Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Avaliação da expressão de genes de *T. cacao* e *C. perniciosa* associados a
resistência e patogenicidade no período assintomático da doença
Vassoura-de-Bruxa.**

Gildemberg Amorim Leal Junior

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2006

Gildemberg Amorim Leal Junior

Engenheiro Agrônomo

Avaliação da expressão de genes de *T. cacao* e *C. perniciosa* associados a resistência e patogenicidade no período assintomático da doença Vassoura-de-Bruxa.

Orientador:

Prof. Dr. **ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA FIGUEIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola.

Piracicaba

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Leal Junior, Gildemberg Amorim

Avaliação da expressão de genes de *T. cacao* e *C. pernicioso* associados a resistência e patogenicidade no período assintomático da doença Vassoura-de-Bruxa/ Gildemberg Amorim Leal Junior. - - Piracicaba, 2006.
124 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Cacau 2. Expressão gênica 3. Fitopatógenos 4. Hibridização 5. Resistência genética vegetal 6. Vassoura-de-bruxa I. Título

CDD 633.74

Dedico a minha esposa
Silmara Moriya e aos filhos
vindouros

Ofereço aos meus pais Gildemberg
Amorim Leal e Clarice Corrêa Leal

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira pelos ensinamentos, atenção e paciência durante os sete anos de convivência;

Ao Prof Dr. Flavio Tavares inicialmente por ter me aceitado no grupo PET-Biotecnologia e por permitir, durante muito tempo, que eu pudesse usufruir o ambiente familiar do seu laboratório no qual muito aprendi e pude realizar durante a minha pós-graduação;

Ao pesquisador Paulo Albuquerque da ESJOH/CEPLAC por todo o período ter se mantido disposto a dar o suporte necessário para a realização dos experimentos com *T. cacao*, ao companheirismo e por propiciar o convívio agradável com colega Edivaldo Emiliano Pimentel.

Aos amigos Luiz Humberto Gomes e Keila Maria Roncato Duarte pelo longo tempo de convivência, companheirismo, amizade e ensinamentos;

Aos colegas que passaram e aos que ainda estão no laboratório de Levedura da ESALQ e do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA;

A República Popular e Democrática Lesma Lerda por compor hoje a minha segunda maior saudade;

Ao CNPq pela bolsa concedida e a FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA DO CACAUUEIRO (<i>Theobroma cacao</i> L.) A VASSOURA-DE-BRUXA (AGENTE CAUSAL <i>Crinipellis pernicioso</i>).....	26
Resumo	27
Abstract.....	28
2.1 Introdução	29
2.2 Desenvolvimento	32
2.2.1 Material e Métodos	32
2.2.1.1 Material vegetal e inóculo de <i>Crinipellis pernicioso</i>	32
2.2.1.2 Inoculação da plantas.....	33
2.2.1.3 Extração de RNA total de ramos	33
2.2.1.4 Detecção de transcritos de <i>C. pernicioso</i> nas amostras inoculadas.....	34
2.2.1.5 Construção da biblioteca SSH	34
2.2.1.6 Sequenciamento	35
2.2.1.7 Análise das sequências e anotação	35
2.2.1.8 Validação da biblioteca por amplificação enzimática quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)	36
2.2.2 Resultados.....	37
2.2.2.1 Ensaio de inoculação	37
2.2.2.2 Detecção de <i>C. pernicioso</i> pela amplificação de transcritos de <i>RpL35</i> em plantas inoculadas	38
2.2.2.3 Bibliotecas subtrativas por supressão de <i>T.cacao</i> inoculado.....	40
2.2.2.4 Anotação das sequências	40
2.2.2.5 Validação da biblioteca por amplificação enzimática quantitativas de transcritos reversos (RT-qPCR)	44
2.3 Conclusões.....	56

