorganização dos tecidos.

Os sintomas característicos de hipertrofia e hiperplasia das vassouras-de-bruxa sugerem um desbalanço nos reguladores do crescimento, como, por exemplo, auxinas ou citocininas (Orchard *et al.*, 1994). O nível de citocininas aumenta durante o desenvolvimento de *C. perniciosus*, entretanto não está claro se este aumento origina-se do cacaueteiro ou do próprio fungo (Orchard *et al.*, 1994). Ainda na fase biotrófica foram observados septos doliporos após 30 dias de inoculação, mostrando que a dicarionização ocorreu em hifas intercelulares, embora não tenha sido ainda observado grampos de conexão. Esta observação sugere que não é a morte das vassouras que induz a dicarionização do fungo e a conseqüente mudança de fase biotrófica para necrotrófica, quando o micélio torna-se, predominantemente, intracelular (Silva e Matsuoka, 1999).

O fungo permanece na fase primária por um período de 6-9 semanas (Muse *et al.*, 1996), dentro das vassouras, quando então estas começam a necrosar. Esta mudança é associada a dicarionização do fungo e leva a uma outra fase, denominada fase secundária, saprofítica (Muse *et al.*, 1996). Existem duas hipóteses para a morte da vassoura. A primeira seria que as células morreriam como conseqüência da infecção e a morte das células levaria a dicarionização do fungo e, assim, à fase saprofítica (Orchard *et al.*, 1994). A outra hipótese, discutida por Evans (1980), e comprovada por Silva e Matsuoka (1999) seria que a dicarionização ocorreria primeiro, resultando na

fase saprofítica, e, conseqüentemente, na morte da vassoura. Nesta fase em que o fungo se torna dicariótico, as hifas são menos espessas, com diâmetro de 1,5 a 3,0 μm , apresentam grampos de conexão (Evans, 1980; Calle *et al.*, 1982) e crescem intracelularmente (Calle *et al.*, 1982; Muse *et al.*, 1996; Silva e Matsuoka, 1999). O fungo continua seu crescimento saprofítico dentro das vassouras mortas por um período de 6 a 24 meses, quando então surgem os basidiocarpos sobre as vassouras e o ciclo recomeça (Griffith e Hedger, 1994).

Quando os basidiósporos germinam sobre calos de cacaueteiro, formam um micélio como o encontrado em tecidos vivos da planta infectada, porém quando germinam em meio ágar somente os tubos germinativos parecem ser monocarióticos e a colônia que se desenvolve é saprofítica dicariótica (McGeary e Wheeler, 1988), confirmando que a interação com a planta é requerida para a manutenção do micélio monocariótico durante a fase biotrófica. Entretanto, Meinhardt *et al.* (2006), recentemente reproduziram a fase biotrófica de *C. pernicioso* em laboratório, tendo o glicerol como a fonte de carbono importante na manutenção do micélio monocariótico.

A mudança da fase biotrófica para a fase de crescimento necrotrófico se caracteriza pela produção e liberação de enzimas hidrolíticas e toxinas (Wijesundera *et al.*, 1989). Os determinantes para esta mudança de fase biotrófica para necrotrófica ainda não estão bem esclarecidos, entretanto uma possível razão pode ser a necessidade de acesso a grandes quantidades de nutrientes em momentos de demanda, como para a esporulação. A necessidade por maiores fontes de nitrogênio e carbono pode induzir ou aumentar a expressão de genes durante a mudança de fase e nos estádios avançados da doença, entretanto poucos genes especificamente expressos durante a mudança de fase têm sido identificados (Kahmann e Basse, 2001; Pellier *et al.*, 2003). Em espécies de *Colletotrichum*, o principal modelo nos estudos de desenvolvimento de hemibiotróficos, a mudança de fase está claramente ligada a um aumento na expressão de genes que codificam enzimas que degradam a parede celular, como verificado em *C. lindemuthianum* (Wijesundera *et al.*, 1989), em *C. gloeosporioides* (Templeton *et al.*, 1994) e em *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* (Shih *et al.*, 2000).

Dusfresne *et al.* (2002), identificaram o gene *CLTA1* (*Colletotrichum lindemuthianum* transcriptional activator 1) que codifica um ativador transcricional, semelhante ao regulador *GAL4* de *Saccharomyces cerevisiae*,

que está envolvido na transição da fase biotrófica para necrotrófica. Estudos citológicos com mutantes cujo gene foi inativado demonstraram que o fungo permanecia na fase primária, sendo as hifas incapazes de se diferenciarem em micélio secundário. Pellier *et al.* (2003) isolaram o gene *CLNR1* (*Colletotrichum lindemuthianum* nitrogen regulator 1), e da mesma forma que ocorre em *CLTA1*, mutantes *clnr1* são não-patogênicos e tiveram a fase necrotrófica bloqueada. Estes dados sugerem que estes reguladores atuam não somente sobre genes que respondem a falta de carbono e nitrogênio, como também regulam a expressão de genes envolvidos na diferenciação das hifas secundárias (Pellier *et al.*, 2003).

Scarpari *et al.* (2005) analisando as alterações bioquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento da vassoura-de-bruxa, verificaram que, inicialmente, há o aumento no nível de compostos alcalóides e fenólicos, predominantemente, taninos, que possuem propriedades antimicrobianas e fazem parte de mecanismos inespecíficos para tentar eliminar patógenos, entretanto, o crescimento das hifas não é afetado. A redução no nível de taninos correlaciona-se com a morte da vassoura verde e com a mudança de fase biotrófica para necrotrófica, provavelmente atuando como fator que restringiria o desenvolvimento de hifas monocarióticas e favoreceria o micélio necrotrófico. Os mesmos autores observaram ainda um acúmulo de açúcares como glicose e sacarose nos tecidos infectados, provavelmente pela translocação de outros tecidos, uma vez que este fenômeno não é acompanhado de um aumento na fotossíntese, quando na verdade o que se observa é uma redução na concentração de pigmentos fotossintetizantes. Outra interessante observação é a presença de aminoácidos livres, como consequência da degradação de proteínas que ocorre durante os eventos de Morte Celular Programada (MCP) ou senescência. Uma indicação de que as vassouras verdes estão em processo de MCP ou senescência é o acúmulo de asparagina e de etileno. A conversão de vários aminoácidos em asparagina é um mecanismo de defesa que levaria à morte da vassoura verde por inanição, uma vez que este aminoácido é mais solúvel e atuaria como um carreador de nitrogênio para outras partes do cacauzeiro. Como, recentemente descrito, os aminoácidos asparagina e homoserina foram identificados como os fatores que induzem a expressão de *peID* em *F. solani* f. sp. *pisi* durante a infecção (Yang *et al.* 2005). Já o etileno é um hormônio que induz a expressão de resposta de

defesa, acelera a senescência e abscisão do órgão. Destas observações, Scarpari *et al.* (2005) sugerem que a planta utiliza, sem sucesso, mecanismos de defesa inespecíficos para eliminar o fungo; posteriormente outras alterações ocorrem, como aumento nos níveis de etileno, asparagina e açúcares, redução de alguns aminoácidos e pigmentos fotossintetizantes que levariam à morte e eliminação do órgão infectado. Entretanto, *C. pernicioso* parece utilizar a MCP a seu favor, alternando a fase biotrófica para necrotrófica.

A morte celular que ocorre na fase necrotrófica além de ser, portanto, mediada pelo sistema ativo de defesa das plantas, que reconhece as novas moléculas agora sintetizadas pelo patógenos, pode também ser ocasionada pelo próprio patógeno, que manipula o intrínseco programa de morte celular a seu favor (Jennings *et al.*, 2001; Qutob *et al.*, 2002). Qutob *et al.*, (2002) identificaram em *Phytophthora sojae* o gene *PsojNIP*, que codifica um fator de necrose, cujos transcritos são detectados somente durante a transição da fase biotrófica para necrotrófica. O alto nível de expressão deste gene, durante os últimos estágios da doença, sugere que esta proteína atua como elicitor que acelera a morte celular. Esta hipótese é reforçada pela sua semelhança com NEP1, uma proteína isolada de *F. oxysporum* f. sp. *erythroroxyli* que atua como elicitor da produção de etileno e de necrose (Jennings *et al.*, 2001).

Bittencourt *et al.* (2004) identificaram, no Banco de Dados do Projeto Genoma “Vassoura-de-bruxa”, seqüências com homologia a fatores de necrose de outros fungos. A presença desta ORF na biblioteca EST e a expressão deste gene durante os estádios iniciais e finais da doença confirmam a participação deste fator de necrose durante o processo de interação planta-patógeno. Neste mesmo Banco de Dados também já constam seqüências similares a outros genes discutidos e, provavelmente, seqüências de muitos outros genes que ainda não tiveram seu papel elucidado. A identificação de genes expressos nos diferentes estádios da doença está, portanto, sendo acelerada pelo Projeto Genoma “Vassoura-de-bruxa”; entretanto, a importância e o papel destes genes na interação planta-fungo dependerá, grandemente, dos estudos genéticos e fisiológicos a serem desenvolvidos e da interação entre os diferentes grupos de pesquisadores envolvidos neste desafio.

Como *C. pernicioso* penetra nos tecidos via estômatos ou por penetração direta, sem a formação de apressórios e de haustórios, as enzimas pectinolíticas podem ser importantes durante a invasão dos tecidos e também

durante a mudança de fase biotrófica para necrotrófica, e assim sendo, mecanismos de resistência baseados no impedimento da expressão ou atividade de enzimas pectinolíticas poderão impedir a infecção ou mesmo impedir o desenvolvimento das hifas durante as fases primárias e/ou secundária, e, conseqüentemente, a produção de novos basidiósporos, única forma infectiva do patógeno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa – Viçosa /MG.

3.1 – MICRORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

No Quadro 3 estão descritos todos os isolados de *C. pernicioso* utilizados nos experimentos, bem como os biótipos, a origem e os hospedeiros. Nos experimentos de isolamento e regulação de genes que codificam pectato liase foi utilizado o isolado CP02, cedido pelo Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, da Universidade de Campinas (UNICAMP). Todos os isolados de *C. pernicioso* foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA (OXOID) enriquecido (Santos, 2001) e mantido em incubadora à 27^oC. Meio de cultura batata-dextrose líquido (BDL) também foi utilizado para obtenção de micélio de *C. pernicioso*.

Quadro 3 – Identificação, biótipos, hospedeiro e local de origem da coleta dos isolados de *C. pernicioso*.

Identificação	Biótipo	Origem	Hospedeiro
1-CP02	Biótipo C	Itabuna-BA	<i>Theobroma cacao</i>
2-FA551	Biótipo C	Tabatinga-AM	<i>Theobroma sp.</i>
3-FA317	Biótipo C1	Ilhéus-BA	<i>Theobroma cacao</i>
4-FA277	Biótipo C1	Barro Preto - BA	<i>Theobroma cacao</i>
5-FA281	Biótipo C2	Aiquara, BA	<i>Theobroma cacao</i>
6-FA42	Biótipo C2	Itabuna-BA	<i>Theobroma cacao</i>
7-LEP 1	Biótipo L	Pichilinge, Equador	<i>Arrabidaea verrucosa.</i>
8- LA17	Biótipo L	Pichilinge, Equador	<i>Arrabidaea verrucosa</i>
9- RWB551	Biótipo S	Juiz de Fora-MG	<i>Solanum lycocarpum</i>
10- FA 609	Biótipo S	Poços de Caldas- MG	<i>Solanum sp</i>

Para infecção e multiplicação de bacteriófagos recombinantes (λ EMBL3) (Stratagene) do Banco Genômico de *C. perniciosus* foi utilizada a linhagem bacteriana *E. coli* MRA[®]. Estes procedimentos são, posteriormente, descritos.

Para os procedimentos padrões de clonagem e transformação bacteriana foram utilizados os plasmídeos pBluescript SK⁺ (Stratagene[®]) ou pGem T-easy (Invitrogen Life Technologies[®]) e a bactéria *E. coli* DH5 α [®], cultivada em meio LB, contendo 50 μ g de ampicilina/mL, a 37^oC.

3.2 – EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL E CLONAGENS.

O DNA total de *C. perniciosus* CP02 e dos demais isolados foram extraídos de acordo com a metodologia descrita por Speacht *et al.* (1982). O micélio para a extração de DNA total foi obtido após o crescimento do fungo em meio BDL, à 25^oC, por 10 dias.

As reações de ligação realizadas neste trabalho consistiram da adição de um vetor de clonagem, de fragmentos de DNA, tampão de ligação e da enzima T4 ligase (Promega[®]), seguido de incubação, por 16 horas, à 16^oC. As transformações de *E. coli* DH5 α [®] foram realizadas como descrito por Morrison (1977) e a extração de plasmídeos, salvo exceções, quando se utilizou o Kit Wizard (Promega[®]), foram realizadas pelo método de lise alcalina, como descrito por Sambrook *et al.* (1989).

Todas as enzimas de restrição para manipulação de DNA foram obtidas da Promega[®], Stratagene[®] ou New England Biolabs[®] e utilizadas de acordo com as instruções do fabricante.

3.3 – CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO E ISOLAMENTO DOS GENES QUE CODIFICAM PECTATO LIASE

Considerando-se a complexidade do genoma haplóide de *C. perniciosus*, estimado em 30 Mb (Rincones *et al.*, 2003), o número de clones requeridos para se ter todos os genes representados pelo menos uma vez foi calculado de acordo com a equação a seguir:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f),$$

Onde:

N = número de clones necessários para abranger todo o genoma;

P = probabilidade do evento;

F = tamanho médio das inserções dividido pelo tamanho do genoma

O Banco Genômico de *C. perniciosus* foi construído com fragmentos de DNA total entre 9 a 20Kb, obtidos por clivagem parcial com a enzima de restrição *Sau3A* (Promega Inc.), clonados no vetor λ EMBL3 (Stratagene), como descrito abaixo.

3.3.1. Digestão parcial do DNA total com enzima de restrição *Sau3A*

Para determinação da concentração ideal de enzima para gerar fragmentos de DNA de 9 à 20Kb, 1 μ g de DNA total foi incubado com diferentes concentrações da enzima *Sau3A* (0,5U; 0,32U; 0,124U; 0,063U; 0,03U e 0,015U) por 1 hora a 37^oC. Após a determinação da concentração ideal de *Sau3A*, 50 μ g de DNA foram clivados para a obtenção dos fragmentos a serem utilizados para a construção da biblioteca genômica.

3.3.2. Separação dos fragmentos de restrição de DNA em gradiente de sacarose

A separação dos fragmentos de DNA foi realizada em gradiente contínuo de sacarose de 10 a 40%, como descrito por Sambrook *et al.* (1989). A ultracentrifugação foi realizada por 22 horas, 45.000g, à 16^oC, em Ultracentrifuga Beckman utilizando-se o rotor SW50.i. Após a centrifugação o tubo foi perfurado na porção inferior para coleta de 14 frações de 300 μ L em cada Eppendorf de 1,5 mL. Um volume de 20 μ L de cada amostra foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,6%. As frações contendo fragmentos de DNA entre 9 e 20 Kb foram precipitados, por 16 horas a -20^oC, pela adição de 3 mL de TE, 100mM NaCl e igual volume de isopropanol. Após centrifugação por 40 minutos a 7000 g, o precipitado foi lavado com 100 μ L de etanol 70%, ressuspensionado em 10 μ L de TE e quantificado em gel de agarose 0,6% para posterior utilização na reação de ligação.

3.3.3. Ligação dos fragmentos de DNA ao vetor λ EMBL3 e empacotamento *in vitro*

O vetor de clonagem utilizado para a construção do banco genômico de *C. perniciosus* foi o DNA do bacteriófago λ EMBL3 (Stratagene) e a reação de ligação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. O extrato de empacotamento utilizado foi o Gigapack Gold II Packaging Extract (Stratagene). Para a infecção dos fagos utilizou-se como célula hospedeira *E. coli* XL1 Blue MRA (p2) e para amplificação e determinação do título do banco genômico utilizou-se *E. coli* XL1 Blue MRA, de acordo com as recomendações do fabricante.

3.4 – ISOLAMENTO DE GENES *pec1A*, *pec1B* E *pec2* QUE CODIFICAM PECTATO LIASE EM *C. perniciosus*

3.4.1 – Sondas utilizadas

As sondas utilizadas para isolamento dos genes que codificam pectato liase em *C. perniciosus* foram os fragmentos de DNA internos destes genes amplificados por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos. Os oligonucleotídeos CP-PL1 (5' TCGACGTCAGCAACGTTATC 3') e CP-PL2 (5' GTAGTTTGCGGCGTATGTGA 3') foram desenhados a partir da(s) seqüência(s) que codifica(m) pectato liase, disponíveis no Banco de Dados do Projeto Genoma "Vassoura-de-bruxa" (www.lge.ibi.unicamp/vassoura) que apresentaram homologia com pectato liase A de *A. niger*. O produto de PCR de 418 pb foi subclonado no vetor pGEM[®] (Invitrogen Life Technologies), e o plasmídeo recombinante foi denominado pGemPL10, e utilizado como sonda para isolamento dos genes *pec1A* e *pec1B*. Para isolamento de *pec2* foram utilizados os oligonucleotídeos CP-PEC2F (5' TACCGGACTGGTCTCGATTC 3') e CP-PEC2R (5' CTCAGCTGGAGGTCTTGAT 3') desenhados a partir de seqüências que apresentaram homologia com *peID* de *F. solani* f. sp. *pisi*. O produto de PCR de 483 pb foi subclonado no vetor pGEM[®] (Invitrogen Life Technologies) e o plasmídeo recombinante foi denominado pPEC2. As seqüências dos produtos de PCR subclonados foram confirmadas por meio de

sequenciamento, utilizando o sistema Big Dye Terminator em um seqüenciador ABI377 (Perkin-Elmer).

3.4.2 - Isolamento dos fagos recombinantes do banco genômico

Para o isolamento de genes foi realizada uma triagem do banco genômico utilizando a metodologia de hibridização de DNA em placas de lise, descrita por Benton e Davis (1977). As sondas utilizadas foram os plasmídeos pGemPL10 e pPEC2, marcados com o Kit “Gene Images Random Prime Labelling Module” (Amersham Pharmacia Biotech). Para detecção dos fragmentos que hibridizaram com a sonda foi utilizado o Kit “CDP-StarTM Detection Module” (Amersham Pharmacia Biotech). As hibridizações foram realizadas a 60°C por 16 horas e a membrana lavada duas vezes em SSC 2X, SDS 0,1% a 60°C por 20 minutos cada e uma vez em SSC 1X, SDS 0,1%, a 60°C por 10 minutos. Para confirmação dos sinais positivos, diluições de cada fago recombinante isolado foram utilizadas na realização de novas hibridizações nas mesmas condições. Em seguida, a membrana foi colocada em contato com filme XOMAT K (Kodak) e reveladas após 2-3 dias de exposição.

3.4.3 - Extração e caracterização dos fragmentos de DNA dos fagos recombinantes

A extração de DNA dos fagos recombinantes positivos foi realizada como descrito por Felipe *et al.* (1992). Os DNAs extraídos foram clivados com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco* RI. Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, transferidos para membrana de náilon (Duralon-Stratagene) e hibridizados, utilizando como sonda os plasmídeos pGemPL10 e pPEC2. As sondas foram marcadas como escrito no item 2.4.2. As hibridizações foram realizadas a 60°C por 16 horas e a membrana lavada duas vezes em SSC 2X, SDS 0,1% a 60°C por 20 minutos cada e uma vez em SSC 1X, SDS 0,1%, a 60°C por 10 minutos. Em seguida, a membrana foi colocada em contato com filme XOMAT K (Kodak) e reveladas após 2-3 dias de exposição.

3.4.4 - Subclonagem dos fragmentos de DNA dos fagos recombinantes, sequenciamento e caracterização.

Os fragmentos de DNA que apresentaram homologia com os plasmídeos pGemPL10 e pPEC2 foram purificados do gel e clonados no vetor pBluescript II KS+ (Stratagene®), previamente clivado com as mesmas enzimas utilizadas na obtenção dos fragmentos de DNA dos fagos recombinantes. Os plasmídeos recombinantes, que continham as seqüências que apresentaram homologia com o gene que codifica pectato liase A de *A. niger*, foram denominados p λ 1.5 e p λ 1.7. O plasmídeo recombinante que continha a seqüência que apresentou homologia com o gene *peD* de *F. solani* f sp. *pisi* foi denominado p λ 2.2.

Para o sequenciamento dos genes foram utilizadas duas estratégias de sequenciamento: a primeira consistiu da clivagem parcial dos plasmídeos e subclonagem de seus fragmentos de DNA e posterior sequenciamento, a segunda estratégia de sequenciamento foi baseada na utilização de oligonucleotídeos específicos. As seqüências de DNA resultantes do sequenciamento tiveram suas identidades confirmadas a partir do alinhamento múltiplo com as seqüências de genes depositadas no GenBank usando o algorítmico Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul *et al.*, 1997). As análises subseqüentes das seqüências de DNA e das proteínas foram realizadas no programa CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). As análises filogenéticas foram realizadas no programa PAUP versão 4 (Swofford, 2002).

3.5 – ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO GENE PECTATO LIASE EM DIFERENTES ISOLADOS DE *C. pernicios*

O estudo da distribuição dos genes que codificam pectato liase nos isolados de *C. pernicios* foi feito utilizando linhagens de diferentes biótipos e regiões geográficas (Quadro 3).

Para verificação da distribuição dos genes que codificam pectato liase nos diferentes biótipos de *C. pernicios*, os plasmídeos pGemPL10 e pPEC2 foram marcados com [α -³²P] dATP, utilizando “Random Primer IT Labeling Kit” (Stratagene®). O DNA total dos isolados foram clivados com as enzimas *EcoRI*. As hibridizações foram realizadas a 60°C por 16 horas e a membrana lavada

duas vezes em SSC 2X, SDS 0,1% a 60°C por 20 minutos cada e uma vez em SSC 1X, SDS 0,1%, a 60°C por 10 minutos. Em seguida a membrana foi colocada em contato com filme XOMAT K (Kodak) por 3 dias à -80°C.