Referências	56
3 GENES DE <i>Crinipellis pernicioso</i> RESPONSIVOS A FALTA DE NITROGÊNIO <i>IN VITRO</i> SÃO DIFERENCIALMENTE REGULADOS DURANTE A INFECÇÃO DE CACAUEIROS (<i>Theobroma cacao</i>)	67
Resumo	68
Abstract.....	69
3.1 Introdução.....	70
3.2 Desenvolvimento	73
3.2.1 Material e Método	73
3.2.1.1 Material vegetal, inóculo e isolado de <i>Crinipellis pernicioso</i>	73
3.2.1.2 Condições de cultivo utilizadas para elaborar a biblioteca.....	73
3.2.1.3 Construção da biblioteca SSH	74
3.2.1.4 Sequenciamento.....	75
3.2.1.5 Análises das sequências e anotação.....	75
3.2.1.6 Validação da biblioteca por amplificação enzimática quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)	76
3.2.1.7 Inoculação das plantas	77
3.2.1.8 Extração de RNA total de ramos	77
3.2.1.9 Detecção de transcritos e análise da expressão dos transcritos de <i>C. pernicioso</i> nas plantas inoculadas	77
3.2.2 Resultados.....	78
3.2.2.1 Desenvolvimento do fungo nas condições de cultivo	78
3.2.2.2 Bibliotecas subtrativas.....	79
3.2.2.3 Anotação das sequências	80
3.2.2.4 Validação da biblioteca por amplificação enzimática quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)	80
3.2.2.5 Detecção de <i>C. pernicioso</i> em plantas inoculadas através da amplificação de genes transcritos pelo fungo	82
3.2.2.6 Análise da expressão dos transcritos de fungos nas plantas inoculadas.....	85
3.2.3 Discussão	87
3.3 Conclusões.....	93

	7
Referências	93
APÊNDICES	103

RESUMO

Avaliação da expressão de genes de *T. cacao* e *C. perniciosa* associados a resistência e patogenicidade no período assintomático da doença Vassoura-de-Bruxa.

O basidiomiceto *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (Tricholomataceae), é um parasita hemibiotrófico causador da doença Vassoura-de-Bruxa do cacauzeiro (*Theobroma cacao*). Os sintomas da vassoura incluem o excesso de brotações em ramos e almofadas florais, abortamento de flores e frutos novos e formação de manchas necróticas nos frutos em maturação. Causando perda na produção. Para a identificação de genes diferencialmente expressos no hospedeiro, no período assintomático, duas bibliotecas subtrativas foram construídas confrontando o genótipo suscetível 'ICS 39' e o resistente 'CAB 214', inoculados. Uma análise detalhada de 23 genes por PCR quantitativo revelou diferenças na cinética da indução no período assintomático. A indução dos genes no genótipo suscetível em resposta ao *C. perniciosa* foi atrasada e reduzida, e no resistente houve uma indução mais rápida e intensa, com dois momentos de indução (24 e 120 horas após inoculação). Os genes e mecanismos de patogenicidade *Crinipellis perniciosa* são amplamente desconhecidos. Genes presumíveis de patogenicidade de *Crinipellis perniciosa* foram identificados em uma biblioteca enriquecida por hibridização subtrativa supressiva para genes induzidos sob baixa disponibilidade de Nitrogênio. Oito genes foram avaliados para expressão *in vitro* e em plantas inoculadas por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) e, dos sete expressos diferencialmente sob a carência de N, seis foram induzidos durante os períodos assintomáticos, corroborando a hipótese de convergência na via de sinalização para estresse nutricional abiótico e a patogênese.

Palavras chave: *Theobroma cacao*, Vassoura-de-Bruxa, *Crinipellis perniciosa*, Resistência, Patogenicidade, Expressão gênica, Estresse de nitrogênio, Biblioteca subtrativa por supressão, SSH, Fase assintomática.

ABSTRACT

Evaluation of *T. cacao* and *C. pernicios* gene expression associated with resistance and pathogenicity of witches' broom disease.

The basidiomycete *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer (Tricholomataceae) is the causal agent of witches' broom disease in *Theobroma cacao* (cacao). The hemibiotrophic pathogen infects meristematic tissues (shoots, flower cushions, single flowers and developing fruits). Hypertrophic growth of infected buds ('brooms') is the most dramatic symptoms, but economic losses result from pod infection. To identify genes differentially expressed in the host during the symptomless stage, two subtractive suppressive libraries were constructed, subtracting in both directions transcripts from the inoculated susceptible genotype 'ICS 39' and from the resistant 'CAB 214'. Quantitative reverse transcription amplification (RT-qPCR) of 23 genes identified as differentially expressed revealed distinct kinetics of gene induction at the asymptomatic stage. Expression induction in the susceptible genotype in response to *C. pernicios* was delayed and limited, while in the resistant, there was a quicker and more intense reaction, with two peaks of gene induction at 48 and 120 h after inoculation.. Pathogenicity genes and mechanisms of *Crinipellis pernicios* are largely unknown.. Putative pathogenicity genes from *Crinipellis pernicios* were identified in a cDNA library enriched by subtractive suppressive hybridization for genes induced under limiting Nitrogen. The eight genes were analysed for expression by quantitative amplification of reversed transcripts (RT-qPCR) *in vitro* and inoculated plants, and from the seven differentially expressed under N deprivation, six were induced under the symptomless stage of the disease, corroborating the hypothesis of convergence between the signal pathway for nutritional stress and pathogenesis.