3.6 – EXPRESSÃO DOS GENES *pec1A*, *pec1B* E *pec2* QUE CODIFICAM PECTATO LIASE EM DIFERENTES CONDIÇÕES *IN VITRO*

Para estudos da indução e repressão catabólica dos genes que codificam pectato liase, 10 discos de 7 mm, contendo micélio de *C. perniciosus*, foram inoculados em meio sintético (MS) (0,6% de KNO₃, 0,052% de, 0,152% de KH₂PO₄ e 1% de glicose). O MS foi preparado em tampão fosfato pH 6,8, e após a esterilização foi acrescentado 0,052% de MgSO₄. Após 7 dias de cultivo a 28°C e 180 RPM, o micélio foi filtrado, lavado com MS sem fonte de carbono e transferido para novo MS contendo 1% das seguintes fontes de carbono: pectina, glicose, pectina + glicose ou extrato da polpa de cacau.

Para avaliação do efeito do pH o micélio foi transferido para MS contendo 1% de pectina, preparados em tampão citrato pH 4,0 e tampão fosfato de sódio pH 8,0. O RNA total foi extraído nos tempos de 8, 18 e 32h após a transferência, de acordo com o protocolo disponível no endereço eletrônico www.tigr.org/tdb/potato/microarray_SOPs.shtml. Os RNAs extraídos foram checados em gel de agarose 1% e tiveram a pureza e quantificação determinados a 260 nm utilizando o Programa RNA Quantify and Purity Check do espectrofotômetro Pharmacia Biotech. Ultraspec^R 3000.

A identificação dos transcritos dos genes foi realizada por RT-PCR. As reações de transcrição reversa, para síntese das primeiras fitas de cDNA, foram realizadas empregando-se o kit ImPromTM II (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Em cada reação de RT foram utilizadas 5 µg de RNA total previamente tratado com DNase RQI RNase Free (Promega). Para amplificação do gene *pec1A* foram utilizados oligonucleotídeos específicos PEC1A-F (5'-TCGACGTCAGCAACGTTATC-3') e PEC1A-R (5'-TCAGAATGCCAAGGTCTG-3'), cujo T_m é de 52⁰C; para *pec1B* foram utilizados os oligonucleotídeos PEC1B-F (5'-AATGTCATCATCCGGAAC-3') e PEC1B-R (5'-GTAGTTTGC GGCGTATGTGA-3'), cujo T_m é de 52⁰C e, finalmente, para a amplificação de *pec2* foram utilizados os oligonucleotídeos

específicos PEC2-F (5'-ATGCACCTCAGTTCATCG-3') e PEC2-R (5'-TCAGTCAGCGGCACCAGT-3'). As reações de PCR foram realizadas com 1 µL da reação de RT, juntamente com 5 pmol de cada oligonucleotídeo, 500 ng de oligo(dT) (Promega), 20 U de RNAsin (Promega) e 10U de Taq ImProm II (Promega). O volume de cada reação foi ajustado para um volume final de 20 µL, incubado a 25⁰C por 5 minutos e, então a temperatura foi elevada para 42⁰C por 60 minutos. Para o controle de uma possível contaminação por DNA, todos os cDNAs foram submetidos à uma reação de PCR utilizando oligonucleotídeos SNF1-R (5'-GCTGTCCGTATGTCCAAGGT-3') e SNF1-L (5'-GATGTACCACACGCCTGAGA-3') para amplificar uma região que contém íntrons, do gene *snf1*. O gene *snf1* codifica uma proteína quinase que participa da via de transdução de sinal na repressão por glicose em *S. cerevisiae* (Treitel *et al.*, 1998). O fragmento amplificado de cDNA do gene *snf1* possui tamanho de 230 pb, enquanto os fragmentos amplificados de DNA total possui tamanho de 300 pb. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc) e consistiram de 40 ciclos, onde cada ciclo consistia de um passo a 94⁰C por 1 min., um passo à temperatura de anelamento do oligonucleotídeo utilizado e um passo a 72⁰C por 1min. Ao final de 40 ciclos foi realizada uma extensão final a 72⁰C por 7 min.

Para a realização de RT-PCR semi-quantitativo as reações de amplificação dos cDNAs dos genes *pec1A* e *pec1B* foram realizados por 25 ciclos, como descrito por Pereira (2005), utilizando como controle um fragmento do gene *snf1*.

Todos os produtos de PCR foram checados em gel de agarose 1%. Os produtos das reações de RT-PCR semi-quantitativo foram transferidos para membranas de náilon (Duralon – Stratagene), como descrito por Ausubel *et al.* (1992). As sondas utilizadas foram fragmentos de DNA obtidos por PCR de DNA total de *C. pernicioso*, utilizando os mesmos oligonucleotídeos das reações de RT-PCR, e marcados com P³² α d-ATP, de acordo com as recomendações do kit "Random Prime it Labelling System" (Stratagene). As membranas foram hibridizadas a 63⁰C por 16 horas, lavadas 2x em SSC 2X, SDS 0,1% por 20 minutos e uma vez em SSC 1X, SDS 0,1% por 10 minutos. As membranas foram colocadas em contato com o filme XOMAT K (Kodak) por 2 dias a -80⁰C, com intensificador.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - ISOLAMENTO DE GENES QUE CODIFICAM PECTATO LIASE

4.1.1 - Construção do banco genômico

Quando se deseja isolar genes de um organismo diferentes estratégias podem ser adotadas. No banco de dados do Projeto Genoma “Vassoura-de-bruxa” as seqüências dos genes muitas vezes não estão completas e para que fosse possível o isolamento e caracterização de vários genes de *C. pernicioso*, como genes que codificam enzimas pectinolíticas, foi realizada a construção de um banco genômico de *C. pernicioso* no vetor λ EMBL3 (Stratagene). Devido à complexidade do genoma haplóide de *C. pernicioso*, estimado em 30 Mb (Rincones *et al.*, 2003), o número de clones requeridos para que todos os genes estejam representados pelo menos uma vez é de $1,6 \times 10^3$, calculado de acordo com a equação descrita no item 3.3. Após a construção do banco genômico, o número de clones obtido foi de $5,9 \times 10^5$ UFP/mL, considerado suficiente para ter cada gene do genoma representado mais de uma vez. Após a amplificação o título final do banco genômico foi de $7,7 \times 10^{14}$ UFP/mL.

4.1.2 – Organização dos genes que codificam pectato liase no genoma de *C. pernicioso*

As sondas de DNA utilizadas para o isolamento de um gene podem ser heterólogas – fragmentos de DNA ou gene de outra espécie, ou homólogas – fragmentos de DNA da mesma espécie. Para a geração de uma sonda homóloga aos genes que codificam pectato liase de *C. pernicioso* foi utilizado oligonucleotídeos específicos, construídos a partir das seqüências disponíveis no Banco de Dados do Projeto Genoma de *C. pernicioso*.

As seqüências obtidas a partir do sequenciamento do genoma de *C. pernicioso* estão armazenadas em um banco de dados interno do Projeto Genoma “Vassoura-de-bruxa”, de consulta restrita (www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura). Cada seqüência, denominada *read*, obtida é comparada com o banco de dados do Genbank, utilizando o programa

BLAST, que traduz cada *read* nos seis quadros de leitura possíveis e compara o resultado das proteínas formadas com o banco de proteínas de genes sequenciados. O resultado destas comparações é armazenado no banco de dados do Projeto Genoma e fica disponível para a pesquisa por palavra chave. Os *reads* de interesse podem ser alinhados e clusterizados, a fim de se obter seqüências maiores, denominadas *contigs*.

Foram feitas pesquisas neste banco de dados por palavra-chave como “pectate lyase” para encontrar seqüências relacionadas a genes que codificam pectato liase em *C. pernicioso* e para as seqüências encontradas foi criado o projeto Pectato Liase. O projeto Pectato Liase contém seqüências homólogas aos genes que codificam pectato liase em bactérias e fungos. Após a clusterização foram formados 10 *contigs*, sendo 5 *contigs* com homologia a pectato liase A de *A. niger* e *A. fumigatus*; 2 *contigs* com homologia à *peIC* e *peID* de *F. solani* f. sp. *pisi* e 3 *contigs* apresentaram homologia à proteínas putativas de bactérias e dos fungos *Glomerella cingulata* e *Magnaporthe grisea*. Entretanto, as seqüências disponíveis e clusterizadas até o momento não fornecem as seqüências completas dos genes de pectato liase.

Um dos *contigs*, que apresentou homologia com pectato liase A de *A. niger* foi utilizado para a geração de um par de oligonucleotídeos para a amplificação de um fragmento de DNA de 418 pb, a partir de uma reação de PCR com DNA total de *C. pernicioso*. O plasmídeo recombinante pGemPL10, contendo este fragmento, foi utilizado como sonda na triagem do banco genômico e no estudo de distribuição destes genes em isolados de *C. pernicioso*. Um *contig* de 1206 pb, que apresentou homologia com pectato liase D de *F. oxysporum* f.sp *pisi*, também foi utilizado para a geração de um par de oligonucleotídeos para a amplificação de um fragmento de DNA de 483 pb, a partir de uma reação de PCR com DNA total de *C. pernicioso*.

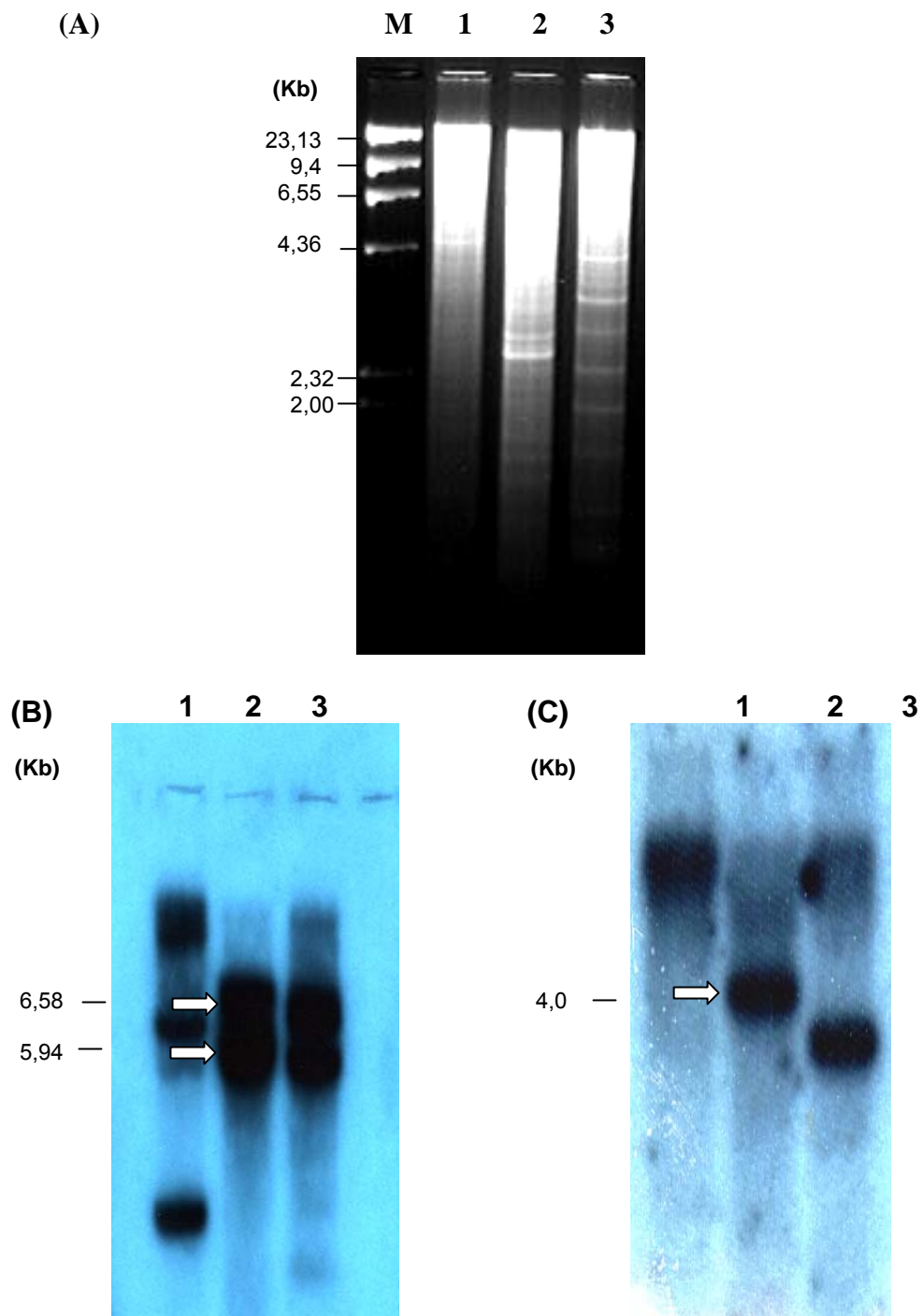


Figura 1. (A) DNA total de *C. perniciosus* CP02 clivado com as enzimas *Bam*HI (1), *Eco*RI (2) e *Xba*I (3). (M) DNA do fago λ digerido com *Hind* III. (B) Auto-radiografia da hibridização com o fragmento de 418 pb dos genes *pec1A* e *pec1B*, clonado em pGemPL10. (C) Hibridização com o fragmento de 483pb do gene *pec2* clonado em pPEC2. As setas vermelhas indicam os fragmentos de DNA total, clivado com a enzima *Eco*RI, isolados dos fagos recombinantes do banco genômico.

O plasmídeo recombinante pPEC2, foi utilizado como sonda na triagem do banco genômico e no estudo de distribuição destes genes em outros isolados de *C. pernicioso*.

Uma hibridização do DNA total de *C. pernicioso* CP02, clivado com as enzimas *Bam*HI, *Eco*RI e *Xba*I, com os plasmídeos pGemPL10 e pPEC2 foi realizada. Os resultados da hibridização (Figura 1B) revelam a presença de pelo menos dois genes que codificam pectato liase com homologia à pectato liase A de *A. niger* e de um gene que apresenta homologia à pectato liase D de *F. solani* f. sp *pisii* (Figura 1C).

A caracterização dos genes que codificam pectato liase 1 (*pec1A* e *pec1B*) e pectato liase 2 (*pec2*) em dez isolados por hibridização do DNA total clivado com a endonuclease *Bam*HI, revelou polimorfismo no número e tamanho dos fragmentos que hibridizaram (Figura 2). Os isolados FA55I, FA317 (C1) e LEP1 (biótipo L) apresentaram 2 sinais de hibridização, sugerindo que nestes isolados, assim como em CP02, há duas cópias do gene que codifica pectato liase 1 no genoma. Não foi observado o sinal de hibridização para o isolado LA17 (biótipo L), sendo que, para este mesmo isolado, Silva (2005) também não observou sinal de hibridização com o gene *nia*. Dentre os isolados do biótipo C, grupo C2, foi observada um sinal adicional, indicando a presença de, pelo menos, 3 cópias deste gene no genoma destes isolados ou que um dos genes apresenta um sítio interno de restrição, que não está presente nos genes dos demais isolados. Entre os isolados do biótipo S não foi observada a banda de 5,94Kb, sugerindo a presença de uma única cópia deste gene no genoma.

A caracterização do gene *pec2* em 10 isolados, por hibridização do DNA total clivado com a endonuclease *Bam*HI, revelou a presença de uma cópia do gene *pec2* em todos isolados, exceto, novamente, no isolado LA17 (Figura 2B).

Os isolados C1 e C2 correspondem a isolados obtidos nas proximidades de 2 regiões geográficas da Bahia onde focos da doença foram primeiramente descritos. Anderbrahn *et al.* (1999) sugerem que a ocorrência da vassoura-de-bruxa, nestas duas regiões da Bahia, resultou de duas independentes introduções do patógeno. Estes dados foram reforçados pela análise do cariótipo molecular realizado por Rincones *et al.* (2003), onde todos os isolados apresentaram 8 cromossomos; entretanto, um polimorfismo de tamanho dependente da origem do isolado foi observado. Com relação ao número de

cópias de genes que codificam pectato liase, ambos os grupos de isolados também apresentaram polimorfismo correspondente à origem geográfica.

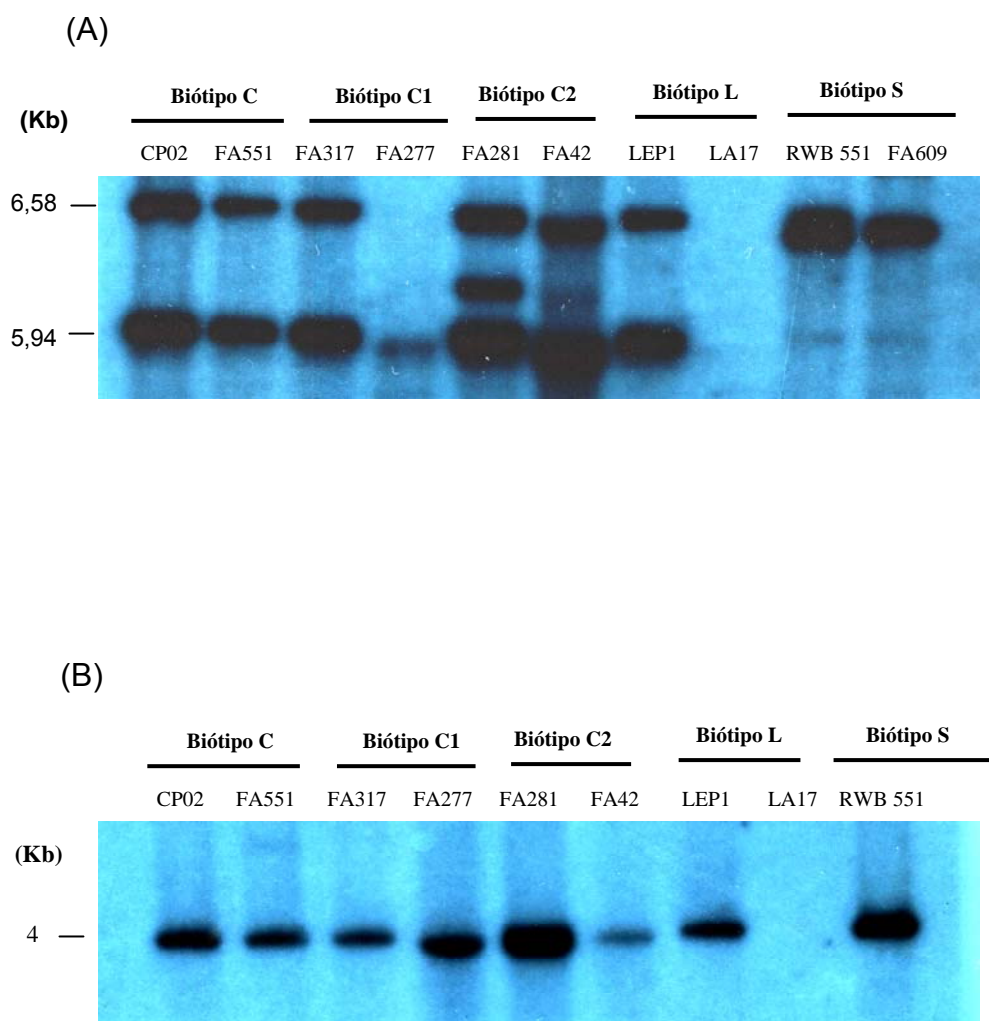


Figura 2 - Análise de restrição do DNA total dos isolados de *C. pernicioso* de diferentes biótipos e regiões geográficas clivados com *Bam*HI. (A) Hibridização com o fragmento de DNA de 418 pb do gene *pec1A* e *pec1B*. (B) Auto-radiografia da hibridização com o fragmento de DNA de 481 pb do gene *pec2*.

4.1.3 - Clonagem e sequenciamento dos genes *pec1A*, *pec1B* e *pec2* de *C. pernicioso*

Fagos contendo os genes *pec1A* e *pec1B* foram isolados do banco genômico de *C. pernicioso*, por hibridização com o plasmídeo pGemPL10, enquanto o gene *pec2* foi isolado utilizando como sonda o plasmídeo pPEC2. Para o isolamento dos genes *pec1A* e *pec1B* foram selecionados quatro clones de fagos recombinantes, denominados λ CPpl 1.2, λ CPpl 1.5, λ CPpl 1.6 e λ CPpl 1.7, que apresentaram padrões diferentes de restrição, quando clivados com a enzima *EcoRI* (resultado não mostrado).

O clones λ CPpl 1.5 e λ CPpl 1.7 foram escolhidos para continuação do trabalho, uma vez que a análise de restrição do DNA destes fagos com a enzima *EcoRI* revelou a presença dos fragmentos de DNA de 6,58 Kb e 5,94 Kb, como encontrados na análise do DNA genômico (Figura 1A). Os fragmentos de DNA foram purificados e subclonados no vetor pBluescript II KS+ gerando, respectivamente, os plasmídeos recombinantes p1.5 e p1.7.

Para o isolamento do gene *pec2* também foram selecionados quatro clones de fagos recombinantes denominados λ CP2.1, λ CP2.2, λ CP2.3 e λ CP2.4, que apresentaram padrões diferentes de restrição, quando clivados com a enzima *EcoRI* (resultado não mostrado). O clone λ CP2.1 foi escolhido para continuação do trabalho, uma vez que a análise de restrição do DNA deste fago com a enzima *EcoRI* revelou presença do fragmento de DNA de 4.0 Kb, como encontrado na análise do DNA genômico (Figura 1B). Este fragmento de DNA foi purificado e subclonado no vetor pBluescript II KS+, originando o plasmídeo recombinante denominado p2.1.

Os genes subclonados nos plasmídeos p1.5 e p1.7, foram, respectivamente, denominados *pec1A* e *pec1B*, devido à alta similaridade que ambos apresentaram com os genes pectato liase A de *A. niger* e *A. fumigatus*. O terceiro gene, subclonado no plasmídeo p2.1, foi denominado de *pec2* devido à alta similaridade apresentada com o gene *peID* de *F. solani* f. sp. *psi*.

Para obter a seqüência completa dos genes, duas diferentes estratégias foram adotadas. Primeiramente, ambos plasmídeos foram, parcialmente, clivados com a enzima *Sau3A* e os fragmentos de DNA gerados foram subclonados no vetor pBluescript II KS+. O sequenciamento dos vários subclones não permitiu a obtenção da seqüência completa dos genes, sendo

então adotada uma segunda estratégia de sequenciamento, que consistiu na utilização das seqüências obtidas para o desenho de novos oligonucleotídeos específicos para cobrir as regiões que ficaram incompletas.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *pec1A*, *pec1B* E *pec2*

Os genes *pec1A*, *pec1B* e *pec2*, que codificam pectato liase em *C. pernicioso*, foram caracterizados. As regiões codificadoras de *pec1A*, *pec1B* e *pec2* possuem, respectivamente, 1141 pb, 1346 pb e 936 pb. A seqüência do gene *pec1A* possui, além dos 1141 nucleotídeos na região codificadora, 242 nucleotídeos na região terminadora e apenas 96 nucleotídeos na região promotora, não sendo, portanto, suficiente para a identificação de putativo TATA box e cis-elementos, exceto pela região rica em CT que precede o códon de iniciação ATG, que poderiam estar envolvidos na regulação deste gene (Figura 3).