Keywords: Cacao; Cocoa; *Theobroma cacao*; witches' broom; *Crinipellis pernicios*; Resistência; Gene expression; Pathogenicity; Nitrogen starvation; Subtractive suppressive libraries; SSH ; Gene expression; Asymptomatic stage.

1 INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta nativa das florestas tropicais úmidas da bacia Amazônica e é cultivado por produzir sementes que quando fermentadas, secas, torradas e prensadas fornecem manteiga e massa de cacau, matérias primas fundamentais para a indústria de chocolates, confeitos e cosméticos. A produção de cacau mundial é de aproximadamente 3 milhões de toneladas sendo que 70% está concentrada no continente Africano (Costa do Marfim, Gana e Nigéria). O restante da produção mundial é obtido dos países da Ásia e América do Sul e Central que contribuem com 16% e 14%, respectivamente (GUYTON, 2006).

Atualmente o Brasil representa o sexto maior produtor de cacau, com 160 mil toneladas ano (GUYTON, 2006) e 70% da produção é originária de regiões produtoras localizadas no Sul da Bahia (Anuário estatístico do Brasil, 2003). Devido a proporcionalidade da produção nacional, esta cultura além de ser a principal atividade econômica da região também tem o caráter conservacionista. A importância ecológica é devido as lavouras serem implantadas no sistema de cabruca que caracteriza pelo cultivo sombreado por árvores da vegetação nativa, no caso a mata atlântica. Os 500 mil hectares de lavouras espalhadas pelo Sul da Bahia, implantadas por este sistema agro-florestal, funcionam como corredor de passagem para animais silvestres que vivem nos fragmentos de florestas nativas, adjacentes aos cultivos (ALGER; CALDAS, 1996).

A doença Vassoura-de-Bruca é endêmica da região Amazônica e a sua introdução em regiões produtoras de cacau provocou o colapso das lavouras no Suriname, Trinidad, Equador (ANDEBRHAN et al., 1998) e mais recentemente no Sul da Bahia (PEREIRA et al., 1990). O aparecimento da Vassoura-de-Bruca, causada pelo basidiomiceto *Crinipellis perniciosa*, no sul da Bahia em 1989 levou a total destruição da lavoura cacauieira (PEREIRA et al., 1990), que era cultivada, principalmente, com variedades altamente suscetíveis (PINTO; PIRES, 1998). Anualmente estima-se que as perdas geradas pela doença nos países produtores da América alcance cerca de 450.000 toneladas ano⁻¹ (BOWERS et al., 2001). Os métodos de controle da Vassoura-de-Bruca do cacauieiro incluem o manejo e poda fitossanitária (remoção das partes infectadas); controle químico e biológico, mas apenas o uso de variedades resistentes representa uma solução econômica e ambientalmente viável (PURDY; SCHIMDT, 1996).

O fungo *Crinipellis perniciosa*, com reclassificação proposta para *Moniliophthora perniciosa* (AIME; PHILLIPS-MORA, 2005), é um patógeno hemibiotrófico, que exibe um tipo

de micélio em cada fase do ciclo de vida. Em tecidos infectados verdes, o micélio é largo (5 a 8 μm), biotrófico, sem grampos de conexão e com crescimento intercelular. Após a necrose do tecido infectado por razões desconhecidas, o micélio típico torna-se mais fino (1,5 a 3 μm), com grampo de conexões e é encontrado inter- e intracelularmente (DELGADO; COOK, 1976; GRIFFITH; HEDGER, 1994). O micélio saprofítico pode ser prontamente isolado em meio artificial, mas é incapaz de infectar o cacaueiro e não produz basidiocarpos em cultura (PURDY; SMITH, 1996). A produção de basidiocarpos requer o crescimento de micélios em meio específico (GRIFFITH; HEDGER, 1993).