A seqüência do gene *pec1B* (Figura 4) possui 472 nucleotídeos na região promotora e 189 nucleotídeos na região terminadora. A análise da região promotora revelou alguns possíveis cis-elementos envolvidos na regulação da expressão gênica de *pec1B*. Um típico TATA box foi identificado a -75 pb do códon de iniciação da tradução e entre o TATA box e códon de iniciação foi encontrada uma região rica em CT, a qual atua como sinal de transcrição básico na determinação do códon de início e na eficiência de transcrição (Unkles, 1992). Três possíveis CAAT box foram localizados nas posições -304, -316 e -349. Uma seqüência GATA putativa foi localizada na posição -146. Seqüências GATA constituem seqüências de reconhecimento da maioria das proteínas regulatórias do metabolismo do nitrogênio (Kulmburg *et al.*, 1993). Seqüências de ligação do regulador CREA, que atua na repressão catabólica, semelhantes à seqüência consenso 5' (G/C)(C/T)GG(G/A)G 3' (Felenbok *et al.*, 2001) não foram identificadas na região promotora.

Uma seqüência consenso de ligação de PAC, 5' GCCARG 3' (Huertas-Gonzales *et al.*, 1999) foi localizada na posição -216 pb do gene *pec1B*. PacC, é um fator de transcrição que regula a expressão de genes dependentes de pH, atuando como ativador de genes expressos em pH externo alcalino e repressor de genes que são expressos em pH externo ácido (Cubero e

Scazzocchio, 1994; Tilburn *et al.*, 1995; Maccabe *et al.*, 1996). Seqüências consenso para reconhecimento de PacC estão presentes no promotor do gene *pl1* de *F. oxysporum* (Huertaz-Gonzales *et al.*, 1999) e nos promotores de genes que codificam endopoligalacturonase em *B. cinerea* (Wubben *et al.*, 2000). No promotor do gene *pe1B* de *C. gloeosporioides* foram detectados nove seqüências consenso putativas para ligação de *Pac1* (homólogo a PacC de *A. nidulans*) e os níveis de transcritos de *Pac1* e *pe1B* aumentaram em função do pH (Drori *et al.*, 2003; Kramer-Haimovich *et al.*, 2006).

A seqüência do gene *pec2* (Figura 5) possui 147 nucleotídeos na região promotora, 879 nucleotídeos na região codificadora e 386 nucleotídeos na região terminadora. A análise da região promotora revelou alguns possíveis cis-elementos envolvidos na regulação da expressão gênica de *pec2*. Um típico TATA box foi identificado a -49 do códon de iniciação da tradução e entre o TATA box e códon de iniciação foi encontrada uma região rica em CT. Um possível CAAT box foi localizado na posição -65. Os demais cis-elementos não foram localizados, provavelmente por ser a região promotora seqüenciada muito pequena para que fosse possível a localização de todos cis-elementos. As regiões codificadoras de ambos os genes *pec1A* e *pec1B* são interrompidas por 7 íntrons. Os íntrons de *pec1A* possuem tamanhos de 76, 133, 60, 85, 50, 55, 50 nucleotídeos, já os íntrons de *pec1B*, possuem tamanhos de 68, 59, 69, 64, 55, 56 e 59 nucleotídeos.

Múltiplos íntrons são comuns e mais de 8 íntrons são encontrados em genes que codificam amilase em *A. oryzae* (Wirsel *et al.*, 1989) e em *A. niger* var. *awamori* (Korman *et al.*, 1990). Unkles (1992), comparando as seqüências 5' de processamento de vários genes de fungos filamentosos, observou que 80% possuem a seqüência consenso **GTPuNGPy** e, embora, a maioria dos sítios 3' de processamento possuam a seqüência consenso **PyAG**, 8% deles possuem AAG e 1% GAG.

Os seis últimos íntrons de *pec1A* e *pec1B* tiveram suas seqüências de processamento identificadas com base na comparação de sua seqüência com outros genes já seqüenciados pelo programa BLAST. Os 2 primeiros íntrons de ambos os genes foram localizados procurando-se pelas seqüências consenso aos íntrons e cuja retirada fornecesse uma ORF compatível com a ORF obtida após a retirada dos outros íntrons.

-60 GCAGCTGTCGCGTAGGTGTTTTAGGTACGACTTGGGGGAGAACTGTAAC TCATAAAGTCCAC

-36 AGGCCTCTCCCTGGAGAAGCGCGCATCGGTAAACGATGCCGCAAACATTG**gttatg**cca
M P Q T L

25 cactaaacggcggggttagtttctactctcgcccttcccacgattcgaagctgacaccgac

85 atct**tag**AAC TTCTGGTGGATCAGGCGGCACTCAGACTAC**gttacg**agtctctctgccc
N F W W I R R H S D Y

145 ttacgagcgcctctcaggaagcgctaaaaaggttgtcataatttccggtgagtcgtacg

205 ttccctcgagtcccatcggactaattctgatcatgatgtgcttctgacatt**cag**GCACCA
S T

265 TCAGCGGTAACACCGTCGTCAAAGTCGGCCCAACACAACCGTTATCGGCAAGCTCAGGAT
I S G N T V V K V G P T Q P L S A S S G

325 CCCAACTCGTTGGTGGTCTTCGTGTCCTCGAAGTCAGCAATGTCATCATCCGGAACG
S Q L V G V G L R V L E V S N V I I R N

385 TCAAGATTTCAAAGTTCTCGCCGAGGCTGGTGATGCTATCGGGGTT**CAGTCAGCCAGTC**
V K I S K V L A E A G D A I G V Q S A S

445 AGGTCTGGATTGACCATGCTGATCTCTCCAGTGATCGCGATCATGACAAG**gtctg**tttct
Q V W I D H A D L S S D R D H D K

505 atcctcaacagttaaaaatgatgctgatttccgctctgcaggacttgt**aa**gGATTTCAAGT
D F K

565 CGTATAAAGTCTCAA**agtgact**ttacgcttctccttgatagctacgatggtcttttggata
S Y K V S N

625 tcactcatggttgaccgggtgtcactgtctccaacag**caag**CTCTACAACCACTGGAAGG
S T T T G R

685 TCC**gttatg**tttgcagtgtgcgctttcataccatattcacgttttgctcac**ag**GCCTCTC
S A S

745 TCGTCGGACACTCTGATAGCAATGGTGACGAAGATACCAAGATCACTGTCACATATGTGCG
L V G H S D S N G D E D T K I T V T Y V

805 GAAACTACTGGAGCAATCTCAACTCTCGTACTCCATCTTTCCGATTCG**gttatg**aatata
G N Y W S N L N S R T P S F R F

865 attttgttgtccgagacctaagactaataaccgggttcggt**aa**gGTCATGGCCACATTTTC
G H G H I F

925 AATAACTACTTTGAGAGCAACAGTGATGGTATCAACACTCGCGATGGAGCCCAGTTACTC
N N Y F E S N S D G I N T R D G A Q L L

Figura 3 - Seqüência de nucleotídeos do gene *pec1A* que codifica pectato liase 1A em *C. pernicioso*. Seqüências de nucleotídeos em letras minúsculas correspondem aos íntrons putativos, as letras minúsculas em negrito correspondem às seqüências 5' e 3' de processamento. Códon de iniciação e de parada estão em destaque. Região rica em CT e sítio de poliadenilação putativo estão sublinhados.

985 GTAGAGAACAACGTTTGGAGTG**gtgagt**tatctgtaccggccaaatgatcctcattgaaca
 V E N N V W S

1045 atgttatgc**cag**ATCCAAAGAAGCCCTTGTACTCCACCGATGAAGGTTTTGCGGTTTCAA
 D P K K P L Y S T D E G F A V S

1105 AGAACAACGACTTTGGTGGAGGCGAGGACACTGCTCCCGCTGGCAACTTTAACACTGCAC
 K N N D F G G G E D T A P A G N F N T A

1165 CCTATTTCGTACAGTATGCTGGCTACTGGCAGCGTCGCGTCCTCCGTTACGGGAACCGCTG
 P Y S Y S M L A T G S V A S S V T G T A

1125 GTCAGACCTTGGCATTCTGA**TTC**ATCATTGATACTCCACTATGTGTCTACATTTCTGATA
 G Q T L A F *

1285 GTACTTTCAAACATAAAAGGTCAAATGCATCCAAGTATATCTACCAGCTCCATAGCATTTTC

1345 CGCTAGCGTACGTAGGTAAGCGGGAGTATCGAGGTCGACCTGTAACCGATCCTTCACCGA

1405 ATGATGTTCTAGAAAGTTCCAGCAAAAAAGTTCAGCTTTGGGGTTAGCGAAGCCCATTGGT

1465 TTCCCTAAAAAAGGGGGCATG

Figura 3 - continuação

489 ATCGACGTCAGCAACGTTATCATCCGAAACGTCAAAAATCTCAAAGGTTCTCGCTGACGCT
 I D V S N V I I R N V K I S K V L A D A
 549 GGAGATGCCATTGGTGTTCAGGCAGCCAGTCAAGTGTGGATTGACCATGTTGATCTTTCA
 G D A I G V Q A A S Q V W I D H V D L S
 609 AGTGACCGTGACCACGATAAG**ggtggt**tgataatctcatcacggaacaaatacaaaaggt
 S D R D H D K
 669 ttttaactgaccggatgtgcgca**cag**GACTACTATGATGGTCTTTTGGATATTACTCATGG
 D Y Y D G L L D I T H G
 729 TTGCACCGGTGTCACTGTCTCCAACAGCAAGCTCTACAATCACTGGAAG**gtccgt**ttctgt
 C T G V T V S N S K L Y N H W K
 789 ttgcatgtgcacttttcatgcccctcattcagattacgttcat**ag**GCTTCCCTCGTCGGAC
 A S L V G
 849 ACTCTGACAGCAATGGCTCCGAAGATACCAAGATCACTGTCAACATACGCCGCAAACACTACT
 H S D S N G S E D T K I T V T Y A A N Y
 909 GGAGCAACCTCAACTCTCGTACTCCATCTTTCCGATT**CGgttagt**taacatgattcaaca
 W S N L N S R T P S F R F
 969 cccctagacctaagctaacaactggttcgata**aag**GTCACGGCCACATCTTCAACAACATA
 G H G H I F N N Y
 1029 CTTTGAGAGTAACAGCGATGGTATCAACACCCGTGATGGTGCCAGTTACTCGTAGAGAA
 F E S N S D G I N T R D G A Q L L V E N
 1089 CAACGTTTGGAGT**ggtgagt**atatgtatcagttcaacttatgcttgcttcattgaacg
 N V W S
 1149 gatattattc**cag**CTCCCAAGAAGCCTTTGTACTCCACCGATGAAGGTTTCGCAGTTGCC
 A P K K P L Y S T D E G F A V A
 1209 AAAGGTAACGACTTTGGCGGAGGTTCTAATGAGGCGCCTGTGGAAACTTCAACTCTGCA
 K G N D F G G G S N E A P A G N F N S A
 1269 CCCTACTCGTACAGTTTGTGGCTGTTGGCAGCGTCGCGTCTTCCGTCAAGGCAAACGCT
 P Y S Y S L L A V G S V A S S V K A N A
 1329 GGTCAGACTTTGGGATTC**TGA**TTGGTCCCGGTATTTCTACCTTTTTTGGTTGTACTTTACG
 G Q T L G F *
 1389 GAGAATATGAGCAAAAAATGACGCAGTTATAAGCATAGGGAAAGGACTCAATGAGGAAGA
 1449 GTCCATCATCACTGGAATTGCATTATAACCAGGTAGAAAGGGGATCTATTCTAACACAAGG
 1509 C**AAGAAA**TGTGAATTCGATATCAAGCT

Figura 4 – continuação.

-147 TTTCTGCCCTGCTTTAATGTATACATCGTCGTCGCTACCATTGACCTCAGGAACACATGC

-87 AGAATCATTTGTGGTTTTCAATTCATACCCTGTATAAATTTGGCAATGCTTTCCTGAATC

-27 TCCTCAGTCTCTCTCTCTCCAGCGAAA**ATG**TTTCTCCAAGCTCGTTGTCTCGCTCTTCA
M F L Q A R C P R S S

34 CCACTGCTTTCGTGCAGGCTGCCTTCACCAACTACAGCTGAAGCGTTCGTTTCGCCGAGAT
P L L S C R L P S P T T A E A F V R R D

94 GCTGATGCACCTCAGTTCATCGCTCCTCGTGCCGCTAGCTGCAGCTTCCCTTCGCCACCT
A D A P Q F I A P R A A S C S F P S P P

154 AAGACTTCTAGCTTGAGCAAGCCTATTACTGTCACCGGTACCTTCGACGGTGGTAAACGTC
K T S S L S K P I T V T G T F D G G N V

214 CGTTTCGATCGTGGCTCTGGTGCTTGCAGG**gtacgct**acgctactcatgcaatggtgaga
R F D R G S G A C R

274 atacttactgaatctgccttagtggacaggccg**aaag**GAGGCCGACTCTGATGCTGTCTTC
E A D S D A V F

334 CTCCTCCAATCCGGCGCTACTCTGC**agta**cgttcattacttaccggactggtctcgatt
L L Q S G A T L Q

394 cttaccttgctgtgca**cag**GAATGTCGTCATTGGCGCCAACCAGGCCGAAGCGTCCAC
N V V I G A N Q A E G V T

454 TGTCTCGGACCTTGCAACTTGTACAACGTCTGGTTCGAAGACGCTGTGAAGACGCCATC
C L G P C N L Y N V W F E D V C E D A I

514 ACCATCAAGCAGAGCAGTGGGCGAGTCCAACATTGCCGGTGGTGGCGCCAAGAAGGCCGAT
T I K Q S S G Q S N I A G G G A K K A D

574 GACAAGGTTGTACAGCACAAACGGTGGCGGAACCGTTAAGATCGATTCTTTCTGTGTTTCAG
D K V V Q H N G G G T V K I D S F C V Q

634 GATTTTGGTAAACTCTACCGCTCATGTGGTAACTGCTC**gtcgtg**agtgacgcctttaca
D F G K L Y R S C G N C S

694 cgtggtggagctttcttaactatTTTTacat**ccag**CCAATACAAACGCACTGTTTCAGATC
Q Y K R T V Q I

Figura 5 – Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida do gene *pec2* que codifica pectato liase 2 em *C. pernicioso*. Possíveis elementos de regulação do promotor estão sublinhados, um possível TATA box e os códons de início de parada estão em destaque. Um possível sítio de poliadenilação está em negrito e sublinhado. Seqüências de nucleotídeos em letras minúsculas correspondem aos íntrons putativos, as letras minúsculas em negrito correspondem às seqüências 5' e 3' de processamento.

754 TCTCAAATTGATGCCAGCTCTGCCTCTGTGATCGCTGGTATAAACTCGAACTACGGTGAC
 S Q I D A S S A S V I A G I N S N Y G D

814 GTCGCCACGCTGGATAAGGCTCCATCAAGACCTCCAGCGTGAGCTCCATGTGTGATACC
 V A T L D K A S I K T S S V S S M C D T

874 TACCAGGTAAGCCTTACTTTCTGTTCACTGGTGCCGCTGACTGAACTCGGGGGATTACAA
 Y Q V S L T F C S L V P L T E L G G F T

934 GGG**TAA**CAGCAGCGGGGATGAGCCCAAGAAGCTCACTTCCAATGTTTCGAACGCAAAGTA
 G *

994 CGTGTTCTTTTCTGTTGGTACATTCAAGTCCTAATCCAGCTTTCTAGCTTGCAATTCTG

1054 **ATAAA**CTCCACACGGGAACCTTCAACTTTCAACGGGTCGGGACGATATGTACTCTATTGGT

1114 CAACTTTCTAATTGCGTCCACTGGATGTATTTAGTAATCCCATATTTAAGTTTAAACTTG

1174 CATGCTCGACGTGTAATGTTATTTCTACAAAAAAGGCGGACTATACCTACCTGTCCACTT

1234 TTGTTTGGGGCGTGGTGCCGAACTTCCCG

Figura 5 – continuação

Uma outra evidência que confirmou a correta identificação destes íntrons foi a presença de códons de parada no interior destes e a presença de seqüências consensos internas 5' N**PuCTPuAPy** 3', necessárias para o correto processamento dos íntrons (Gurr *et al.*, 1987; Unkles, 1992).

Ao contrário do observado em *pec1A* e *pec1B*, a região codificadora de *pec2* possui menor número de íntrons, sendo interrompida por apenas 3 íntrons, cujos tamanhos em nucleotídeos, são 66, 54 e 57. Os dois últimos íntrons de *pec1A* tiveram suas seqüências de processamento identificadas com base na comparação de sua seqüência com outros genes já seqüenciados pelo programa BLAST. O primeiro íntron foi localizado procurando-se pelas seqüências consenso de processamento dos íntrons, como 5' **GTPuNGPy** e 3' **PyAG**; cuja retirada fornecesse uma ORF compatível com a ORF obtida após a retirada dos outros íntrons. Da mesma forma as evidências que confirmam a correta identificação destes íntrons foram a presença de códons de parada no interior e a presença de seqüências consensos internas 5' N**PuCTPuAPy** 3', (Gurr *et al.*, 1987; Unkles, 1992).

Segundo Unkles (1992), em fungos filamentosos o tamanho dos íntrons varia de 49 a 85 pb. O tamanho dos íntrons encontrados em *pec1A* e *pec1B* é, com exceção do intron 2 de *pec1A*, semelhante ao encontrado em outros genes que codificam pectato liase em diferentes fungos filamentosos, entretanto, o número de íntrons foi superior ao já descrito nestes genes. Nos genes *pelA* de *F. solani* f. sp. *pisi* (González-Candelas e Kolattukudy, 1992) e *pelA* de *A. niger* (Benen *et al.*, 2000) foram encontrados 4 íntrons. Nos genes *pelB* de *F. solani* f. sp. *pisi* (Guo *et al.*, 1995a), *pelA* de *A. nidulans* (Dean e Timberlake, 1989b), *pel-1* e *pel-2* de *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* (Shih *et al.*, 2000) e *pl1* de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Huertas-González *et al.*, 1999) foram descritos dois íntrons. Em *pelD* de *F. solani* f. sp. *pisi* (Guo *et al.*, 1996) apenas um íntron foi encontrado.

A posição relativa dos íntrons dos genes *pec1A*, *pec1B* e *pec2* são comparados na Figura 6. A conservação das posições dos íntrons é considerada uma evidência de que um gene provavelmente derivou do outro recentemente, entretanto, entre os genes *pec1A* e *pec1B*, embora possuam o mesmo número de íntrons, a posição de nenhum dos 7 íntrons é conservada.

Na região terminadora dos genes que codificam pectato liase de *C. pernicioso* não foi encontrada nenhuma seqüência AATAAA, característica de

sítios de poliadenilação (Balance, 1986). Tais sítios de poliadenilação característicos também não foram encontrados nos genes *peB*, *peC* e *peD* de *F. solani* f.sp. *pisi* (Guo *et al.*, 1995a; Guo *et al.*, 1995b; Guo *et al.*, 1996); entretanto, estes autores encontraram *motifs* similares, como ATAAAA a 206 pb do códon de parada de *peB*, AACAAA a 175 pb do códon de parada de *peC*, e ATAAAAAA 136 pb do códon de parada de *peD*. Em *pec1B* foi encontrado 1 possível sitio alternativo de poliadenilação, como AAGAAA a 181 pb *downstream* ao códon de parada; em *pec1A* um possível sitio de poliadenilação foi encontrado a 180 pb e em *pec2* foi encontrado um seqüência de poliadenilação putativa a 114 pb do códon de parada.

Um típico TATA box foi identificado a -49 do códon de iniciação da tradução e entre o TATA box e códon de iniciação foi encontrada uma região rica em CT. Um possível CAAT box foi localizado na posição -65. Os demais cis-elementos não foram localizados, provavelmente por ser a região promotora seqüenciada muito pequena para que fosse possível a localização de todos cis-elementos.

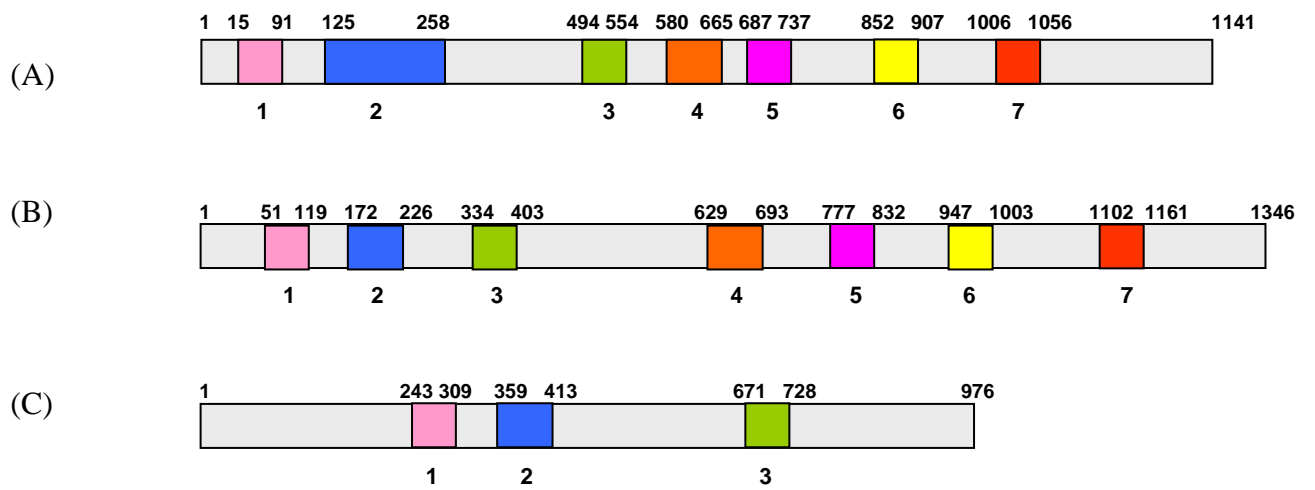


Figura 6 - Posições relativas dos íntrons putativos encontrados nos genes *pec1A* (A), *pec1B* (B) e *pec2* (C) de *C. perniciosus*.