Nos basidiocarpos são produzidos os basidiósporos única estrutura infectiva do patógeno (PURDY; SMITH, 1996). Os basidiósporos depositados na planta, após a germinação, infectam os tecidos meristemáticos do cacaueiro (ramos, almofadas florais, flores e frutos em desenvolvimento do cacaueiro) induzindo uma série de sintomas, dependendo do órgão infectado e seu estágio de desenvolvimento (PURDY; SMITH, 1996). O crescimento hipertrófico de gemas infectadas, denominadas de vassouras, consiste no sintoma mais característico da doença. A infecção de almofadas florais leva o surgimento de lançamentos vegetativos, a produção de flores anormais e frutos paternocárpicos. As infecções nos frutos em desenvolvimento causam a perda direta de sementes, sendo que a produção de frutos também é afetada indiretamente pela infecção de flores e pela redução da área fotossintética devido à morte dos ramos doentes. O ciclo do patógeno completa-se com a produção de basidiocarpos em vassouras necrosadas e frutos secos e reinicia com a liberação de basidiósporos na atmosfera (PURDY; SMITH, 1996).

Os métodos de controle da Vassoura-de-Bruja incluem o controle químico, podas fitossanitárias, controle biológico e resistência genética. O controle químico da Vassoura-de-Bruja com fungicidas de contato não é eficiente, pois eles não protegem os tecidos em crescimento ativo, necessitando inúmeras pulverizações (ALBUQUERQUE et al, 2005). O manejo fitossanitário da Vassoura-de-Bruja é realizado em todos os países afetados. As vassouras são removidas durante o período da seca com o objetivo de reduzir o inóculo produzido no período chuvoso, diminuindo a incidência da doença no próximo ciclo produtivo da cultura. A poda fitossanitária tem sido no controle da Vassoura-de-Bruja, junto com o controle genético, o manejo mais eficaz na maioria dos países produtores de cacau da Amazônia (ANDEBRHAN et al, 1993). O fator limitante da adoção da poda fitossanitária é o custo elevado com a mão-de-obra e a necessidade de ser realizada anualmente e no mínimo 4 vezes ao ano, dificultando a

adoção por todos os produtores (LUZ et al, 1997). O controle biológico fundamenta-se no uso de fungos saprofíticos (ex. *Trichoderma stromaticum*) que são competidores pela colonização das vassouras secas de modo a evitar o desenvolvimento de *C. perniciosa* e a produção de basidiocarpos, (BASTOS, 1996; SANOGO et al., 2002). Mas ainda não apresenta eficácia no controle de partes afetadas. A forma definitiva e mais eficiente de controle consiste no emprego de variedades resistentes.

O melhoramento do *T. cacao* para resistência a Vassoura-de-Bruxa iniciou-se no Equador a partir de 1918, através de seleção massal de plântulas originadas de árvores selecionadas sem sintomas, conhecidos como ‘refractários’ (BARTLEY, 1986). A resistência também foi avaliada em cultivos comerciais em Trinidad na década de 1930, mas apenas pequenas variações de reação à infecção foram detectadas (BAKER; HOLLIDAY, 1957). Na busca da resistência, cacauzeiros silvestres foram coletados no vale Amazônico por via seminal em 1938, e por via clonal em 1942 (POUND 1938; 1943). Esses materiais foram enviados para Trinidad, onde foram avaliados para resistência à Vassoura-de-Bruxa. Os clones ‘Scavina 6’ e ‘Scavina 12’ destacaram-se como altamente resistentes- enquanto o genótipo ‘IMC 67’ foi considerado moderadamente resistente (BARTLEY, 1986). O ‘Scavina 12’ era considerado heterozigoto para resistência, enquanto ‘Scavina 6’ foi considerado homozigoto, mas devido a suas características agrônomicas inferiores, principalmente peso de sementes e auto-incompatibilidade, esses genótipos não foram utilizados diretamente como clones, mas empregados como genitores de combinações híbridas. O programa de melhoramento de Trinidad foi bem sucedido no desenvolvimento das séries de clones TSH (‘Trinidad Selected Hybrids’) e TSA (‘Trinidad Selected Amazonian’), derivadas de seleções realizadas em famílias de cruzamentos contendo ‘Scavina 6’ como genitor (BARTLEY, 1986). Esses clones foram usados comercialmente em Trinidad, e parecem ter contribuído para redução do nível de ataque da vassoura (LAKER; SREENIVASAN; KUMAR, 1988). Todo o material recomendado para substituição das lavouras de cacau no Sul da Bahia possuem o ‘Scavina 6’ com fonte de resistência, sejam os clones da serie TSH e TSA (por ex. TSH 1188; TSH 565, TSH 516), ‘EET 397’ e os híbridos varietais “TheoBahia” (PINTO; PIRES, 1998). ‘Scavina 6’ e ‘Scavina 12’ tem sido ainda considerados resistentes em Trinidad (LAKER; SREENIVASAN; KUMAR, 1988; SURUJDEO-MAHARAJ et al., 2003), entretanto ambos tem demonstrado sintomas de infecção desde 1976 (BARTLEY, 1986). A resistência de ‘Scavina 6’ possui caráter dominante e

predominantemente monogênica (BARTLEY, 1986; BROWN et al., 2005; QUEIROZ et al., 2003;) que está associado a um loco principal de característica quantitativa (Quantitative Trait Loci - QTL) no grupo de ligação 9 responsável por explicar até 51% da variância fenotípica para resistência (BROWN et al., 2005; FALEIRO et al., 2006). No Equador e Colômbia, o ‘Scavina 6’ foi considerado inicialmente resistente, entretanto, a resistência de ‘Scavina 6’ foi quebrada alguns anos após sua re-introdução (BARTLEY, 1986).

Atualmente a base genética dos materiais utilizados pelos agricultores no Brasil é muito estreita, sendo que na Bahia, as maiorias destes materiais ainda são susceptíveis a Vassoura-de-Bruca (FONSECA; ALBUQUERQUE, 2000). Considerando a variabilidade do patógeno e o número restrito de acessos com característica de resistência, a obtenção de novas fontes de resistência a *C. perniciosa* tem sido uma das principais prioridades dos programas de melhoramento conduzidos pela CEPLAC do Ministério da Agricultura. No programa de seleção da ERJOH, CEPLAC, que é baseada na avaliação dos níveis de resistência à Vassoura-de-Bruca na coleção de germoplasma de cacaueiros no campo, foram identificados genótipos com níveis desejáveis de resistência (ALBUQUERQUE; BASTOS, 2001; FONSECA; ALBUQUERQUE, 2000) e divergentes geneticamente de ‘Scavina 6’ (ALBUQUERQUE, 2006; SILVA et al, 1998), com denominação de acesso ‘CAB 208’, ‘CAB 214’, ‘CAB 270’ e ‘RB 36’. Dos materiais selecionados pela CEPLAC, foram elaborados com os genótipos ‘CAB 208’ e ‘CAB 214’ dois mapas ligação conjuntos para o cruzamento contrastante com o ICS 39, utilizando com marca *locus* de microsátélites (ALBUQUERQUE, 2006). Com estes mapas, foi possível identificar de forma preliminar 3 regiões genômicas localizadas em grupos de ligação distintos relacionados com a resistência a Vassoura-de-Bruca: um presente no grupo de ligação VII para o ‘CAB 208’; e os outros dois no ‘CAB 214’, sendo um no grupo de ligação IV e outro no grupo de ligação IX, este já identificado no ‘Scavina 6’ (FALEIRO et al. 2006). Demonstrando que os materiais coletados ‘CAB 208’ e ‘CAB 214’ são fontes promissoras para o aumento da base genética da resistência à Vassoura-de-Bruca.

A resistência à Vassoura-de-Bruca é avaliada pela incidência de sintomas e a busca por componentes de resistência permitiria selecionar genótipos que apresentem resistência parcial, que consiste na duração do período de latência, colonização de vassouras, tempo para morte de vassouras, formação de basidiocarpos e o número de basidiocarpos produzidos por vassoura seca (ANDERBRAHN; ALMEIDA, NAKAIAMA, 1998). A adoção da avaliação de alguns