4.3 – CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DEDUZIDAS DE *pec1A*, *pec1B* E *pec2* DE *C. pernicioso*.

Um polipeptídeo de 244 aminoácidos foi deduzido a partir da seqüência de *pec1A*, com uma massa molecular aparente de 26,19 KDa e ponto isoelétrico (pI) de 5,63. Um polipeptídeo de 307 aminoácidos foi deduzido a partir da seqüência de *pec1B*, com massa molecular aparente de 31,8 KDa (incluindo possíveis seqüências de peptídeo sinal) e pI de 6,37. A partir da seqüência de *pec2* foi deduzido um polipeptídeo de 253 aminoácidos, com massa molecular aparente de 26,5 KDa (incluindo possíveis seqüências de peptídeo sinal) e pI de 6,55. Na Tabela 1, as massas moleculares e pontos isoelétricos de algumas pectato liases são comparadas. A massa molecular de PEC1B é semelhante às massas moleculares de PYLA de *A. niger* e PEL-1 e PEL-2 de *C. gloeosporioides* f.sp. *malvae*. A massa molecular de PEC2 é semelhante às massas moleculares de PELA, PELB, PELC e PELD de *F. oxysporum* f.sp. *pisii* e PL-1 *C. F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Entretanto, com relação ao ponto isoelétrico PEC2 apresentou semelhança apenas com PEC1B de *C. pernicioso*, enquanto PEC1A apresentou o menor ponto isoelétrico.

Potenciais sítios de glicosilação também foram identificados, com base na seqüência consenso Asn-X-Thr/Ser (Gavel e von Heijne, 1990). Apenas um potencial sítio de glicosilação, Asp¹⁰⁶, Asp¹⁸⁶ e Asp¹⁸², foram, respectivamente, encontrados nos genes *pec1A*, *pec1B* e *pec2*.

O códon de iniciação da tradução foi AUG em todas as pectatos liases analisadas, assim como foi observado por Bazzoli (2003) quando comparou os códons de iniciação em genes que codificam pectina liase em fungos filamentosos. Foi observada uma preferência por pirimidinas antes do códon ATG de genes que codificam pectato liase (Tabela 2), como também observado por Bazzoli (2003), em genes que codificam pectina liase em diferentes fungos filamentosos. Para alguns genes não foi possível determinar a seqüência que precede o ATG por se tratar de seqüências do cDNA, entretanto, o nucleotídeo A foi encontrado em quase todas as posições -3, assim como descrito por Kozak (1983), exceto para os genes *peIC* e *peID* de *F. solani* f.sp. *pisii*. Entre os genes analisados todos os códons de parada foram utilizados pelo menos uma vez, entretanto, em 57% dos genes houve preferência por TAA.

Tabela 1. Comparação das massas moleculares e pontos isoelétricos entre pectato liases de diferentes fungos fitopatogênicos.

Organismo	Proteína *	Massa molecular (KDa)	Ponto isoelétrico
<i>A. nidulans</i>	PELA	40	4,2
<i>A. niger</i>	PLYA	32,2	4,4
<i>C. gloeosporioides</i> f.sp. <i>malvae</i>	PEL-1	33,2	8,41
<i>C. gloeosporioides</i> f.sp. <i>malvae</i>	PEL-2	32,8	8,29
<i>C. pernicioso</i>	PEC1A	26,2	5,63
<i>C. pernicioso</i>	PEC1B	31,8	6,37
<i>C. pernicioso</i>	PEC2	26,5	6,55
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	PL1	23,4	7,4
<i>F. solani</i> f.sp. <i>pisi</i>	PELA	26,3	ND
<i>F. solani</i> f.sp. <i>pisi</i>	PELB	25,6	ND
<i>F. solani</i> f.sp. <i>pisi</i>	PELC	23,6	ND
<i>F. solani</i> f.sp. <i>pisi</i>	PELD	24,5	ND

Tabela 2. Análise das seqüências próximas do início da tradução e preferência por códons de parada em genes que codificam pectato liase em fungos filamentosos.

Organismo	Gene*	Seqüência que envolve o ATG	Códon de parada	Número de acesso
<i>A. fumigatus</i>	ND**	ATGa	TAG	XM744120
<i>A. nidulans</i>	<i>pelA</i>	ATGa	TAA	XM653253
<i>A. niger</i>	<i>plyA</i>	ttacaATGa	TAA	AJ276331
<i>C. gloeosporioides</i> f.sp. <i>malvae</i>	<i>pel-1</i>	ccaccATGa	TAA	AF156983
<i>C. gloeosporioides</i> f.sp. <i>malvae</i>	<i>pel-2</i>	ccaaaATGa	TAA	AF156985
<i>C. pernicioso</i>	<i>pec1A</i>	aaacgATGc	TGA	-
<i>C. pernicioso</i>	<i>pec1B</i>	ccgcaATGa	TGA	-
<i>C. pernicioso</i>	<i>pec2</i>	cgaaaATGt	TAA	-
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	<i>pl1</i>	tcatcATGa	TAG	AF080485
<i>F. solani</i> f.sp. <i>pisi</i>	<i>pelA</i>	tcatcATGa	TAA	M94691
<i>F. solani</i> f.sp. <i>pisi</i>	<i>pelB</i>	tcaccATGa	TAG	U13051
<i>F. solani</i> f.sp. <i>pisi</i>	<i>pelC</i>	tcgccATGg	TAA	U13049
<i>F. solani</i> f.sp. <i>pisi</i>	<i>pelD</i>	ccaacATGc	TAA	U13050
<i>Giberella zeae</i>	ND	ATGc	TAG	AY648859
<i>Glomerella cingulata</i>	ND	tcaagATGa	TAA	AF052632

* Para referências consultar texto.

** ND = não determinado

Em *pec1B*, exceto para UGU, códon para cisteína e CGG, códon para arginina todos os demais códons foram utilizados pelo menos uma vez, e poucos foram preferenciais (Tabela 4), como GUC para valina, AAC para asparagina e GGU para glicina. Houve uma forte preferência por purinas (66%) (A ou C) na primeira posição e por pirimidinas (69%) (U ou C) na terceira posição, já na segunda posição houve um equilíbrio entre purinas (51%) e pirimidinas (49%).

Ao contrário do encontrado nos genes *pec1A* (Tabela 3) e *pec1B* (Tabela 4), foi observada em *pec2* uma preferência por purinas antes do códon ATG de genes que codificam pectato liase (Tabela 5). Da mesma forma, ao contrário do descrito por Kozak (1983), o nucleotídeo A não foi encontrado na posição -3, assim como nos genes *peIC* e *peID* de *F. solani* f.sp. *pisi*.

Tabela 3. Análise de códons (letras maiúsculas) preferenciais na região codificadora do gene *pecA* de *C. pernicioso*. Os números representam quantas vezes o códon foi utilizado.

UUU	Phe	4	UCU	Ser	5	UAU	Tyr	3	UGU	Cys	0
UUC	Phe	6	UCC	Ser	6	UAC	Tyr	5	UGC	Cys	0
UUA	Leu	2	UCA	Ser	6	UAA	parada	0	UGA	parada	1
UUG	Leu	3	UCG	Ser	3	UAG	parada	0	UGG	Trp	5
CUU	Leu	1	CCU	Pro	0	CAU	His	3	CGU	Arg	2
CUC	Leu	7	CCC	Pro	3	CAC	His	3	CGC	Arg	2
CUA	Leu	0	CCA	Pro	3	CAA	Gln	3	CGA	Arg	1
CUG	Leu	1	CCG	Pro	2	CAG	Gln	4	CGG	Arg	2
AAU	Ile	3	ACU	Thr	7	AAU	Asn	4	AGU	Ser	5
AUC	Ile	7	ACC	Thr	7	AAC	Asn	15	AGC	Ser	8
AUA	Ile	0	ACA	Thr	4	AAA	Lys	3	AGA	Arg	0
AUG	Met	2	ACG	Thr	1	AAG	Lys	7	AGG	Arg	2
GUU	Val	7	GCU	Ala	7	GAU	Asp	11	GGU	Gly	10
GUC	Val	13	GCC	Ala	4	GAC	Asp	6	GGC	Gly	5
GUA	Val	1	GCA	Ala	3	GAA	Glu	3	GGA	Gly	7
GUG	Val	0	GCG	Ala	2	GAG	Glu	4	GGG	Gly	1

Tabela 4. Análise de códon (letras maiúsculas) preferenciais na região codificadora do gene *pe1B* de *C. pernicioso*. Os números representam quantas vezes o códon foi utilizado.

UUU	Phe	5	UCU	Ser	9	UAU	Tyr	5	UGU	Cys	0
UUC	Phe	8	UCC	Ser	9	UAC	Tyr	9	UGC	Cys	2
UUA	Leu	1	UCA	Ser	5	UAA	parada	0	UGA	parada	0
UUG	Leu	7	UCG	Ser	2	UAG	parada	1	UGG	Trp	7
CUU	Leu	4	CCU	Pro	3	CAU	His	5	CGU	Arg	4
CUC	Leu	9	CCC	Pro	3	CAC	His	6	CGC	Arg	2
CUA	Leu	2	CCA	Pro	2	CAA	Gln	5	CGA	Arg	3
CUG	Leu	0	CCG	Pro	1	CAG	Gln	5	CGG	Arg	0
AAU	Ile	7	ACU	Thr	9	AAU	Asn	5	AGU	Ser	7
AUC	Ile	9	ACC	Thr	6	AAC	Asn	22	AGC	Ser	9
AUA	Ile	2	ACA	Thr	5	AAA	Lys	6	AGA	Arg	2
AUG	Met	3	ACG	Thr	3	AAG	Lys	13	AGG	Arg	3
GUU	Val	12	GCU	Ala	11	GAU	Asp	10	GGU	Gly	18
GUC	Val	18	GCC	Ala	10	GAC	Asp	8	GGC	Gly	9
GUA	Val	3	GCA	Ala	8	GAA	Glu	4	GGA	Gly	10
GUG	Val	3	GCG	Ala	2	GAG	Glu	5	GGG	Gly	1

Tabela 5 – Análise de códons (letras maiúsculas) preferenciais no gene *pec2* de *C. pernicioso*. Os números representam quantas vezes o códon foi utilizado.

UUU	Phe	4	UCU	Ser	10	UAU	Tyr	2	UGU	Cys	9
UUC	Phe	14	UCC	Ser	8	UAC	Tyr	6	UGC	Cys	7
UUA	Leu	4	UCA	Ser	6	UAA	parada	1	UGA	parada	0
UUG	Leu	5	UCG	Ser	3	UAG	parada	0	UGG	Trp	3
CUU	Leu	8	CCU	Pro	10	CAU	His	2	CGU	Arg	6
CUC	Leu	6	CCC	Pro	0	CAC	His	3	CGC	Arg	5
CUA	Leu	1	CCA	Pro	6	CAA	Gln	9	CGA	Arg	3
CUG	Leu	8	CCG	Pro	1	CAG	Gln	11	CGG	Arg	4
AAU	Ile	6	ACU	Thr	9	AAU	Asn	3	AGU	Ser	3
AUC	Ile	8	ACC	Thr	8	AAC	Asn	11	AGC	Ser	9
AUA	Ile	3	ACA	Thr	3	AAA	Lys	4	AGA	Arg	0
AUG	Met	5	ACG	Thr	2	AAG	Lys	9	AGG	Arg	3
GUU	Val	6	GCU	Ala	12	GAU	Asp	11	GGU	Gly	13
GUC	Val	10	GCC	Ala	13	GAC	Asp	7	GGC	Gly	6
GUA	Val	6	GCA	Ala	2	GAA	Glu	8	GGA	Gly	4
GUG	Val	3	GCG	Ala	2	GAG	Glu	1	GGG	Gly	4

Em *pec2*, exceto para CCC, códon para prolina e AGA, códon para arginina todos os demais códons foram utilizados pelo menos uma vez, e poucos foram preferenciais (Tabela 5), como GUC para valina, da mesma forma que para *pec1B*, UUC para fenilalanina e GGU para glicina, assim como para *pec1B* (Tabela 4). Ao contrário de *pec1B* houve uma forte preferência apenas por pirimidinas (66%) (U ou C) na terceira posição, já nas primeiras e segundas posições houve um equilíbrio entre purinas e pirimidinas.

A identidade entre as seqüências de pectato liase de diferentes pectato liases de fungos filamentosos comparadas com pectato liases de *C. pernicioso* variou entre 75 e 3,12% (Tabela 6). PEC1A e PEC1B apresentaram maior identidade com pectato liase A de *A. fumigatus*, enquanto PEC2 apresentou

maior identidade, 40,3 e 37%, respectivamente, com PELC e PELD de *F. solani* f.sp. *pisii*. Quando foi comparada a identidade entre as pectato liases de *C. perniciosus*, foi observada maior identidade, 60,9%, entre PEC1A e PEC1B, e pequena identidade, 4,3% e 4,6%, respectivamente, entre PEC1A e PEC2 e entre PEC1B e PEC2. Uma baixa identidade também foi observada entre as pectato liases de *F. solani* f. sp. *pisii* e as pectato liases de *A. niger* e *A. nidulans*. Estas diferenças entre as seqüências de aminoácidos foram confirmadas quando foi realizado o alinhamento múltiplo entre as seqüências de aminoácidos e a análise filogenética.

Tabela 6. Porcentagem de identidade de aminoácidos de 8 pectato liases de fungos filamentosos. Valores foram obtidos a partir do alinhamento entre os aminoácido usando o programa ClustalW.

ENZIMA	PEC1A	PEC1B	PLYA*	PEL A*	PELB*	PELD*	PELC*	PEC2**
PEC1A**		60,9	40,8	41,7	5,5	5,5	5,0	4,3
PEC1B**			52,9	54,1	7,2	6,3	5,7	4,6
PLYA				75,5	6,3	6,0	6,9	5,3
PEL A					61	58	67	5,1
PELB						37,0	42,6	31,2
PELD							58,6	37,0
PELC								40,3
PEC2								

* Números de acesso: PLYA - CAC33162.1| *plyA* [*Aspergillus niger*]; PEL A - XP_749213.1| pectate lyase A [*Aspergillus fumigatus* Af293]; PELB - AAA87383.1 - *pelB* [*Fusarium solani* f. sp. *pisii*], PELD - AAC49420.1 – *pelD* [*Fusarium solani* f. sp. *pisii*], PELC - AAA87382.1| *pelC* [*Fusarium solani* f. sp. *pisii*]. ** Pectato liases de *C. perniciosus*.

A partir do alinhamento múltiplo (Figura 7) entre as seqüências de aminoácidos de diferentes pectato liases de fungos filamentosos foi possível identificar apenas um resíduo conservado, Gly, e alguns poucos resíduos onde há pouca variação, entretanto nenhuma região consenso pode ser identificada.

Entretanto, observa-se, claramente, que os aminoácidos das 7 primeiras proteínas possuem vários resíduos de aminoácidos em comum. O mesmo pode também ser observado entre as 6 últimas pectato liases. Esta aparente separação de pectato liase em 2 grupos de fungos ascomicetos foi evidenciada pela análise filogenética (Figura 10), sugerindo portanto, que tais pectato são, significativamente, diferentes em seus aminoácidos. Com base nestas observações e no agrupamento fornecido pela análise filogenética foram realizados 2 novos alinhamentos múltiplos entre as seqüências de aminoácidos (Figura 8 e 9).

O alinhamento múltiplo de várias proteínas relacionadas a pectato liase revelou a presença de potenciais sítios catalíticos, como resíduos conservados de aminoácidos, não só em torno do sítio de ligação do íon cálcio, bem como em uma região denominada vWiDH, presente no centro da “ β -hélice paralela” (Heffron *et al.*, 1995; Henrissat *et al.*, 1995). A seqüência de aminoácidos vWDIH foi encontrada apenas nos genes *pec1A* e *pec1B* (Figura 8). Estas seqüências são relatadas, além de pectato liase de fungos e bactérias, em pectina liases, como em pectina liase PLG2 de *P. griseoroseum* (Bazzoli, 2003). Mutações sítio direcionadas realizadas em *peIC* de *E. crhysanthemi* demonstraram que a função pectinolítica envolve os aminoácidos próximos ao sítio de ligação do cálcio e não as seqüências de aminoácidos vWiDH (Kita *et al.*, 1996). Os mesmos autores sugerem que a seqüência vWiDH está envolvida com a secreção ou montagem da proteína no periplasma, uma vez que enzimas com mutações nesta região permaneceram associadas à membrana plasmática bacteriana e foram pobremente exportadas para o periplasma.

Cpern PEC1A	1	-----	1
Cpern PEC1B	1	-----	1
Aniger PLA	1	-----MTNFKWIVAAAGL	13
Afumig PELA	1	-----MKFVATLIACG--	11
Cgloesp PEL1	1	-----MKFTAALATV	10
Glom PLB	1	-----MKFTGSPLLWPSW	13
Cgloesp PEL2	1	-----MKFTG--LASWAL	11
Foxys PL1	1	-----	1
Gibb PL	1	MRTSTLLTIANSGETAFAAVQMYNQCGGSAYS GDKCECPSTCVEVSKWYSQCIPDSSSKK	60
Fsolani PELB	1	-----	1
Fsolani PELD	1	-----	1
Fsolani PELC	1	-----	1
Cpern PEC2	1	-----	1
	1		1
Cpern PEC1A	1	-----MPQTLNFWWIRRH-----DYSTISG-----	21
Cpern PEC1B	1	-----MKWFASVVALFAVQAVVRASV-----NDAANIGYATLNGGTSGGSGGTQTTVTLSLAL	53
Aniger PLA	14	LFGQVLAAPTATSTHAKRATVS-----DAAFYASLNGGTGGAGGTTTTVSSYAAF	65
Afumig PELA	12	LSGLALAAPTATVNSL GKRAAD-----DAAFYASLNGGTGGAGGTTTTVSSYAAF	63
Cgloesp PEL1	11	FAGLVAATPTPTVDNVADRAHLVKRASISDKATIGYATLNGGTSGGAGGTTVTVSSLAEF	70
Glom PLB	14	LPLPAPPPLPSVTRRRDRPTV GKRAAITDACDVGYG---AGTGGSGGTTTTVSTPAQF	70
Cgloesp PEL2	12	LAI AASASPTPTVE---DGRVLSKRAAVTDACNIGYCTQNGGKGGAGGTTTTVTSLAQL	68
Foxys PL1	1	-----	1
Gibb PL	61	AASVEKTD FDFRAF GFGFPAPPQAPAEEDNSQGNNDTPAPFLSTIPTPEGPTNTPEQP	120
Fsolani PELB	1	-----	1
Fsolani PELD	1	-----	1
Fsolani PELC	1	-----	1
Cpern PEC2	1	-----MFLQARCPRSS	11
	1		1
Cpern PEC1A	21	-----NTVVKVGPTQPLSAS-SGSQLVGVGLRVLEVS NVI IR	57
Cpern PEC1B	54	TSALS--GSAKVVII S--GESGNTVVKVGNPTTVIGK-SGSQLVGVGLRVIDVSNVI IR	108
Aniger PLA	66	TSAVS--GDDAKVVYVDGTIKQTADQVKIGSNTSIIIGKDANAILEGFGVLVKEKENVI IR	123
Afumig PELA	64	TAAVS--SDAKVVYVSGPIKQSAKQVKG SNTSIIIGKDSTAVLEGFGLLVKEKSNVI IR	121
Cgloesp PEL1	71	TAAVNEKDASAKVVVVKG-VIKGAVNVRIGSNKSVIGL-PGAGFDGVALHARRQSNII IR	128
Glom PLB	71	TAAAT--SDEKAVIVVKG-AITGATKVKVGSNKSIIIGR-AGS SLTGVL YINKQENVIVR	126
Cgloesp PEL2	69	SAAAN--ASGPGIIVVQG-NIVGKAKVQVGS DKTIVGK-SGS SLEGI GLTILGQKNVIVR	124
Foxys PL1	1	-----MKYTAILALAGVSSAAVTKTLPKSAGATSFPTAVPVKG--SYDGG	43
Gibb PL	121	VDDPVDTI IANPTTAPTSEPIETGSGSGSVAITRTIPASSGATAVATAIPVSG--ELDGG	178
Fsolani PELB	1	-----MKASALI IAAVTGASAAVTVLPASAGVQSEPTAIPVRKGDKYNGG	46
Fsolani PELD	1	-----MHAPSI VTVLAALPAAMACLG YTG GVPKATGSKSLSAPKTLKKEVFDAG	50
Fsolani PELC	1	-----MACLGYTGGVPKPTDHI SNSKVI EVKAGQVYDGG	34
Cpern PEC2	12	PLLSCLRLSPPTTAAEFVRRDADAPQFIAPRAASCSPSPPKTSSLSKPIITVGT--TFDGG	69
	1		1
Cpern PEC1A	58	NVKISKVLAEAGDAIGVQASQVWIDHADLSSDRD-HDKDFKS-----YKVSNS	105
Cpern PEC1B	109	NVKISKVLADAGDAIGVQAASQVWIDHVDLSSDRD-HDKDYDGLLDITHGCTGVTVSNS	167
Aniger PLA	124	NLGVSKVLADNGDAIGVQYSNNVWIDHCDVSSDRD-HDKDYDGLLIDITHGSDYVTVSNT	182
Afumig PELA	122	NLGVKVLAEAGDAIGVQYSNNVWVDHVDVSSDRD-HDKDYDGLLIDVTHAADYVTVSNT	180
Cgloesp PEL1	129	NIKSTNVLASTGDGLKIEESTNVVVDHSEFSSALV-ADKDYDGLVDASHGADYITISY	187
Glom PLB	127	NMKISKVLADNGDRIGIQASSKVVDHCDLSSDKKNNKDYDGLLDITHASMAVTVSNT	186
Cgloesp PEL2	125	NMKIGKVEAAYGDAITIQLSKNVVDHCELYATREGVDKDFYDGLADLSHAADWVTVSNV	184
Foxys PL1	44	MKRFRSPSVCQSQSETGEKDAMFILENGATLSNVIIGASQAEG---VHCKGTCTLNNV	99
Gibb PL	179	MAYYDRSPSVCKEQEETGEADAMFILEGDGATLRNVIIGPGQAEG---VHCKGTCTLNNV	234
Fsolani PELB	47	MKRFRNPTTCKDQYETGEKDAFILEDGATLSNVIDRSSGEG---VHCKGTCTLNNV	102
Fsolani PELD	51	WVRYDRG-VKCSQAEGGSKDAVFILEEGATLRNVIIGANQREG---IHCKGSCNIEFA	105
Fsolani PELC	35	WAKYDRGSGACKGQNEGGDKDAVFLHEGATLKNVIIGKQDQSEG---VHCKGHCTLEFV	90
Cpern PEC2	70	NVRFDRGSGACR---EADSDAVFLQSGATLQNVVIGANQAEG---VTCLGPCNLNVN	121
	1		3

Figura 7. Comparação das seqüências de aminoácidos de pectato liases isoladas de 8 espécies de fungos filamentosos. Resíduos conservados estão identificados por (*), resíduos onde há pouca variação estão identificados por (:) e (.) .