parâmetros secundários dos sintomas foram propostos na tentativa de evidenciar este componentes, mas a coleta e interpretação do dados mostrou-se pouco informativos (SILVA; LUZ; MATSUOKA, 1998). A dificuldade na decomposição dos componentes da resistência, a partir de avaliações sintomatológicas, é devido os sintomas resultarem de alterações morfológicas dos tecidos meristemáticos, causadas por distúrbios fisiológicos ainda pouco conhecidos. Provavelmente associados com a produção e/ou degradação de reguladores de crescimento pelo patógeno (MUSE et al., 1996). Uma outra forma de melhor mensurar os componentes relativos de resistência parcial seria avaliação da colonização dos tecidos pelo patógeno. Porém a quantificação precoce do fungo em tecidos colonizados por microscopia não foi possível antes das 72 h (SILVA; MATSUOKA, 1999). O crescimento micelial é detectável aos sete dias ocorrendo tanto em material suscetível quanto resistente e parece ser mais abundante no suscetível (FRIAS, 1991; SILVA; MATSUOKA, 1999). Quando os sintomas são visíveis não existe diferença na colonização entre os genótipos suscetíveis e resistentes, na avaliação aos 80 dias (SILVA; MATSUOKA, 1999). Fonseca (1990) observou uma correlação parcial entre a manifestação dos sintomas e a colonização dos tecidos entre genótipos resistentes e suscetíveis. A quantificação de micélio em tecidos inoculados por microscopia é trabalhosa e não permite uma avaliação de grande número de amostras. Penmam et al. (2000) exploraram a quantificação de *C. pernicioso* em tecidos de cacauete sintomáticos pela avaliação quantitativa de quitina, manose e ergosterol em extratos de cacaueiros infectados sem relacionar com o aparecimento de sintomas e constatou-se que há uma maior presença do micélio da região basal do ramo com sintomas do que no ápice, não sendo possível a determinação em tecidos assintomáticos. A relação entre a quantidade de micélio e o modo de interação com planta ainda não está bem esclarecido entre *C. pernicioso* e *T.cacao*.

Os componentes de resistência podem ser evidenciados pelo estudo da expressão de genes envolvidos na resposta de defesa. Os genes da resposta de defesa podem ser classificados como os envolvidos no reconhecimento do patógeno e no mecanismo de defesa. Os genes responsáveis pelo reconhecimento e transdução de sinal são os genes de resistência (HAMMOND-KOSACK; JONES 1997) e os de defesa codificam para proteínas relacionadas com a patogênese (BOL; LINTHORST; CORNELISSEN, 1990; STINTZI et al. 1993). A função dos genes responsáveis pela defesa é conter a invasão, o crescimento e a reprodução do patógeno da planta. A avaliação da indução destes genes pode indicar quando e como os genes

estão atuando, baseado nas funções já relatadas. Durante a infecção o padrão de indução e expressão pode diferenciar genótipos contrastantes como relatados para *A. thaliana* com *Pseudomonas syringae* (TAO et al., 2003) e *Olea europaea* com o fungo biotrófico *Spillocaea oleagina* (BENITEZ et al, 2005), cuja expressão gênica entre resistente e suscetível foi qualitativamente similar, porém elas se diferenciavam quantitativamente e o suscetível caracterizava-se por ter uma indução tardia.

Em cacaueteiro, genes associados à resistência e defesa foram identificados em bibliotecas de EST de folhas e sementes (JONES et al., 2002) e bibliotecas obtidas a partir de folhas tratadas com elicitores de resistência do tipo Benzothiadazole (BTH), etileno, metil jasmonato e NEP1-elicitor proteico purificado de *Fusarium oxysporum*-(VERICA et al., 2004). Genes Análogos de Resistência (GAR) e genes de defesa também têm sido buscados, utilizando a abordagem de amplificação com iniciadores degenerados para regiões conservadas de transcrição, para posterior localização nos mapas genéticos (BORRONE; KUHN;SCHNELL, 2004; BROWN et al., 2005; LANAUD et al, 2004) e avaliação da expressão. A construção de bibliotecas específicas para a interação com o patógeno é necessária devido à sobreposição de genes induzidos por elicitores e por patógeno ser inferior a 20% (SCHENK et al., 2000).

No estudo da interação planta-microrganismo, a construção de bibliotecas SSH tem se mostrado eficiente na obtenção de seqüências relativas a resposta de defesa ao organismo com o qual interage (FERNANDEZ et al., 2004; GUILLEROUX; OSBOURN, 2004; LU et al., 2004). Porém, devido a baixa representatividade de genes do patógeno nas bibliotecas, a probabilidade de identificar genes do patógeno torna-se difícil. Necessitando de um número exaustivo de seqüenciamento para identificação de seqüências do fungo (BENITEZ et al., 2005; GUILLEROUX; OSBOURN, 2004). Uma outra limitação na busca de genes em bibliotecas de interação é a identificação exata de genes do transcriptoma do hospedeiro e do patógeno, sendo necessário o uso de ferramentas de bioinformática (BIRCH; KAMOUN, 2000). Uma forma direcionada para identificar genes potenciais responsáveis pela virulência e patogenicidade seria através do conjunto de genes induzidos no cultivo *in vitro* sob falta de carbono ou nitrogênio. O cultivo *in vitro* de patógenos em condições de deficiência de nitrogênio tem evidenciado genes também recrutados durante a patogênese (SNOEIJERS et al., 2000) que apresentam na região promotora locais para acoplamento de fatores de transcrição ligados ao metabolismo de nitrogênio. Reforçando a relação entre o dois estímulos (SNOEIJERS et al., 2000). Abordando

esta estratégia genes candidatos têm sido identificados em alguns patógenos como *Cladosporium fulvum*, *Gibberella zeae* e *Magnaporthe grisea* (COLEMAN et al., 1997; DONOFRIO et al., 2006; TRAIL et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi diferenciar genótipos resistentes ('CAB 214' e 'CAB 208') e suscetíveis através da expressão gênica e identificar genes de patogenicidade candidatos para *C. pernicioso*. A diferenciação dos genótipos resistente e suscetível foi baseada na expressão de genes gerados a partir de bibliotecas subtrativas enriquecidas com genes mais expressos em plantas infectas assintomática de genótipo resistente ('CAB 214') e suscetível ('ICS 39'). Os genes de patogenicidade candidatos foram identificados em uma biblioteca subtrativa enriquecida para genes diferencialmente expressos em condições limitantes de nitrogênio e a expressão foi avaliada em plantas assintomática do genótipo suscetível 'ICS 39'.

Referências

AIME, MC., PHILLIPS-MORA W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, Lancaster, v. 97, n. 5, p. 1012–1022, Sept-Oct. 2005.

ALBUQUERQUE, P.S.B. **Mapas de ligação e controladores de características quantitativas (QTL) associadas à resistência a *Crinipellis pernicioso* em acessos de cacaueiro (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia brasileira**. 2006. 133p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

ALBUQUERQUE, P.S.B.; BASTOS, C.N.; LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. Doenças do cacaueiro. In. KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZEMBE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 4 ed. Piracicaba: Ceres 2005. v. 2, cap. 18, p 151-164.

ALMEIDA, C.M.V.C.; BARRIGA, J.P.; MACHADO, P.F.R.; BARTLEY, B.G.D. **Evolução do programa de conservação dos recursos genéticos de cacau na Amazônia Brasileira**. Belém: Ministério da Agricultura e Abastecimento; Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, 108 p, 1987.(Boletim Técnico no. 5)

ALMEIDA, C.M.V.C.; MACHADO, P.F.R.; BARRIGA, J.P.; SILVA, F.C.O. **Coleta de cacau (*Theobroma cacao* L.) da Amazônia brasileira**: uma abordagem histórica e analítica. Porto Velho: Ministério da Agricultura e Reforma Agrária; Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Porto Velho, 1995. 92 p.

ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L.C. DE; NAKAIAMA, L.H.I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (STAHEL) Singer: a experiência da amazônia brasileira. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 10, n. 2, p. 49-60, maio 1998

ANDEBRHAN, T.; FIGUEIRA, A.; YAMADA, M.M.; FURTEK, 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**, Dordrecht , v. 105, n. 2, p. 167-175, Feb. 1999.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL – 2003. Rio de Janeiro, v. 63, p.3-23, 2003.

ALGER, K.; CALDAS, M.. Cacau na Bahia: decadência e ameaça a mata atlântica. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 117, p. 28-35, jan./ fev. 1996.

BAKER, R.E.D.; HOLIDAY, P. Witches' broom disease of cocoa. **Phytopathological Paper**, London, v.2. 1957. 42 p.

BARTLEY, B.G.D. **Cacao, *Theobroma cacao***. Rome: FAO, 1986. p 25-42. (FAO Plant Production and Protection Paper n. 70)

BASTOS, C.N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Tricoderma viride* and *Crinipellis perniciosus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n.1, p. 50-54, mar. 1990.