Cpern PEC1A	105	-TTTGRSASLVGHSDSNGDEDT-KITVTVYVGNYSNLNSRTPSFRFGHGHI FN NYFESNS	163
Cpern PEC1B	168	KLYNHWKASLVGHSDSNGSEDT-KITVTYAANYWSNLNSRTPSFRFGHGHI FN NYFESNS	226
Aniger PLA	183	FIHDHWKASLVGHSDSNEDEDSGHLTVTYANNYWNVNSRAPSLRFGTGHVYNSY YLDVS	242
Afumig PELA	181	YIHDHWKASLVGHSDNNGDEDKGHLRVTYANNYWSNINSRAPSLRFGTGHVYNSY FENVS	240
Cgloesp PEL1	188	YFHDHWKTSLIGHSENNGAEDSGHLRVTYANNYWANFGSRGSPVRFGTAHIYNSY YLNAN	247
Glom PLB	187	YIHDHYKGSLVGHSDSNAEDTGKLYVTYANNHWYNVSRNPSVRFGNVHI FN NYAEKLE	246
Cgloesp PEL2	185	YFHDHSGSLVGHSDSNAEDTGTLRVTYANNHWYNIRSRGPLLRFGTAHVYNNYVNGMD	244
Foxys PL1	100	WWADVCEDAVTLKQTSGETSYINGGGAFHASDKIVQFNGRGTVQIKDFY AEDYKGLVRS CG	159
Gibb PL	235	WFEDVCEDAITLKQKSGTSSIIRGGGAFHAADKVVQFNGRGTVEISDFYVVEDYKGLVRS CG	294
Fsolani PELB	103	WWADVCEDAATFKQKSGTSTINGGAFSAQDKVLQFNGRGTNLVNDFYVQDYKGLVRCNG	162
Fsolani PELD	106	WFEDVCEDAISILGSG-TANIIGGGAYHASDKVIQHNGCGHVNI VNFYANDYKGVYRSCG	164
Fsolani PELC	91	WFEDVCEDAISLAGK--ESWIIGGGAYHASDKVVQHNGCGTVNIINFYVVEDYKGLYRSCG	148
Cpern PEC2	122	WFEDVCEDAITIKQSSQSNIAAGGAKKADDKVVQHNGGGTVKIDSFCVQDFGKLYRSCG	181
	3	. :	6
Cpern PEC1A	164	D-GINTRDGAQLLVENNVWSDPKKPLYSTDE----GFAVSKNNDFG-----GGEDTAPAG	213
Cpern PEC1B	227	D-GINTRDGAQLLVENNVWSAPKKPLYSTDE----GFAVAKGNDFG-----GGSNEAPAG	276
Aniger PLA	243	D-GINTRDGAQLLVESNQFVDSKKALYSTDD----GYAVSNLNDFG-----DSANTAEAG	292
Afumig PELA	241	D-GINTRDGAQVLVEENQFVGSKALYSTDD----GYAVERDNDFG-----GAKNTALQG	290
Cgloesp PEL1	248	S-AINTRQNAQVLVQSNVFKNTEPLMTKDSDI-VGYAVAIDNDFG-----GAANTAPVG	300
Glom PLB	247	TSGVNTRMGAQLLIESVFSDTTKAVTFLDS-KSTGYAVVNDVDLG-----GSTNDRPQG	300
Cgloesp PEL2	245	T-GLNSRMGAQALIQSSLFENTGKKAIFTESKEVGYVVAIDVTLTG----ESANTAPLG	299
Foxys PL1	160	NCKD-NGGPRNVVISGSVAVDGGVLCGINTN---YGDTCKITSSCQN---KGKYCDRYEG	212
Gibb PL	295	NCKD-NGGPRNVVIENVAAVNGGVLGINTN---YGDCTITSNACQD---KGNKCDLFEG	347
Fsolani PELB	163	NCEG-NGGPRNINIKGVVAKNGGELCGVNHN---YGDVCTITDSCQN---KKGKSCQAYTG	215
Fsolani PELD	165	NCKGNTNCKRSVHMEGTTAVKGGELIGINTN---YGDKATYSNNCY---PKTQCQGYKG	217
Fsolani PELC	149	NCS---KQCKRNVIIEGVTAKNGGELAGINAN---YGDATLKNVCAD---AKQKCTMYNG	200
Cpern PEC2	182	NCS---QYKRTVQISQIDASSASVIAGINSN---YGDVATLDKASIKTSSVSMCDTYQV	235
	6	. : . *	8
Cpern PEC1A	214	NFNT--APYSYSMLATGSVASSVTGTAGQTLAF	244
Cpern PEC1B	277	NFNS--APYSYSLLAVGSVASSVKANAGQTLGF	307
Aniger PLA	293	TLTS--MPYDYTLGGSANVKA AVVGTAGQTLTF	323
Afumig PELA	291	TLTT--VPYSYSLLGSSKVKSAVVGVAGQTLKF	321
Cgloesp PEL1	301	TLNANSPPYAYTLGGSANVVANVLANAGQKLTf	333
Glom PLB	301	TFTK--PDYSYTLGSSKVKAAVVGTAGQTLTF	331
Cgloesp PEL2	300	KLTASSPPYSYLLGGSANVKA AVTKEAGQTLGF	332
Foxys PL1	213	N----SSGAEPSKIG-SGPDGKYCTTSGVTTSC	240
Gibb PL	348	N----SDGSEPTKLS-SGPDGTSCKVDSFAETC	375
Fsolani PELB	216	N----DQKKEPPKFGPAGDNGKSLVKSLRTNC	244
Fsolani PELD	218	CDKS-KGECEPSKAA-----KC-----	233
Fsolani PELC	201	C----AGGCEPKKIG-----ACPA-----	215
Cpern PEC2	236	SLTF-CSLVPLTELG-----GFTG-----	253
	8	.	8

Figura 7. Continuação

Seqüências consenso vWiDH não foram encontradas nas proteínas PELA, PELB, PELC e PELD de *F. solani* f.sp. *pisi* (Guo *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1995a; Gonzalez-Candelas e Kolattukudy *et al.*, 1992). Na verdade os autores que fizeram a caracterização destas proteínas sugerem que as pectato liases de *F. solani* f. sp. *pisi* pertencem à um novo grupo de pectato liase. Estas enzimas apresentam alta similaridade entre si e quase nenhuma similaridade com outras pectato liases já descritas. Interessantemente, PEL2 de *C. pernicioso* também não possui a seqüência vWiDH (Figura 9) e apresenta alta homologia com PELD e PELC de *F. solani* f. sp. *pisi*. Esta observação sugere que *C. pernicioso* possui pelo menos uma pectato liase pertencente a este novo grupo.

Uma análise filogenética também foi realizada com pectato liases identificadas em diferentes fungos filamentosos e o dendograma está demonstrado na figura 8. As estimativas dos parâmetros: 0,835 no índice de consistência (CI), 0,163 para o índice de homoplasia (HI) e valores de *bootstrap*, usando 1000 replicatas, indicam a confiabilidade dos dados para a análise filogenética. Embora poligalacturonases já tenham sido isoladas de fungos basidiomicetos (Williams *et al.*, 2002), nenhuma pectato liase está disponível no banco de dados até o presente momento, sendo este o primeiro relato de isolamento e caracterização de um gene que codifica pectato liase em basidiomicetos.

A análise filogenética resultou na formação de 3 grupos sendo um grupo formado por pectato liase de bactérias e 2 grupos distintos formados por pectato liase de fungos filamentosos. Uma análise filogenética realizada sem os genes que codificam pectato liase de *C. pernicioso* demonstrou o mesmo padrão de separação de grupos entre ascomicetos (dados não mostrados); sendo o mesmo observado por Shih *et al.* (2000). PEC1A e PEC1B ficaram no mesmo grupo ao qual apresentou similaridade pela análise no BLAST e pelo alinhamento múltiplo (Figuras 7 e 8). PEC2 também ficou agrupada com as pectato liases de *F. solani* f. sp. *pisi*, cujos genes são consideravelmente diferentes de outros genes *pel* já descritos (Guo *et al.*, 1995a; Guo *et al.*, 1995b; Guo *et al.*, 1996).

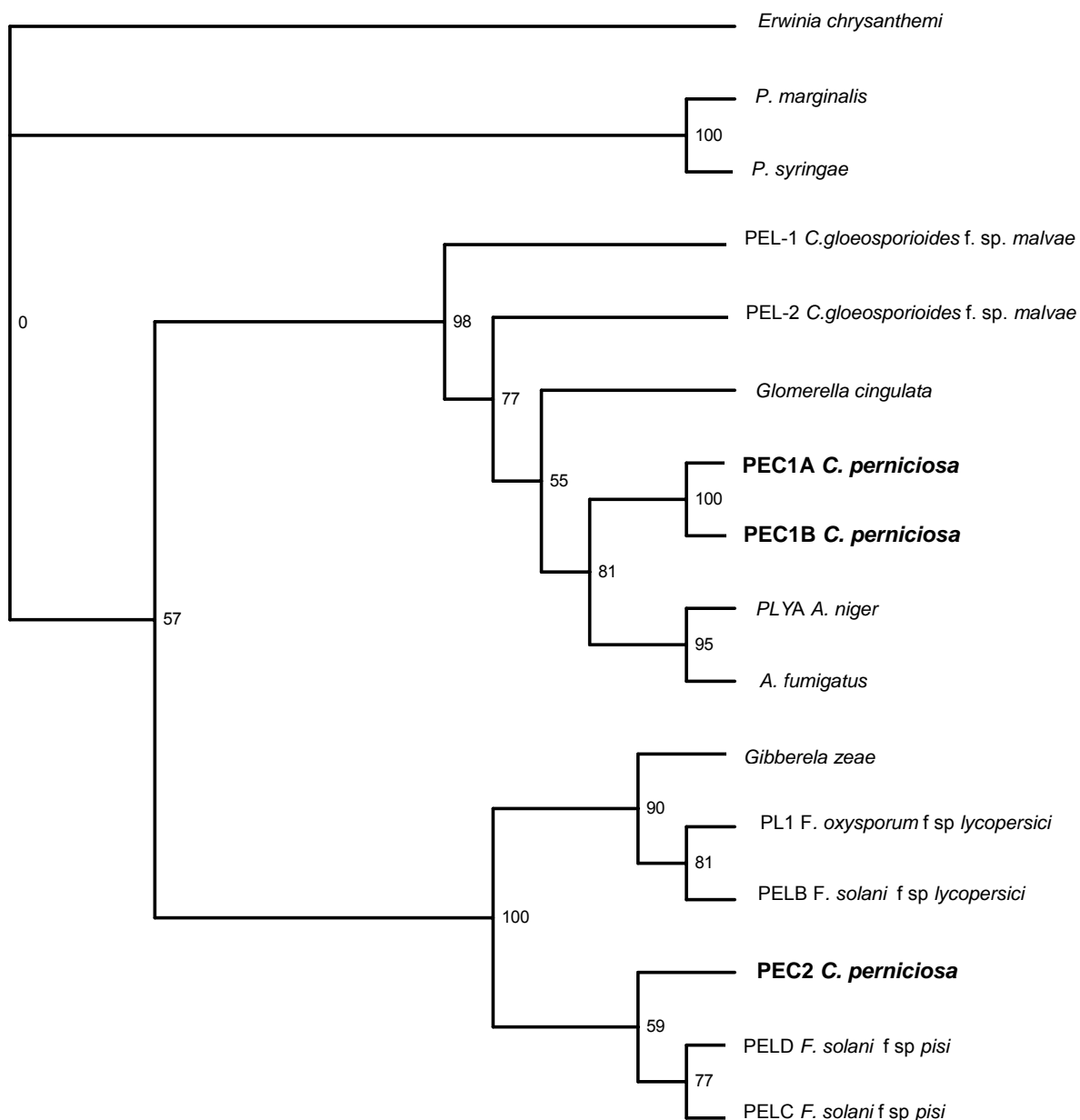


Figura 10. Análise filogenética de pectato liases de bactérias, de *C. pernicioso* e de outros fungos filamentosos. Números acima e abaixo de cada nó indicam a porcentagem de vezes em que cada ramo aparece em análises de *bootstrap* com 1000 replicatas. Números de acesso: AAA87383.1 - *peIB* [*F. solani* f. sp. *pisi*], AAC49420.1 - *peID* [*F. solani* f. sp. *pisi*], AAA87382.1| *peIC* [*F. solani* f. sp. *pisi*], CAC33162.1| *plyA* [*A. niger*], AAD09857.1| pectate lyase B [*G. cingulata*], AF156985_1 *peI-2* [*C. gloeosporioides* f. sp. *malvae*], AF156983_1 *peI-1* [*C. gloeosporioides* f. sp. *malvae*], XP_749213.1| pectate lyase A [*A. fumigatus* Af293], AAC64368.1| *pI1* [*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*], AAV66343.1| putative pectate lyase [*G. zeae*], AAC60448.1| pectate lyase [*P. marginalis*], AAL56657.1| pectate lyase [*P. syringae* pv. *Glycinea*], CAA10570.1| pectate lyase [*E. chrysanthemi*].

4.4 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *pec1A*, *pec1B* E *pec2* *IN VITRO*

A expressão de genes pectinolíticos é regulada por diversos fatores, muitas vezes intrinsecamente relacionados, como pH, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, tipo de nutrição (necrotrófico, biotrófico ou hemibiotrófico) e tipo de hospedeiro, que por sua vez pode ser afetada, ainda, pelo tipo de tecido vegetal infectado, pela fase de infecção em hemibiotróficos e o estágio da doença.

A expressão dos genes que codificam pectato em *C. perniciosus* foi avaliada, por RT-PCR, em diferentes condições, como na presença das seguintes fontes de carbono: glicose, pectina, pectina + glicose e polpa de cacau, bem como em pectina com valores de pH 4,0, 6,8 e 8,0. A expressão dos genes *pec1A* e *pec1B* foram detectadas em todas as condições avaliadas (Figuras 11 e 12), enquanto a expressão de *pec2* não foi detectada em quaisquer das condições (Figura 13). A ausência de expressão na polpa do cacau sugere que algum fator necessário à indução deste gene está ausente no extrato de cacau, embora *C. perniciosus* seja capaz de infectar os frutos. As observações de que o gene *pec2* de *C. perniciosus* apresentou alta similaridade com o gene *peID* de *F. solani* f. sp. *pisi*, expresso unicamente durante a infecção de plantas de ervilha, e a ausência de expressão de *pec2* nas diferentes condições avaliadas sugerem fortemente que este gene também é expresso somente durante a interação com o cacau.

A expressão do gene *peID* de *F. solani* f. sp. *pisi*, bem como da proteína PELD, não foi detectada no fungo cultivado em glicose, pectina, extrato do epicótilo ou em preparações da parede celular (Guo *et al.*, 1996).

Existem outros relatos de genes que são diferencialmente expressos *in vitro* e *in vivo*. Em *B. cinerea*, a expressão dos 7 genes que codificam poligalacturonases é diferencial durante a infecção (ten Have *et al.*, 2001). Cano-Canchola *et al.* (2000) observaram que a expressão seqüencial e diferencial de vários genes em *U. maydis* correlaciona-se com uma especificidade do tecido infectado. Os primeiros estágios da doença, que correspondem a clorose dos tecidos, correlacionam-se com alta atividade de pectato liase, posteriormente tem-se a expressão de poligalacturonase e,

finalmente, o surgimento das galhas coincide com a máxima atividade de celulase.

Os sinais da planta envolvidos na indução de alguns genes são os aspectos menos compreendidos dos processos de infecção, entretanto, recentemente, Yang *et al.* (2005) identificaram os sinais indutores da expressão de *peID* como sendo homoserina e asparagina, dois aminoácidos unicamente encontrados em grande quantidade em mudas de ervilhas. O aminoácido asparagina, assim como o etileno, foi uma das moléculas que Scapari *et al.* (2005) detectaram que se acumulam durante a senescência das vassouras verdes, entretanto, se *pec2* é expresso durante a patogênese e se o aminoácido asparagina também participa na indução da expressão deste gene permanece a ser esclarecido.

A expressão dos genes *pec1A* e *pec1B* na presença de glicose e em diferentes valores de pH sugere uma ausência de regulação catabólica e por pH do meio. Embora na região promotora de *pec1B* tenha sido encontrada uma seqüência de ligação do regulador por pH, *pacC*, as regiões promotoras seqüenciadas destes genes foram pequenas para analisar a presença de outros cis-elementos envolvidos na regulação. Para verificar, portanto, se há diferenças na expressão destes genes reações de RT-PCR semi-quantitativo foram realizadas. As reações de amplificações foram realizadas até o ciclo número 25, uma vez que Pereira (2005) observou que a amplificação do gene controle *snf1* ocorria, logaritmicamente, entre os ciclos 24 e 26, e que até o ciclo 25 a intensidade dos produtos amplificados estariam correlacionados com a concentração inicial de cDNA. Uma vez que produtos da amplificação, após 25 ciclos, não puderam ser observados em gel de agarose, optou-se pela transferência e hibridização dos possíveis produtos de amplificação (Figuras 14 e 15). A hibridização confirmou a expressão destes genes em todas as condições, entretanto diferenças nos níveis de expressão puderam ser detectadas.

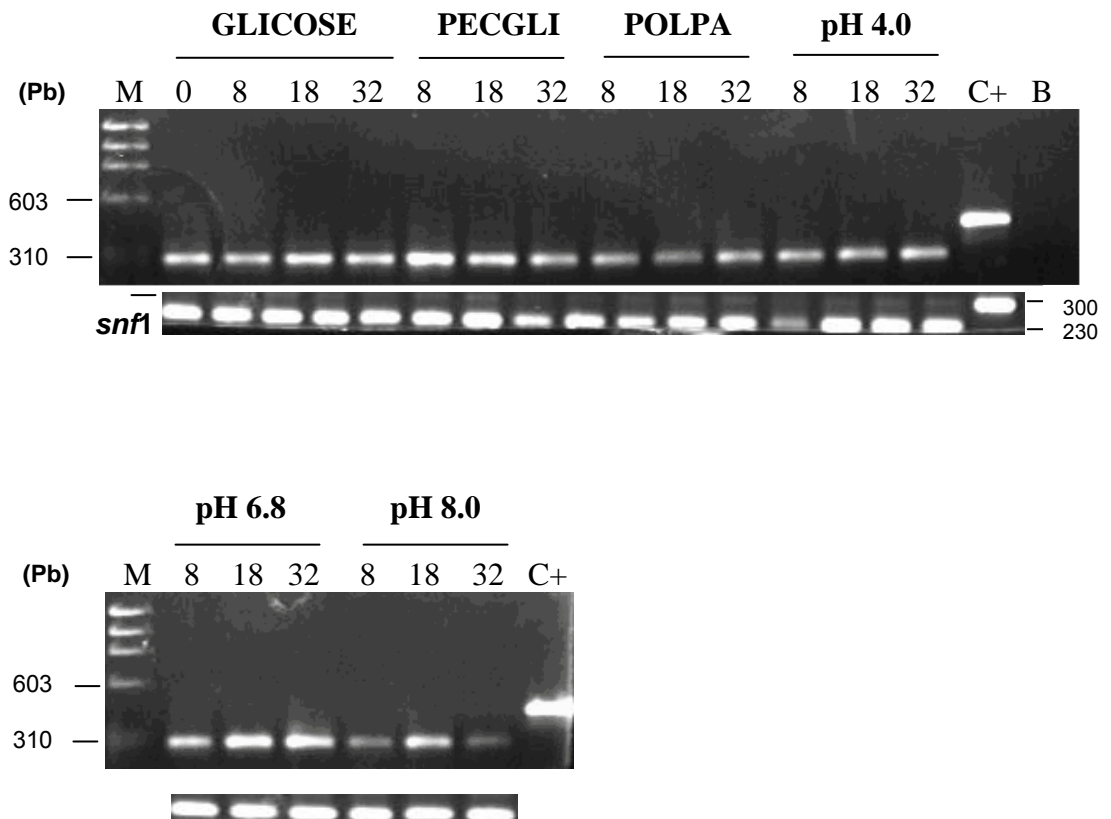


Figura 11 – Análise da expressão do gene *pec1A* por RT-PCR em diferentes condições: Glicose, Pectina + Glicose (PECGLI), Pectina em pH 4.0, 6.8 e 8.0. RNA total foi extraído nos tempos 0 (micélio recolhido antes da transferência para novo MS), 8 (8h após a transferência), 18 (18h após a transferência) e 32 (32h após a transferência). (C+) Controle positivo, DNA total de CP02; (B) Controle negativo, sem adição de cDNA e (M) Marcador Φ X174 clivado com enzima *HaeIII*.

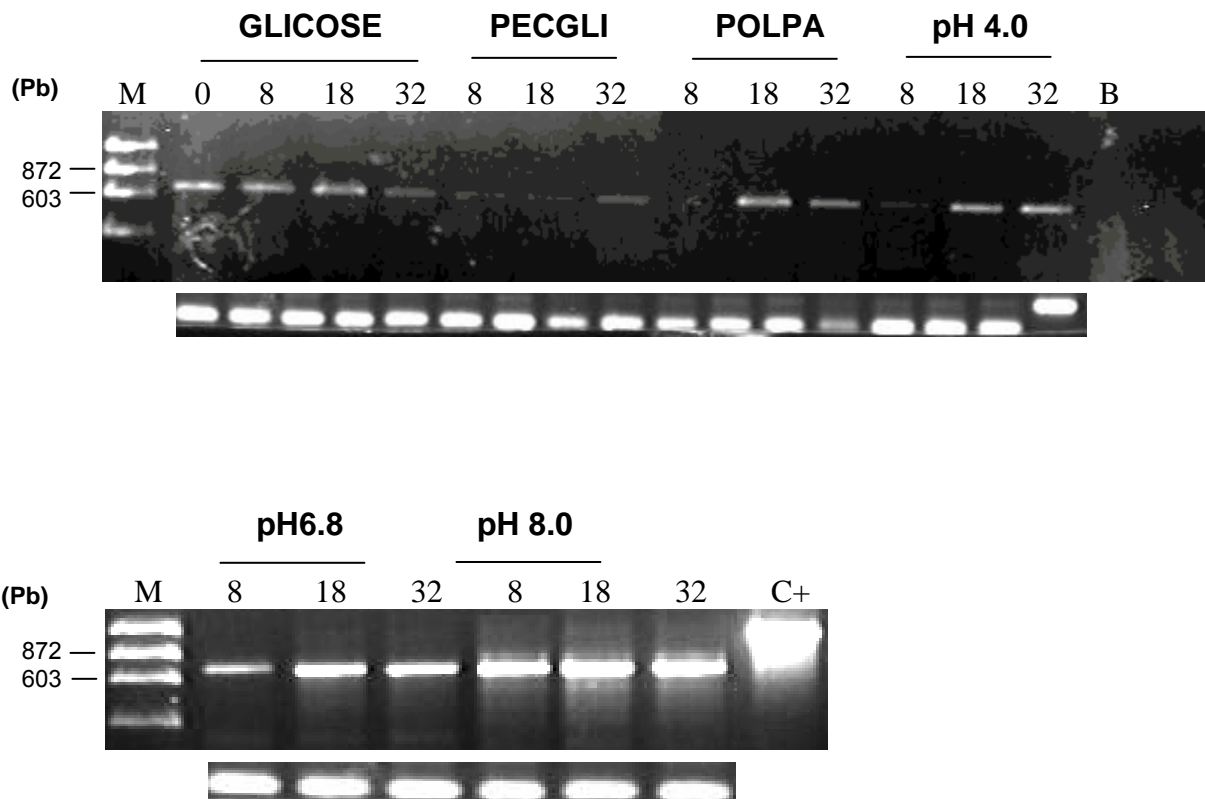


Figura 12 – Análise da expressão do gene *pec1B* por RT-PCR em diferentes condições: Glicose, Pectina + Glicose (PECGLI), Pectina em pH 4.0, 6.8 e 8.0 e Polpa. RNA total foi extraído nos tempos 0 (micélio recolhido antes da transferência para novo MS), 8 (8h após a transferência), 18 (18h após a transferência) e 32 (32h após a transferência). (C+) Controle positivo, DNA total de CP02; (B) Controle negativo, sem adição de cDNA e (M) Marcador Φ X174 clivado com enzima *HaeIII*.

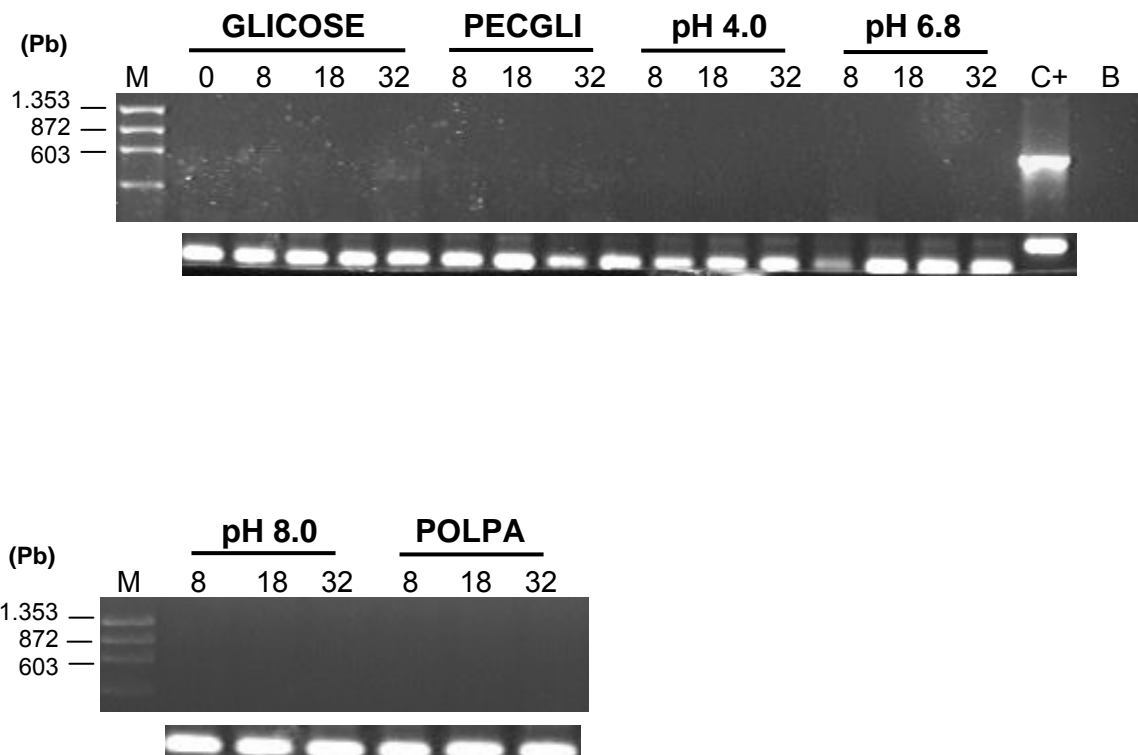


Figura 13 – Análise da expressão do gene *pec2* por RT-PCR em diferentes condições: Glicose, Pectina + Glicose (PECGLI), Pectina em pH 4.0, 6.8 e 8.0 e Polpa. RNA total foi extraído nos tempos 0 (micélio recolhido antes da transferência para novo MS), 8 (8h após a transferência), 18 (18h após a transferência) e 32 (32h após a transferência). (C+) Controle positivo, DNA total de CP02; (B) Controle negativo, sem adição de cDNA e (M) Marcador Φ X174 clivado com enzima *HaeIII*.

Tanto *pec1A* quanto *pec1B* já estavam sendo expressos em MS com glicose no tempo 0, antes da transferência dos micélios para os novos MS com as diferentes fontes de carbono. Em MS contendo pectina e glicose a expressão de *pec1A* foi pouco menor que o observado em glicose, mas na polpa houve pouca expressão em 8 hs e 18 hs, seguida de um aumento na expressão em 32 hs após a transferência do micélio. A expressão de *pec1A* em MS contendo pectina foi relativamente maior do que a expressão em MS contendo glicose ou pectina e glicose. Quando se compara a expressão em MS contendo pectina em diferentes valores de pH, observa-se maior expressão em pH 6,8 e 8,0 e em pH 4,0 observa-se um aumento gradativo ao longo do tempo, enquanto em pH 6,8 o nível de expressão não se alterou.

Para o gene *pec1B* observa-se um forte e homogêneo nível expressão em MS contendo glicose. Em MS contendo pectina e glicose a expressão foi reduzida após 8 hs de transferência, mas aumentou após 18 e 32 hs. A expressão em MS contendo polpa de cacau a expressão de *pec1B* foi maior que *pec1A*. A expressão de *pec1B* foi também maior em MS contendo pectina em pH 6,8 e 8,0 da mesma forma que observado para *pec1A*, há um aumento crescente na expressão de *pec1B* em pH 4,0 ao longo do tempo. Este aumento na expressão pode estar associado à uma alcalinização do meio. O pH é um fator que claramente regula a expressão de diferentes enzimas pectinolíticas e também de isoformas que são codificadas por famílias multigênicas (Wubben *et al.*, 2000) e alguns fungos utilizam desta estratégia de alcalinização para aumentar a virulência, favorecendo a expressão de vários genes (Prusky e Yakoby, 2003).

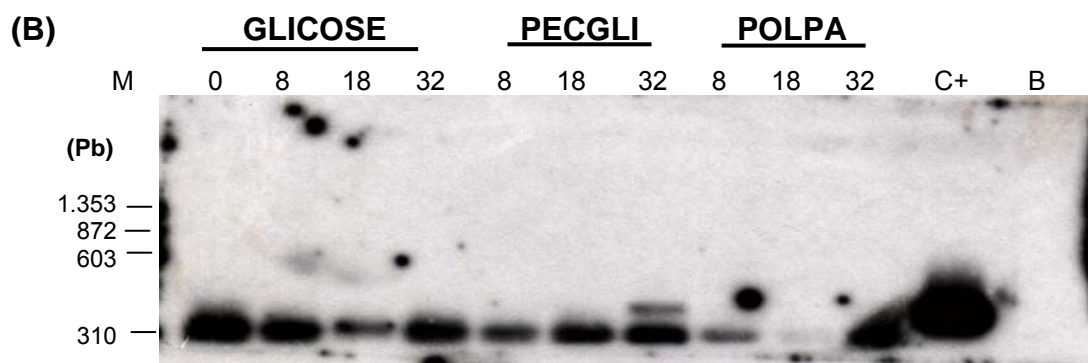
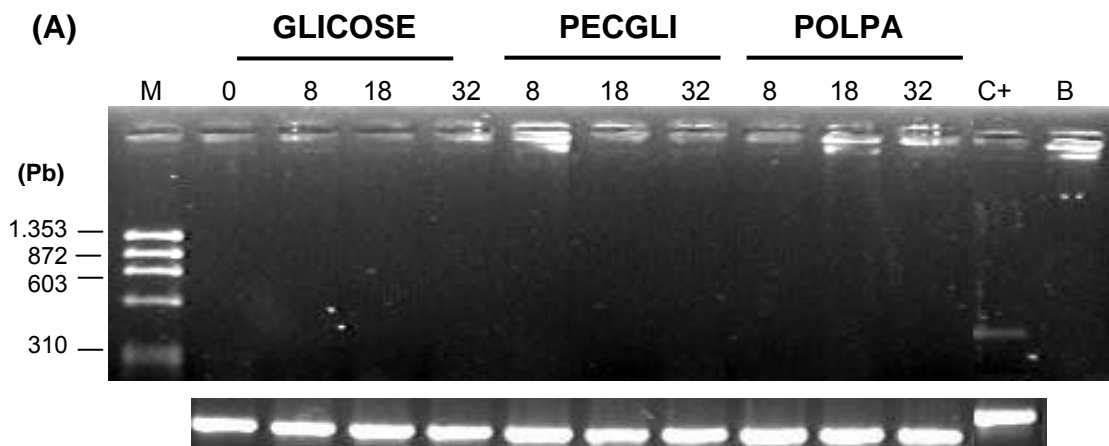


Figura 14 – Análise da expressão do gene *pec1A* por RT-PCR semi-quantitativo (A e C) e autoradiografia dos produtos amplificados (B e D) em diferentes condições: Glicose, Pectina + Glicose (PECGLI), Pectina em pH 4.0, 6.8 e 8.0 e Polpa. RNA total foi extraído nos tempos 0 (micélio recolhido antes da transferência para novo MS), 8 (8h após a transferência), 18 (18h após a transferência) e 32 (32h após a transferência). (C+) Controle positivo, DNA total de CP02; (B) Controle negativo, sem adição de cDNA e (M) Marcador Φ X174 clivado com enzima *Hae*III.

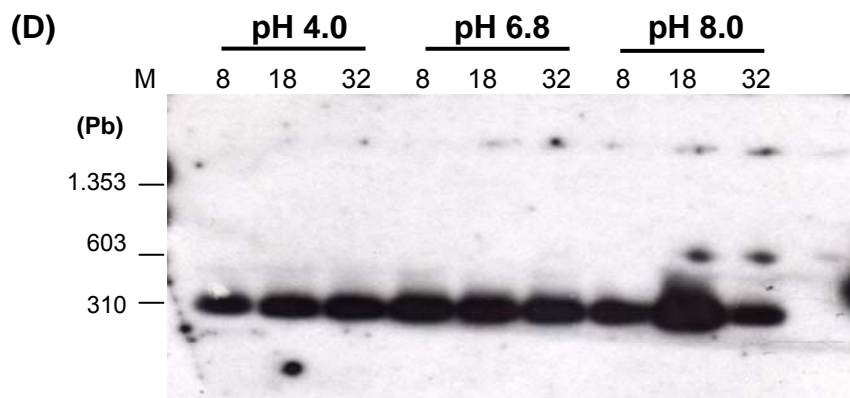
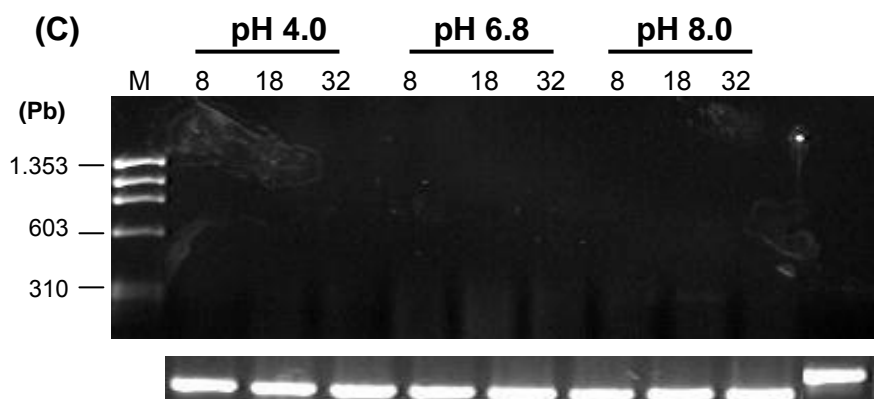


Figura 14 - continuação

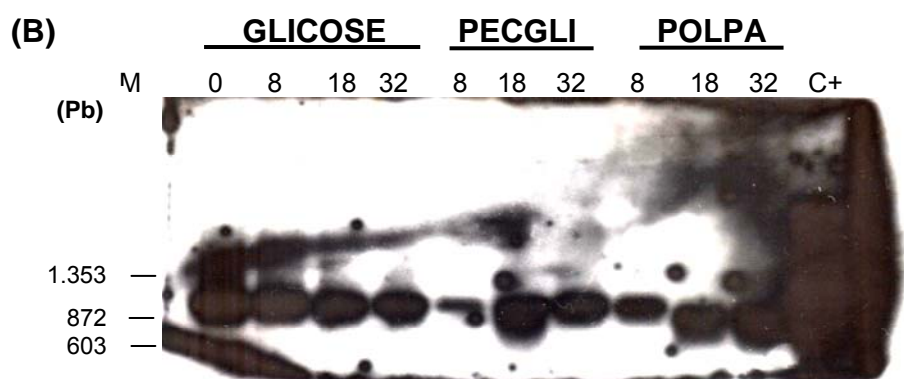
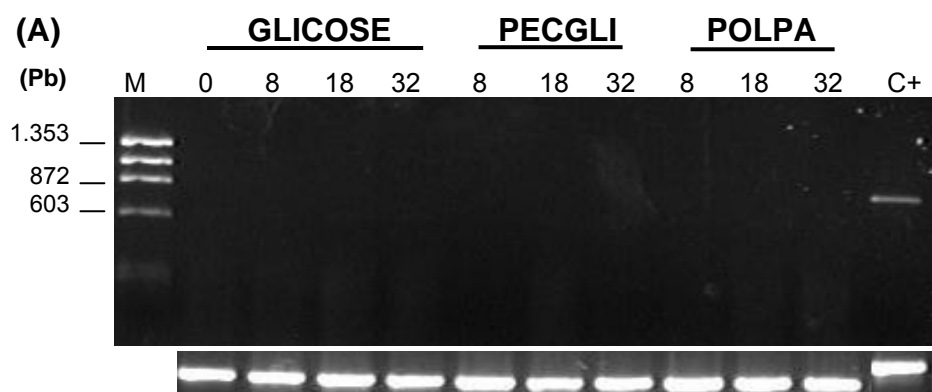


Figura 15 – Análise da expressão do gene *pec1b* por RT-PCR semi-quantitativo (A e C) e auto-radiografia dos produtos amplificados (B e D) em diferentes condições: Glicose, Pectina + Glicose (PECGLI), Pectina em pH 4.0, 6.8 e 8.0 e Polpa. RNA total foi extraído nos tempos 0 (micélio recolhido antes da transferência para novo MS), 8 (8h após a transferência), 18 (18h após a transferência) e 32 (32h após a transferência). (C+) Controle positivo, DNA total de CP02; (B) Controle negativo, sem adição de cDNA e (M) Marcador Φ X174 clivado com enzima *HaeIII*.

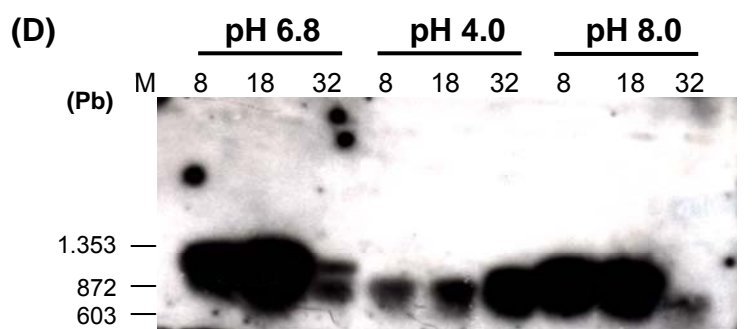
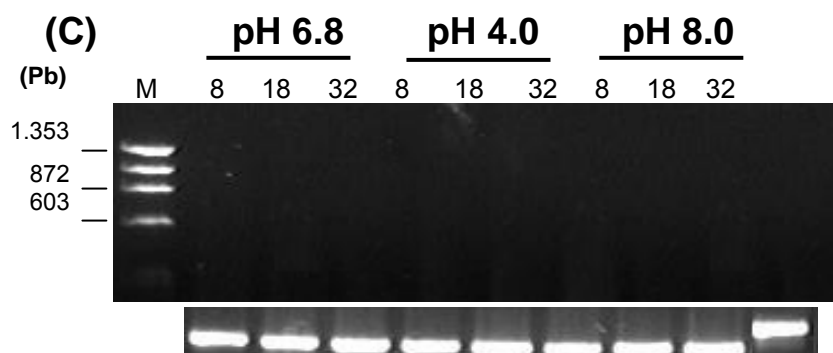


Figura 15 - continuação

O fator de transcrição PacC regula a expressão de genes dependentes de pH, atuando como ativador de genes expressos em pH externo alcalinos e repressor de genes que são expressos em pH externo ácido (Cubero e Scazzocchio, 1994; Tilburn *et al.*, 1995; Maccabe *et al.*, 1996). Sequências consenso para reconhecimento de PacC (5' GCCARG 3') estão presentes nos promotores de genes que codificam endopoligalacturonase em *B. cinerea* (Wubben *et al.*, 2000). No promotor do gene *pelB* de *C. gloeosporioides* foram detectados nove seqüências consenso putativas para ligação de *Pac1* (homólogo a PacC de *A. nidulans*) e os níveis de transcritos de *Pac1* e *pelB* aumentaram em função do pH (Drori *et al.*, 2003; Kramer-Haimovich *et al.* 2006). Apenas na região promotora de *pec1B* foi encontrado um sítio putativo de ligação a PacC.

Um efeito do pH observado em *A. nidulans* e em muitos outros fungos é a expressão preferencial de poligalacturonases a baixos valores de pH e de pectato liase em altos valores de pH (Dean e Timberlake, 1989b; Wubben *et al.*, 2000). Evidências de que o pH dos tecidos infectados afeta a expressão destes genes foram fornecidas por Prusky *et al.* (2001) que relataram a produção de altos níveis de NH_4^+ por *C. gloeosporioides*, como mecanismo de alcalinização dos tecidos e Kramer-Haimovich *et al.* (2006) que demonstraram que esta alcalinização dos tecidos durante a infecção por *C. gloeosporioides* induz a expressão de *pelB* e está, intimamente, relacionada com a mudança da fase biotrófica para necrotrófica. O gene *pelB* de *C. gloeosporioides* codifica uma pectato liase, que juntamente com a produção de NH_4^+ , são considerados fatores de virulência durante a colonização de frutos de abacate e a patogenicidade de *C. gloeosporioides* é dependente de sua habilidade de secretar PL em determinado pH e não somente da expressão do gene *pelB* (Yakoby *et al.*, 2000; Drori *et al.*, 2003).

A expressão constitutiva de genes pectinolíticos foi detectada em vários outros fungos, como em três genes que codificam poligalacturonases em *A. alliaceus* (Mikhailova *et al.*, 2000) e dois genes que codificam poligalacturonases de *A. niger* (Parenicova *et al.*, 2000). Dos quatro genes que codificam pectato liase em *F. solani* f. sp. *pisi*, o gene *pelB* foi expresso em todas as fontes carbono avaliadas (Guo *et al.*, 1995a) e entre dois genes, *pel-1* e *pel-2*, isolados de *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae*, o gene *pel-2* foi expresso em meio de cultura contendo glicose (Shih *et al.*, 2000). Genes regulados por

fontes de carbono preferenciais, como glicose possuem, na suas seqüências promotoras geralmente 2 ou 3 sítios de ligação ao regulador CREA, sendo que pelo menos um deve ser funcional (Ho *et al.*, 1995). Entretanto, ten Have *et al.* (2001) analisando os promotores dos 7 genes que codificam poligalacturonase em *B. cinerea*, encontraram sítios de ligação à CREA em todos os promotores, exceto em *bcpG2*, mas a repressão por glicose ocorreu apenas no gene *bcpG4*. Os autores discutem que, aparentemente, a mera presença de elementos de regulação como CREA não são suficientes para explicar a regulação da expressão de um gene. Para esclarecer a expressão de *pec1A* e *pec1B* de *C. pernicioso* na presença de glicose será necessário seqüenciar regiões maiores de seus promotores e também avaliar a expressão destes genes no micélio primário durante a fase biotrófica. Da mesma forma estes estudos poderão esclarecer a ausência de expressão de *pec2* nas diferentes condições avaliadas.

Os genes que codificam pectato liase (*pel-1* e *pel-2*) e o gene que codifica poligalacturonase de *C. gloeosporioides* tiveram suas expressões comparadas em cultura e durante a infecção necrotrófica (Shih *et al.*, 2000). Transcritos de *pel-1* e *pel-2* e PG foram detectados em culturas contendo extrato de planta ou pectina e transcritos de *pel-2* também foram detectados em meio de cultura contendo glicose. Na planta apenas transcritos de *pel-2* foram detectados no início da fase necrotrófica, o que sugere que este gene está associado com a maceração dos tecidos, observadas ao final da fase biotrófica, e que não é reprimido pelos açúcares liberados durante a infecção.

A observação de que os genes *pec1A* e *pec1B* de *C. pernicioso* não respondem à repressão catabólica sugerem que estas enzimas podem estar ligadas à parede celular e que este seria um possível mecanismo de regulação pós-traducional da atividade enzimática. A restrição da atividade destas enzimas aos sítios de infecção, por meio de imobilização por interações iônicas com a parede celular, poderia evitar a difusão destas enzimas através da matriz e assim uma extensa maceração dos tecidos vegetais e, conseqüentemente, a morte celular, bem como uma estratégia de controle sobre os oligouronídeos gerados, que poderiam atuar como elicitores de respostas de defesa (Mendgen *et al.*, 1996; Isshiki *et al.*, 2003). Durante a interação com o feijoeiro *C. lindemuthinaum* expressa 2 endoPGs, sendo *clpg2* expresso apenas na planta e *clpg1* é expresso durante o crescimento

saprofítico (Herbert *et al.*, 2004). A proteína CLPG2 foi, por meio de técnicas de imunofluorescência, encontrada fortemente aderida à parede celular do fungo. Esta localização é considerada importante para impedir extensiva maceração dos tecidos e limitar a produção de elicitores de resposta de defesa da planta e sugere também que, além da regulação em nível de transcrição variar de acordo com a estratégia de patogênese, pode ocorrer também regulação em nível de atividade enzimática (Herbert *et al.*, 2004).

Um enigma a ser elucidado é a função de múltiplas, e muitas vezes independentemente reguladas, isoenzimas em fungos fitopatogênicos.

Herron *et al.* (2000) sugere que a resposta está na natureza heterogênea do substrato. Os polímeros pécticos, sobre quais as diferentes enzimas pectinolíticas atuam, possuem 2 regiões distintas: homogalacturanas, formadas pelos resíduos de ácido D-galacturônico, intercalados por L-ramnose, podendo apresentar diferentes graus de esterificação (Benen *et al.*, 2000; Herron *et al.*, 2000; Schols e Voragem, 1994); e outra região, denominada de ramnogalacturanas, composta pelos resíduos de ácido D-galacturônico intercalados com resíduos de L-ramnose altamente ramificado. Assim, o patógeno que secreta uma grande diversidade de enzimas pécticas, cada qual com mecanismos catalíticos similares, estaria mais apto à reconhecer as diferentes regiões da pectina e poderia ter maior sucesso na infecção ou mesmo maior gama de hospedeiro, uma vez que a concentração de pectina e o grau de esterificação variam durante o ciclo de vida da planta, variam entre os diferentes tecidos e, principalmente, de planta para planta, e além disso, esta multiplicidade de enzimas pectinolíticas contribuiria também para melhor performance de todas as enzimas (Herron *et al.*, 2000).

Além das enzimas pectato liases serem codificadas por uma família multigênica em *C. pernicioso* há evidências de que poligalacturanases também pertencem à uma família multigênica. Esta diversidade de enzimas pectinolíticas provavelmente também contribui para a infecção do cacauzeiro por *C. pernicioso*, uma vez que este patógeno é capaz de infectar tecidos meristemáticos e frutos, que devem possuir qualidade e quantidade de polímeros pécticos bem variados. Uma análise da expressão destes genes, durante a infecção, poderá esclarecer se há expressão diferencial em função do tecido infectado e do estágio da infecção, como, por exemplo, nas fases biotróficas e necrotróficas.

A detecção das proteínas PEC1A e PEC1B, por imunofluorescência, poderia esclarecer se estas enzimas, estão também ligadas à parede celular de *C. perniciosus*, sendo este um mecanismo alternativo de controle da atividade e que poderia explicar o fato dos genes que codificam estas enzimas não responderem à repressão catabólica.

5 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As enzimas pectinolíticas degradam os polímeros pécticos encontrados na parede celular vegetal e são produzidas por diferentes microrganismos. Acredita-se que em microrganismos patogênicos estas enzimas têm relevante papel na invasão e colonização do hospedeiro e, portanto, a importância destas enzimas na patogenicidade vem sendo avaliada em diversos sistemas planta-patógeno.

Assim como em muitos fungos filamentosos, as enzimas pectinolíticas de *C. pernicioso* também são codificadas por uma família multigênica e são diferentemente regulados.

Os três genes, *pec1A*, *pec1B* e *pec2*, isolados e caracterizados fazem parte da primeira família multigênica de genes que codificam enzimas pectinolíticas em *C. pernicioso*. Este é também o primeiro relato do isolamento e caracterização de genes que codificam pectato liase em fungos basidiomicetos.

Os genes *pec1A* e *pec1B* apresentaram alta identidade entre si e com os genes pectato liase A de *A. niger* e *A. fumigatus*, mas baixa identidade com *pec2*, que por sua vez possui identidade com um novo grupo de pectato liase, representado pela família multigênica que codifica pectato liases em *F. solani* f. *pisi*. Alinhamentos múltiplos entre as pectato liases de *C. pernicioso* e de diferentes fungos fitopatogênicos, bem como a análise filogenética realizada, sugerem que PEC2 realmente pertence à uma nova classe de pectato liase, juntamente com as pectato liases de *F. solani* f. sp. *pisi*.

Ambos os genes *pec1A* e *pec1B* são interrompidos por 7 íntrons. Embora o mesmo número de íntrons indique que um gene derivou do outro, a não conservação na posição destes íntrons sugere que a divergência não é recente. O gene *pec2*, por sua vez, é interrompido por apenas 3 íntrons. Uma completa análise dos promotores não foi possível sendo necessário seqüenciar novas regiões; entretanto, alguns cis-elementos puderam ser identificados em *pec1B* e *pec2*.

Os genes *pec1A* e *pec1B* foram expressos em todas as condições avaliadas, mas algumas diferenças no nível de expressão puderam ser detectadas. Há uma expressão maior de *pec1A* e *pec1B* em valores de pH

igual à 8,0. Pectato liases são descritas na literatura como sendo proteínas preferencialmente expressas em condições alcalinas, quando também apresentam maior atividade enzimática. Contrariando as expectativas, a expressão destes genes, quando o fungo foi crescido na polpa do cacau, não foi maior que a expressão em glicose ou pectina + glicose.

O gene *pec2*, como esperado, não foi expresso em nenhuma das condições avaliadas, sendo este gene, provavelmente expresso no cacau durante a infecção. Novos estudos devem ser conduzidos para avaliar a expressão destes genes durante a interação *C. pernicioso*-cacau.

A observação de que os genes que codificam pectato liase de *C. pernicioso* não respondem à repressão catabólica, sugerem que algumas destas enzimas podem estar ligadas à parede celular.

Este é o primeiro relato de isolamento de genes que codificam pectato liase em basidiomicetos. A clonagem destes genes e a disponibilidade de um sistema de transformação de *C. pernicioso* tornam este patógeno acessível à inativação gênica para avaliação da importância dos genes que codificam pectato liase na patogenicidade.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albersheim, P. (1975). The walls of growing plant cells. **Science American**, 232: 80-95.
- Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W.; Blakwell, M. (1996). **Introductory Micology**. 4^a Ed. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 869 pp.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L., Schaffer, .A. A., Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25: 3389-3402.
- Amorim, L. (1995). Parte IV – Ciclo das relações patógeno-hospedeiro. In: **Manual de Fitopatologia**. Volume 1: Princípios e Conceitos. 3^a Ed. Editores: Filho, A. B.; Kimati, H.; Amorin, A. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. p: 234-307.
- Anderbrahn, T.; Jr, J. F. H.; Furtek, D. B. (1995). Sensitivity of *Crinipellis pernicioso* to procyanidins from *Theobroma cacao* L. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 46: 339-348.
- Anderbrahn T.; Figueira A.; Yamada M. M.; Cascardo J.; Furtek (1999). *D.B* Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, 105:167-175.
- Arruda, M. C. C. de; Miller R. N. G.; Ferreira, M. A. S. V.; Felipe M. S. S. (2003a). Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology**, 52: 236-244.
- Arruda, M. C. C de; Ferreira, M. A.; Miller, R. N.; Resende, M. L.; Felipe, M. S. (2003b). Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso*

- from different geographic origins and hosts. **Mycological Resource**, 107: 25-37.
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. (1992). **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience,.
- Balance, D. J. (1986). Sequences important for gene expression in filamentous fungi. **Yeast**, 2: 229-236.
- Bastos, C. N. (1997). Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis pernicioso* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia brasileira**, 22: 441-443.
- Bastos, C. N. (2000). Retrospectiva e avanços no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, 25: (suplemento), 305-306.
- Bazzolli, D. M. S. (2003). **Organização e regulação de genes que codificam pectina liase em *Penicillium griseoroseum***. Tese de Doutorado. Viçosa, UFV. 105 pp.
- Benen, J. A. E.; Kester, H. C. M.; Parenicová, L.; Visser, J. (2000). Characterization of *Aspergillus niger* pectate lyase A. **Biochemistry**, 39: 15563-15569.
- Benton, W. D.; Davis, R. W. (1997). Screening of Xgt recombinant clones by hybridization to single plates in situ. **Science**, 196: 180-183.
- Bittencourt, L. M. C.; Macedo, J. N. A.; Ceita, G. O.; Santos, T. B.; Costa, R. J. D.; Mariano, A. C.; Gesteira, A. S.; Pereira, G. A.; Cascardo, J. C. M. (2004). ***Crinipellis pernicioso* codifica um indutor de necrose expresso durante a interação com o cacauero**. 50º Congresso Brasileiro de Genética.
- Bowen, J. K.; Templeton, M. D.; Sharrock, K. R.; Crowhurst, R. N.; Rikkerink, E. H. A. (1995). Gene inactivation in the plant pathogen *Glomerella cingulata*:

- Three strategies for the disruption of the pectin lyase gene *pnIA*. **Molecular and General Genetics**, 246: 196-205.
- Bradford, M.M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytic Biochemistry**, 72: 248-254.
- Calle, H.; Cook, A. A.; Fernando, S. Y. (1982). Histology of witches' broom caused in cacao by *Crinipellis pernicioso*. **Phytopathology**, 72: 1479-1481.
- Camargo, L. E. A.; Filho, A. B. (1995). Parte VI – Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: **Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e Conceitos**. 3^a Ed. Editores: Filho, A. B.; Kimati, H.; Amorin, A. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. p 455-491.
- Cano-Canchola, C.; Acevedo, L.; Ponce-Noyola, P.; Flores-Martinez, A.; Flores-Carreón, A.; Leal-Morales, C. A. (2000). Induction of lytic enzymes by interaction of *Ustilago maydis* with *Zea mays* tissues. **Fungal Genetics and Biology**, 29: 145-151.
- Centis, S.; Dumas, B.; Fournier, J.; Marolda, M.; Esquerré-Tugayé, M. (1996). Isolation and sequence analysis of *Clpg1*, a gene coding for an endopolygalacturonase of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Gene**, 170: 125-129.
- Cervone, F.; De Lorenzo, G.; Degrà, L.; Salvi, G.; Bergami, M. (1987). Purification and characterization of a polygalacturonase-inhibiting protein from *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Physiology**, 85: 631-637.
- Christgau, S.; Kofod, L. V.; Andersen, L. N.; Hockauf, M.; Dorreich, K.; Dalboge, H.; Kauppinen. (1996). Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme. **Biochemistry Journal**, 319: 705-712.

- Collmer, A.; Ried, J. L.; Mount, M. S. (1988). Assay methods for pectic enzymes. **Methods in Enzymology**, 161:329-335.
- Cooper, R. M. (1983). The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. In: **Biochemical Plant Pathology**. Callow, J. A. Ed. John Wiley & Sons Ltd, U.S.A. pp.102-135.
- Costa, F. A. (2003). **Micorrizas Arbusculares e Enzimas do Estresse Oxidativo em Raiz de Cenoura Transformada e em Morangueiro**. Tese de Doutorado. Viçosa, UFV.108 pp.
- Cotomacci, C. (2004). **Análise genômica do sistema *mating-type* de *Crinipellis pernicioso*, fungo causador da vassoura-de-bruxa em *Theobroma cacao***. Tese de Mestrado, UNICAMP, 75 pp.
- Cotton, P.; Kasza, Z.; Bruel, C.; Rasclé, C.; Fèvre M. (2003). Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiology Letters**, 227: 163-169.
- Cubero, B.; Scazzocchio, C. (1994). Two different, adjacent and divergent zinc-finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the praline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. **European Molecular Biology Organization Journal**, 13: 407-415.
- Davies, K. A.; Lorenzo, I.; Foster, S. J.; Li, D.; Johnstone, K.; Ashby, A. M. (2000). Evidence for a role of cutinase in pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on brassicas. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 57: 63-75.
- Dean, R. A.; Timberlake, W. E. (1989a). Production of cell wall-degrading enzymes by *Aspergillus nidulans*: a model system for fungal pathogenesis of plants. **The Plant Cell**, 1: 265-273.
- Dean, R. A.; Timberlake, W. E. (1989b). Regulation of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase gene (*pelA*). **The Plant Cell**, 1: 275-284.

- Delgado, J. C.; Cook, A. (1975). A nuclear condition of the basidia, basidiospores, and mycelium of *Maramius perniciosus*. **Canadian Journal of Botany**, 54: 66-72.
- de Vries, R., Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Review**, 65: 497-522.
- Dias, L. A. S. (2001). **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Fundação de Apoio à Pesquisa, Goiás, 578 pp.
- Di Matteo, A.; Federici, L.; Mattei, B.; Salvi, G.; Johnson, K. A.; Savino, C.; De Lorenzo, G.; Tsernoglou, D. (2003). The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 100: 10124-10128.
- Drori, N.; Kramer-Haimovich, H.; Rollins, J.; Dinoor, A.; Okon, Y.; Pines, O.; Prusky, D. (2003). External pH and nitrogen source affect secretion of pectate lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied and Environmental Microbiology**, 69: 3258-62.
- Dusfresne, M.; Perfect, A.; Pellier, A.; Bailey, J. A.; Langin, T. (2002). A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. **The Plant Cell**, 21:1579-1589.
- Epstein L.; Nicholson, R. L. (1997). Adhesion of spores and hyphae to plant surfaces. In: **The Mycota V. Part A, Plant Relationships**. Ed. Carroll and P. Tudzynski. Springer-Verlag, Germany. pp: 11-25.
- Eshel, D.; Miyara, I.; Ailing, T.; Dinoor, A.; Prusky, D. (2002). pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 8: 774-779.

- Esquerré-Tugayé, M.; Boudart, G.; Dumas, B. (2000). Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, 38: 157-163.
- Evans, H. C. (1978). Witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador. **Annals of Applied Biology**, 89: 185-192.
- Evans, H. C. (1980). Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, 74: 515-523.
- Evans, H. C.; Barreto, R.W. (1996). *Crinipellis pernicioso*: a much investigated but little understood fungus. **Mycologist**, 10: 58-61.
- Fawole, O. B.; Odunfa, S. A. (2003). Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 52: 223-227.
- Federici, L.; Caprari, B.; Savino, C.; Di Matteo, A.; De Lorenzo, G.; Cervone, F.; Tsemoglou, D. (2001). Structural requirements of endopolygalacturonases for the interaction with PGIP (Polygalacturonase-inhibiting protein). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 98: 13425-13430.
- Felenbok, B.; Flippi, M.; Nikolaev, I. (2001) Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: A model system for studying gene regulation. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, 69: 149–204.
- Felipe, M. S. S., Azevedo, M. A., Vainstein, M. H. e Schrank, A. (1992). **Biologia molecular de fungos filamentosos: construção de banco genômico e de cDNA**. Manual técnico, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo. 99p.
- Flippi, M.; van de Vondervoort, P. J.; Ruijter GJ, Visser J, Arst HN Jr, Felenbok B. (2003). Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*.

Parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signaling. **Journal of Biological Chemistry**, 278:11849-11857.

Frias, G. A.; Purdy, L. H.; Schmidt, R. A. (1991). Infection biology of *Crinipellis pernicioso* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, 75: 552–556.

Gao, S. J.; Choi, G. H.; Shain, L.; Nuss, D. L. (1996). Cloning and targeted disruption of *enpg1*, encoding the major in vitro extracellular endopolygalacturonase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Applied Environmental Microbiology**, 62: 1984-1990.

García-Maceira, F. I.; Di Pietro, A.; Huertas-González, M. D.; Ruiz-Roldan, M. C.; Roncero, M. I. (2001). Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection. **Applied Environmental Microbiology**, 67: 2191-2196.

Gavel Y, von Heijne G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. **Protein engineering**, 3: 433–442.

Gaumann, E. (1950). **Principles of Plant Infection**. Crosby Lockwood & Son, London, 542 pp.

Genari, R. (1999). **Características de crescimento e produção de pectinases por *Klebsiella oxytoca* isolada de frutos de café**. Tese de Mestrado. Viçosa, UFV. 78 pp.

Gert-Van, W. M.; Scherpenzel, K. V.; Bellman, G.; Schools, H. A.; Voragen, A. G. J. (2003). Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrate for pectin methylesterase of *Aspergillus niger*. **Biochemistry Journal**, 372: 211-218.

González-Candelas, L.; Kolattukudy, P. E. (1992). Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase gene from the phytopathogenic fungus

Fusarium solani f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating population VI).
Journal of Bacteriology, 174: 6343-6349.

Goodman, R. N.; Király, Z.; Wood, K.R. (1986). **Physiological plant pathology the biochemistry and physiology of plant disease**. University of Missouri Press. 433 pp.

Griffith, G. W. (1989). **Population structure of the cocoa pathogen *Crinipellis pernicios* (Stahel) Sing**. Unpublished PhD thesis, University of Wales, Aberystwyth, Wales.

Griffith, G. W.; Hedger, J. N. (1993). A novel method for producing basidiocarps of cocoa pathogen *Crinipellis pernicios* using a bran-vermiculite medium. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, 99: 227-230.

Griffith, G. W.; Hedger, J. N. (1994). The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis pernicios*. **Heredity**, 72: 278-289.

Griffith, G. W.; Bravo-Velasquez, E.; Wilson, F.J.; Lewis, D. M.; Hedger, J. N. (1994). Cap 15. Autecology and evolution of the witches' broom pathogen (*Crinipellis pernicios*) of cocoa. In: **Ecology of Plant Pathogens**. Blakeman, J. P.; Williamson, B. (Eds). Ed. CAB International. p. 245-267.

Griffith, G. W.; Nicholson, J.; Nenninger, A.; Birch, R. N.; Hedger, J. N. (2003). Witches' broom and frosty pods in cacao. **New Zealand Journal of Botany**, 41: 423-435.

Guo, W.; Gonzalez-Candelas, L.; Kolattukudy, P.E. (1995a). Cloning of a novel constitutively expressed pectate lyase gene *pe1B* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. **Journal of Bacteriology**, 177:7070-7077.

- Guo, W.; González-Candelas, L.; Kolattukudy, P. E. (1995b). Cloning of a New Pectate Lyase Gene *peI*C from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, Mating Type VI) and Characterization of the Gene Product Expressed in *Pichia pastoris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 323: 352-360.
- Guo, W.; González-Candelas, L.; Kolattukudy, P. E. (1996). Identification of a novel *peI*D gene expressed uniquely in planta by *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of its protein product as an endo-pectate lyase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 332: 305-312.
- Gurr, S. J.; Unkles, S. E.; Kinghorn, J. R. (1987). The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In: **Gene Structure in Eukaryotic Microbes**. Kinghorn, J. R. (ed). IRL Press, Oxford, p. 93-139.
- Hahn, M.; Mendgen, K. (2001). Signal and nutrient exchange at biotrophic plant-fungus interfaces. **Current Opinion in Plant Biology**, 4: 322-327.
- Hain, R.; Reif, H.; Krause, E.; Langebartels, R.; Kindl, H.; Vornam, B.; Wiese, W.; Schmelzer, E.; Schreier, P. H.; Stocker, R. H.; Stenzel, K. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. **Nature**, 361: 153-156.
- Hasegawa, S.; Nagel, C. W. (1966). A new pectic trans-eliminase produced exocellularly by a *Bacillus*. **Journal of Food Science**, 31: 838-845.
- Hedger, J. N.; Pickering, V.; Aragundi, J. A. (1987). Variability of populations of the witches' broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciososa*). **Transactions of the British Mycological Society**, 88: 533-546.
- Heffron, S.; Henrissat, B.; Yoder, M. D.; Lietzke, S.; Jurnak, F. (1995). Structure-based multiple alignment of extracellular pectate lyase sequences **Molecular Plant Microbe Interactions**, 8: 331-4.

- Henrissat, B.; Heffron, S. E.; Yoder, M. D.; Lietzke, S. E.; Journak, F. (1995). Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily. **Plant Physiology**, 7: 963-76.
- Herbert, C.; O'Connell, R.; Gaulin, E.; Salesse, V.; Esquerré-Tugayé, M. T.; Dumas, B. (2004). Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. **Fungal Genetics and Biology**, 41: 140-147.
- Herron, S. R.; Benen, J. A. E.; Scavetta, R. D.; Visser, J.; Journak, F. (2000). Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 97: 8762-8769.
- Herve du Penhoat, C.; Gey, C.; Pellerin, P.; Perez, S. (1999). An NMR solution study of the mega-oligosaccharide, rhamnogalacturonan II. **Journal of Biomolecular NMR**, 14: 253-71.
- HLa, S. S.; Kikuta, T.; Sakka, M.; Kimura, T.; Saca, K. (2006). Enzymatic properties of two catalytic modules of *Clostridium stercoararium* pectate lyase Pel9A. **Bioscience and Biotechnology Biochemistry**, 70: 667-671.
- Ho, M. C.; Whitehead, M. P.; Cleveland, T. E.; Dean, R. A. (1995) Sequence analysis of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase *pelA* gene and evidence for binding of promoter regions to CREA, a regulator of carbon catabolite repression. **Current Genetics**, 27: 142-149.
- Hoch, H. C.; Staples, R. C.; Whitehead, B.; Comeau, J.; Wolf, E. D. (1987). Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. **Science**, 235: 1659-1662.
- Huertas-González, M. D.; Ruiz-Roldan, M. C.; Garcia-Maceira, F. I.; Roncero M. I.; Di Pietro, A. (1999). Cloning and characterization of *p11* encoding an in

- planta-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*. **Current Genetics**, 35: 36-40.
- Idnurm, A.; Howlett, B. A. (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology**, 2: 241-255.
- Ignacchiti, M. D. C.; Pereira, J. F.; Araújo, E. F.; Cascardo, J. M.; Formighieri, E. F.; Pereira, G. A. G.; Queiroz, M. V. (2003). Detecção de elementos transponíveis de classe II putativos em *Crinipellis pernicioso*. In: **49º Congresso Nacional de Genética**, CD-ROM de Resumos. p. 1142-1142.
- Isshiki, A.; Akimitsu, K.; Ishii, H.; Yamamoto, H. (2000). Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 14: 749-757.
- Isshiki, A.; Ohtani, K.; Kyo, M.; Yamamoto, H.; Akimitsu, K. (2003). Green fluorescent detection of fungal colonization and endopolygalacturonase gene expression in the interaction of *Alternaria citri* with citrus. **Phytopathology**, 93: 768–773.
- Jennings, J. C.; Apel-Brikhold, P. C.; Mock, N. M.; Baker, C. J.; Anderson, J. D.; Bailey, B. A. (2001). Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*. **Plant Science**, 161: 891-899.
- Jones, M. J.; Epstein L. (1990). Adhesion of Macroconidia to the Plant Surface and Virulence of *Nectria haematococca*. **Applied and Environmental Microbiology**, 56: 3772–3778.
- Kahmann, R. Basse, C. (2001). Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. **Current Opinion in Microbiology**, 4: 374-380.

- Keen, N. T.; Tamaki, S. (1986). Structure of two pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and their high-level expression in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, 168: 595–606
- Kelemu, S.; Collmer A. (1993). *Erwinia chrysanthemi* EC16 produces a second set of plant-inducible pectate lyase isozymes. **Applied and Environmental Microbiology**, 59: 1756-1761.
- Kenyon, L., Lewis, B. G., Coddington, A.; Harling, R.; Turner, J. G. (1993). Pathogenicity mutants of the tomato leaf mould fungus *Fulvia fulva* (Cooke) Ciferri (syn. *Cladosporium fulvum* Cooke). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 43: 173-191.
- Kilaru, A.; Hasenstein, K. H. (2005). Development and Pathogenicity of the Fungus *Crinipellis pernicioso* on Interaction with Cacao Leaves. **Biochemistry and Cell Biology**, 95: 101-107.
- Kim, C.Y.; Mosser, V.; Keen, N.; Jurnak, F. (1989). Preliminary crystallographic analysis of a plant pathogenic factor: pectate lyase. **Journal of Molecular Biology**, 208: 365-367.
- Kita, N.; Boyd, C. M.; Garrett, M. R.; Jurnak, F.; Keen, N. T. (1996) Differential effect of site-directed mutations in *pe/C* on pectate lyase activity, plant tissue maceration, and elicitor activity. **Journal of Biological Chemistry**, 271: 26529-26535.
- Kolattukudy, P. E. (1985). Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 23: 223-250.
- Koller, W.; Allan, C. R.; Kolattukudy, P. E. (1982). Role of cutinase and cell wall degrading enzymes in infection of *Pisum sativum* by *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. **Physiological Plant Pathology**, 20: 47-60.
- Koller, W., Yao, C., Trial, F. & Parker, D. M. (1995). Role of cutinase in the invasion of plants. **Canadian Journal of Botany**, 73: 1109-1118.

- Korman, D. R.; Bayliss, F. T.; Barnett, C. C.; Carmona, C. L.; Kodama, K. H.; Royer, T. J.; Thompson, S. A.; Ward, M.; Wilson, L. J.; Berka R. M. (1990). Cloning, characterization, and expression of two α -amylase genes from *Aspergillus niger* var. *awamori*. **Current Genetics**, 17, 203-212.
- Korner, R.; Limberg, G.; Mikkelsen, J. D.; Roepstorff, P. (1998). Characterization of enzymatic pectin digests by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, 33: 836-842.
- Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. **Microbiology Review**, 47: 1-45.
- Kosak, K.; Jones, J. D. G. (2000). Responses to Plant Pathogens. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Ed. American Society of Plant Physiologists. pp. 1102-1156.
- Kramer-Haimovich, H.; Servi, E.; Katan, T.; Rollins, J.; Okon, Y.; Prusky, D. (2006). Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on *peIB* activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, 72: 1034-1039.
- Kulmburg, P.; Mathieu, M.; Dowzer, C.; Kelly, J.; Felenbok, B. (1993). Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, 7: 847–857.
- Kusters-van, S. M. A.; Harmsen, J. A.; Kester, H. C.; Visser, J. (1991). Structure of the *Aspergillus niger* *peIA* gene and its expression in *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, 20: 293-299.
- Lebeda, A.; Luhová, L.; Sedlarová, M.; Jancová, D. (2001). The role of enzymes in plant fungal pathogens interactions. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 108: 89-111.

- Lemke, P. A. (1969). A century of compounds and their effect on fungi. **Mycopathology and Mycology Applied**, 38: 49-59.
- Lietzke, S. E.; Yoder, M. D.; Keen, N.T.; Jurnak, F. (1994). The Three-Dimensional Structure of Pectate Lyase E, a Plant Virulence Factor from *Erwinia chrysanthemi*. **Plant Physiology**, 3: 849-862.
- Lima J. O.; Santos J. K. dos; Pereira J. F.; Resende M. L. V. de; Araújo E. F. de; M. V. de Queiroz. (2003). Development of a transformation system for *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants **Currents Genetics**, 42: 236–240.
- Lojkowska, E.; Masclaux, C.; Boccara, M.; Robert-Baudouy, J.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1995). Characterization of the *peL* gene encoding a novel pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Molecular Microbiology**, 16: 1183-1195.
- Lorenzo, G.; Ferrari, S. (2002). Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. **Current Opinion in Plant Biology**, 5: 295-299.
- Maccabe, A. P.; Fernandez-Espinar, M. T.; de Graaff, L. H.; Visser, J.; Ramon, D. (1996). Identification, isolation and sequence of the *Aspergillus nidulans* *xlnC* gene encoding the 34-kDa xylanase. **Gene**, 175:29-33.
- Marcus, L.; Barash, I.; Sneh, B.; Koltin, Y.; Finkler, A. (1986). Purification and *characterization* of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 29: 325-336.
- Mayans, O.; Scott, M., Connerton, I.; Gravesen, T.; Benen, J.; Visser, J.; Pickersgill, R.; Jenkins, J. (1997). Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substratebinding clefts of pectin and pectate lyases. **Structure**, 5: 677–689.

- McGeary, F.M.; Wheeler, B. E. J. (1988). Growth rates of, and mycelial interaction between, isolates of *Crinipellis pernicioso* from cocoa. **Plant Pathology**, 37: 489-498.
- McQuilken, M. P., Supriadi; Rudgard, S. A. (1988). Sensitivity of *Crinipellis pernicioso* to two triazole fungicides in vitro and their effect on development of the fungus in cocoa. **Plant Pathology**, 37: 499-506.
- Meinhardt, L. W.; Bellato, C. M.; Rincones J.; Azevedo, R. A.; Cascardo J. C. M.; Pereira, G. A. G. (2006). In Vitro Production of Biotrophic-Like Cultures of *Crinipellis pernicioso*, the Causal Agent of Witches' Broom Disease of *Theobroma cacao*. **Current Microbiology**, 52: 191-196.
- Mendgen, K. M.; Hahn, H.; Deising, H. (1996). Morphogenesis and mechanisms of penetration pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, 34: 367-386.
- Mercure, E. W.; Kunoh, H.; Nicholson, R.L. (1994). Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves, a requirement for disease development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 45: 407-420.
- Mikhailova, R. V.; Sapunova, L. I.; Lobanok, A. G.; Iasenko, M. I.; Shishko, Z. F. (2000). Isoelectric characterization of extracellular polygalacturanases of various *Aspergillus alliaceus* strains. **Mikrobiologija**, 69: 203-208.
- Motilal, L. A.; Sirju-Charran, G.; Sreenivasan, T. N. (2003). Effect of *Crinipellis pernicioso* infection on abscission of cacao cotyledons, reserve mobilization and dry matter partitioning. **Journal of Phytopathology**, 151: 546.
- Morrison, D. A. (1977). Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. **Journal of Bacteriology**, 132: 349-51.
- Muse, R.; Collin, H. A.; Isaac, S.; Hardwick K. (1996). Effects of the fungus *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease, on cell and

- tissue cultures of cocoa (*Theobroma cacao* L). **Plant Pathology**, 45: 145-154.
- Oeser, B.; Patrick, M.H.; Muller, U.; Tudzynski, P.; Tenberge, K. B. (2002). Poligalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. **Fungal genetics and biology**, 36: 176-186.
- Orchard, J.; Collin, H. A.; Hardwick, K. e Isaac, S. (1994). Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches' broom on cocoa. **Plant Pathology**, 43: 65-72.
- Panda, T.; Sushma, R.; Nair, M. (2004). Regulation of synthesis of the pectolytic enzymes of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, 34: 466-473.
- Parenticova, L.; Kester, H. C.; Benen, J. A.; Visser, J. (2000). Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties. **FEBS Letters**. 467: 333-336.
- Pellier, A. L.; Lauge, R.; Veneault-Fourrey, C.; Langin, T. (2003). CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. **Molecular Microbiology**, 48: 639-55.
- Pereira, J. F.; Ignacchiti, M. D. C.; Araújo, E. F.; Cascardo, J. M.; Carazzolle, M. F.; Pereira, G. A. G.; Queiroz, M. V. (2003). Análise de seqüências putativas de transcriptase reversa em *Crinipellis pernicioso*. In: **49º. Congresso Nacional de Genética**. CD-ROM de Resumos, p. 1156-1156.
- Pereira, JF. (2005). **Caracterização, distribuição e estudo da atividade de elementos transponíveis em *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao*)**. Tese de Doutorado. UFV. 178 pp.

- Perfect, S. E.; Hughes, H. B.; O'Connell, R. J.; Green, J. R. (1999). *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, 27: 186-198.
- Petersen, T. N.; Kauppinen, S.; Larsen, S. (1997). The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel beta helix. **Structure**, 15: 533-44.
- Pickersgill, R.; Jenkins, J.; Harris, G.; Nasser, W.; Robert-Baudouy, J. (1994) The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. **Nature Structural and Molecular Biology**, 10: 717-723.
- Pound, F. J. (1943). **Cacao Witches' Broom Disease**. Report on a recent visit to the amazon territory of Peru, September 1942–February 1943. Trinidad: Government Printer, 1–14.
- Powell, A. T. L.; van Kan, J. A. L.; ten HAVE, A.; Visser, J.; Greve, L. C.; Bennett, A. B.; Labavitch, J. M. (2002). Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 13: 942-950.
- Prusky, D; Yakoby, N. (2003). Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH?. **Molecular Plant Pathology**, 4: 509–16.
- Prusky, D.; McEvoy, J. L.; Leverentz, B.; Conway, W. S. (2001). Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 14: 1105-1113.
- Purdy, L. H., Trese, A. T. and Aragundi, J. A. (1983). Proof of pathogenicity of *Crinipellis pernicioso* to *Theobroma cacao* by using basidiospores produced in in vitro culture (Brazil). **Revista Theobroma**, 13: 157-163.
- Qin, Q.; Bergmann, C. W.; Rose, J. K.; Saladie, M.; Kolli, V. S.; Albersheim, P.; Darvill, A. G.; York, W. S. (2003). Characterization of a tomato protein that inhibits a xyloglucan-specific endoglucanase. **Plant Journal**, 34: 327-38.

- Qutob, D.; Kamoun, S.; Gijzen, M. (2002). Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. **The Plant Journal**, 32: 361-373.
- Resende, M. L. V.; Nojosa, G. B. A.; Silva, L. H. C. P.; Niella, G. R.; Carvalho, G. A.; Santiago, D. V. R.; Bezerra, J. L. (2000). *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patogênico ao cacau. **Fitopatologia Brasileira**, 25: 88-91.
- Rincones, J.; Mazott, G. D.; Griffith, G. W.; Pamela, A.; Figueira, A.; Leal G. A. Jr.; Queiroz, M. V.; Pereira, J. F., Azevedo, R.A.; Pereira, G. A.; Meinhardt, L. W. (2006). Genetic variability and chromosomal-length polymorphism of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various hosts in South America. **Mycological Research**, 110: 821-832.
- Rincones, J.; Meinhardt, L. W.; Vidal, B. C.; Pereira, G. A. (2003). Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, 107: 452-458.
- Rogers, L. M.; Kim, Y.; Guo, W.; Gonzales-Candelas, L.; Li, D.; Kolattukudy, P. E. (2000). Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 97: 9813-9818.
- Rubini, M. R.; Silva-Ribeiro, R. T.; Pomella, A. W.; Maki, C. S.; Araújo, W. L.; Dos Santos, D. R.; Azevedo, J. L. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom. **International Journal of Biological Sciences**, 1: 24-33.
- Rudgard, S. A. (1987). Witches' broom disease of cocoa in Rondonia, Brazil: Infection of vegetative flushes and flower cushions in relation to host phenology. **Plant Pathology**, 36: 523-530.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp. 1–125.
- Santos, J. K. (2001). **Obtenção e regeneração de protoplastos de *Crinipellis perniciosa*, Agente Etiológico da vassoura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao L.*)**. Tese de Mestrado, Viçosa, UFV, 40 pp.
- Sathyanarayana, N.; Gummadi, T.; Panda. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. **Process Biochemistry**, 38: 987-996.
- Scarpari, L. M.; Meinhardt, L. W.; Mazzafera, P.; Pomella, A. W.; Schiavinato, M. A.; Cascardo, J. C.; Pereira, G. A. (2005). Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. **Journal of Experimental Botany**, 56: 865-877.
- Scavetta, R. D.; Herron, S. R.; Hotchkiss, A. T.; Kita, N.; Keen, N. T.; Benen, J. A.; Kester, H. C.; Visser, J.; Journak, F. (1999). Structure of a plant cell wall fragment complexed to pectate lyase C. **Plant Cell**, 11: 1081-1092.
- Schols, H. A.; Voragen, A. G. J. (1994). Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by RGase. **Carbohydrate Resource**, 256: 83-95.
- Scott-Craig, J. S.; Panaccione, D. G.; Cervone, F.; Walton, J. D. (1990). Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. **Plant Cell**, 2: 1191-1200.
- Scott-Craig, J. S.; Panaccione, D. G.; Cervone, F.; Walton, J. D. (1990). Endopolygalacturonase is not required for pathogenicity of *Cochliobolus carbonum* on maize. **Plant Cell**, 2: 1991-1200.

- Scott-Craig, J. S.; Cheng, Y.-Q.; Cervone, F.; de Lorenzo, G.; Pitkin, J. W.; Walton, J. W. (1998). Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 1497-1503.
- Shaykh, M.; Soliday, C.; Kolattukudy, P. E. (1977). Proof for the production of cutinase by *Fusarium solani* f. *pisi* during penetration into its host, *Pisum sativum*. **Plant Physiology**, 60: 170-172.
- Shieh, M. T.; Brown, R. L.; Whitehead, M. P.; Cary, J. W.; Cotty, P. J.; Cleveland, T. E.; Dean, R. A. (1997). Molecular genetic evidence for the involvement of a specific poligalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 3548-3552.
- Shih, J.; Wei, Y.; Goodwin, P. H. (2000). A comparison of the pectate lyase genes, *pel-1* and *pel-2*, of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. **Gene**, 243: 139-150.
- Silva, S. D. V. M.; Matsuoka, K. (1999). Histologia da interação *Crinipellis perniciosa* em cacauzeiros susceptível e resistente à vassoura de bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, 24: 54–59.
- Silva, V. A. O.; Santos, J. K.; Cascardo, J. M.; Araújo, M.; Pereira, G. A. G.; Araújo, E. F.; Queiroz, M. V. (2003). Caracterização parcial do gene nitrato redutase em *Crinipellis perniciosa*. In: **49º. Congresso Nacional de Genética**. CD-ROM de Resumos, p. 1167-1167.
- Silva, V. A. O. (2005). **Isolamento, caracterização e regulação do gene que codifica nitrato redutase em *Crinipellis perniciosa***. Tese de Mestrado, Viçosa, UFV, 56 pp.
- Soberanis, W.; Rios, R.; Arevalo, E.; Zuniga, L.; Cabezas, O.; Krauss, U. (1999). Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao

- (*Theobroma cacao*) increases yield economically in eastern Peru. **Crop Protection**, 18: 677–685.
- Soriano, M.; Diaz, P.; Pastor, F. I. (2006). Pectate lyase C from *Bacillus subtilis*: a novel endo-cleaving enzyme with activity on highly methylated pectin. **Microbiology**, 152: 617-625.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology** 98: 503-517.
- Speacht, C. A.; Dirusso, C. C.; Novotny, C. P.; Ullrich, R. C. (1982). A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytic Biochemistry**, 119: 158-163.
- Stahl D. J.; Schafer W. Cutinase Is Not Required for Fungal Pathogenicity on Pea. **Plant Cell**, 4: 621-629.
- Swofford, D. L. (2002). **PAUP* 4.0: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)**. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Templeton, M. D.; Keith, K. R.; Bowen, J. K.; Crowhurst, R. N.; Rikkerink, E. H. (1994). The pectin lyase-encoding gene (*pnl*) family from *Glomerella cingulata*: Characterization of *pnlA* and its expression in yeast. **Gene**, 142: 141-146.
- ten Have, A.; Mulder, W.; Visser, J.; Van Kan, J. A. (1998). The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 11: 1009-1016.
- ten Have, A.; Oude, B. W.; Wubben, J. P.; Visser, J.; van Kan, J. A. L (2001). *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase genes are differentially expressed in various plant tissues. **Fungal Genetics and Biology**, 33: 97–105.

- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 11: 4673-80.
- Tilburn, J.; Sarkar, S.; Widdick, D. A.; Espeso, E. A.; Orejas, M.; Mungroo, J.; Penalva, M. A.; Arst, H. N. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. **European Molecular Biology Organization Journal**, 14: 779-790.
- Treitel M. A.; Kuchins, S.; Carlson M. (1998). Snf1 protein kinase phosphorylation of the Mig1 repressor in *Sacharomyces cerevieae*. **Molecular and Cellular Biology**, 18: 6273-6280.
- Unkles, S. E. (1992). Gene organization in industrial filamentous fungi. In: **Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi**. Kinghorn, J. R.; Turner, G. (eds). University Press, Cambridge, p. 28-53.
- Valette-Collet, O.; Cimerman, A.; Reignault, P.; Levis, C.; Boccara, M. (2003). Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *Bcpme1* reduces virulence on several host plants. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 16: 360-367.
- van Kan, J. A.; Van't Klooster, J. W.; Wagemakers, C. A.; Dees, D. C.; Van der Vlugt-Bergmans, C. J. (1997). Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 10: 30-38.
- van Santen, Y.; Benen, J. A.; Schroter, K. H.; Kalk, K. H.; Armand, S.; Visser, J.; Dijkstra, B. W. (1999). 68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by sitedirected mutagenesis. **Journal of Biological Chemistry**, 274: 30474–30480.

- Vidal, S.; Doco, T.; Williams, P.; Pellerin, P.; York, W. S.; O'Neill, M. A.; Glushka, J.; Darvill, A. G.; Albersheim, P. (2000). Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. **Carbohydrates Research**, 326: 277-294.
- Vitali, J.; Schick, B.; Kester, H.C.M.; Visser, J.; Jurnak, F. (1998). The three-dimensional structure of *Aspergillus niger* pectin lyase B at 1.7 angstrom resolution. **Plant Physiology**, 116: 69–80.
- Wagner F., Kusserow H.; Schäfer W. (2000). Cloning and targeted disruption of two polygalacturonase genes in *Penicillium olsonii*. **FEMS Microbiology Letters**, 186: 293-299.
- Wattad, C.; Dinoor, A.; Prusky, D. (1994). Purification of pectate lyase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and its inhibition by epicatechin: a possible factor involved in the resistance of unripe avocado fruits to anthracnose. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 7: 293-297.
- Wattad, C.; Kobiler, D.; Dinoor, A.; Prusky, D. (1997). Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporioides* attacking avocado fruits: cDNA cloning and involvement in pathogenicity. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 50: 197-212.
- Wheeler, B. E. J. (1987). Plant pathology in a developing world. **Plant pathology**, 36: 430-437.
- Wijesundera, R. L. C.; Bailey, J. A.; Byrde, R. J. W. (1984). Production of pectin lyase by *Colletotrichum lindemuthianum* in culture and infected bean (*Phaseolus vulgaris*) tissue. **Journal of General Microbiology**, 130: 285-290.
- Wijesundera, R. L. C.; Bailey, J. A.; Byrde, R. J. W.; Fielding, A. H. (1989). Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: Their role in the development of bean anthracnose. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 34: 403-413.

- Willians, H. L.; Tang, Y.; Hintz, W. E. (2002). Endopolygalacturonase is encoded by a multigene family in the basidiomycete *Chondrostereum purpureum*. **Fungal Genetics and Biology**, 36: 71-83.
- Wirsel, S.; Lachmund, A.; Wildhardt, G.; Ruttkowski, E. (1989). Three α -amylase genes of *Aspergillus oryzae* exhibit identical intron-exon organization. **Molecular Microbiology**, 3: 3-14.
- Wubben, J. P.; ten Have, A.; Van Kan, J. A. L.; Visser, J. (2000). Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon repression. **Current Genetics**, 37: 152-157.
- Yakoby, N.; Freeman, S.; Dinoor, A.; Keen, N. T.; Prusky, D. (2000). Expression of pectate lyase from *Colletotrichum gloeosporioides* in *C. magma* promotes pathogenicity. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 13: 887-891.
- Yakoby, N.; Beno-Moualem, D.; Keen, N. T.; Dinoor, A.; Pines, O., Prusky, D. (2001). *Colletotrichum gloeosporioides* *pe1B* is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. **Molecular Plant Microbe Interactions**, 14: 988-995.
- Yamada, M. M.; Anderbrahn, T.; Furtek, D. B. (1998). Genetic variability among isolates of *Crinipellis pernicioso* from solanaceous hosts and their relationship to isolates from *Theobroma cacao*. **Agrotrópica**, 10:123-126.
- Yang, Z.; Rogers, L. M.; Song, Y.; Guo, W.; Kolattukudy, P. E. (2005). Homoserine and asparagine are host signals that trigger in planta expression of a pathogenesis gene in *Nectria haematococca*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 102: 4197-202.
- Yoder M. D.; Keen N. T.; Jurnak F. (1993). New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. **Science**, 260: 1503–1507.

Yoder, M. D.; Journak, F. (1995). The refined three-dimensional structure of pectate lyase C from *Erwinia chrysanthemi* at 2.2 Å resolution—Implications for an enzymatic mechanism. **Plant Physiology**, 107: 349–364.