BENITEZ, Y.; BOTELLA, M.A.; TRAPERO, A.; ALSALIMIYA, M.; CABALLERO, J.L.; DORADO, G.; BLANCO, J.M. Molecular analysis of the interaction between *Olea europaea* and the biotrophic fungus *Spillocaea oleagina*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 6, n.6, p. 425–438, July 2005.

BIRCH, P.R.J.; KAMOUN, S. Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. In: WOOD, R (Ed). **New technologies for life sciences: a trends guide**. New York: Elsevier Science, 2000. p. 77–82.

BOL J.F., LINTHORST H.J.M.; CORNELISSEN B.J.C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 113–138, 1990.

BORRONE, JW, KUHN, DN, SCHNELL, RJ. . Isolation, characterization, and development of WRKY genes as useful genetic markers in *Theobroma cacao*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 109, n.3, p. 495–507, Aug 2004.

BOWERS, J.H.; BAILEY, B.A.; HEBBAR, P.K.; SANOGO, S.; LUMSDEN, R.D. . The impact of plant diseases on world chocolate production. Disponível em: <Plant Health Prog. 10.1094/PHP-2001-0709-01-RV (<http://www.apsnet.org/online/feature/cacao/> online)> Acesso em: 14 nov. 2006.

BROWN, J.S.; SCHNELL, R.J.; MOTAMAYOR, J.C.; LOPES, U.; KUHN, D.N.; BORRONE, J.W. Resistance gene mapping for witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F₂ population using SSR markers and candidate genes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, St. Joseph, v. 130, n. 3, p. 366-373, May 2005.

COLEMAN, M.; HENRICOT, B.; ARNAU, J.; OLIVER, R.P. Starvation-induced genes of the tomato pathogen *cladosporium fulvum* are also induced during growth in planta. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul v. 10, n. 9, Dec. 1997.

DELGADO, J.C.; COOK, A.A. Nuclear condition of the basidia basidiospore and mycelial of *Marasmius perniciosus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 66-72, 1976.

DONOFRIO, N.M.; LUNDY, R.; PAN, H.; BROWN, D.E.; JEONG, J.S.; COUGHLAN S.; MITCHELL, T.K.; DEAN, R.A. Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 43, n. 9, p. 605–617, September 2006.

FALEIRO, F.G.; QUEIROZ, V.T.; LOPES, U.V.; GUIMARÃES, C.T.; PIRES, J.L.; YAMADA, M.M.; ARAÚJO, I.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA FILHO, G.A.; BROWN, J.S.; SCHNELL, R.; FERREIRA, C.F.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Mapeamento genético molecular do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) e QTLs associados à resistência à vassoura-de-bruxa. **Euphytica**, Wageningen, v. 149, n. 2, p. 227-235, Sept. 2006.

FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C.; BOM, M.C.; PETITOT, A.S.; SILVA, M.C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A.; ARGOUT, X.; NICOLE, M. Coffee (*Coffea Arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 6, p. 527–536, Nov. 2004.

FRIAS, G.A.; PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. Infection biology of *Crinipellis perniciosus* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 6, p. 552-556, 1991.

FONSECA, S.E.A. Avaliação de resistência a *Crinipellis perniciosus* em novos clones de *Theobroma cacao*. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 2, n. 3, p. 137-143, 1990.

FONSECA, S.E.A; ALBUQUERQUE, P.S.B. Avaliação de clones de cacau na Amazônia brasileira em relação a incidência de vassoura-de-bruxa. In.: INTERNATIONAL COCOA RESEARCH CONFERENCE, 12. 1996. Salvador, **Proceedings ...** Lagos: Cocoa Producers' Alliance, 2000, p. 149-153.

GRIFFITH, G.W.; HEDGER, J.N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosa* using a bran-vermiculite medium. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 99, n. 4, p. 227-230, July 1993.

GRIFFITH, G.W.; HEDGER, J.N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosa*. **Heredity**, London, v. 71, n. 3, p. 278-289, March 1994.

GUILLEROUX, M.; OSBOURN, A. Gene expression during infection of wheat roots by the 'take-all' fungus *Gaeumannomyces graminis*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 3, p. 203-216, May 2004.

GUYTON, B. **Cocoa market**: supply and outlook. Chocolate Manufactures Association. Production and Marketing statistics. Disponível em: <<http://www.worldcocoafoundation.org/info-center/fact-sheet.asp>> Acesso em: 20 nov. 2006.

HAMMOND-KOSACK K.E. AND JONES J.D.G.. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Palo Alto, v. 48, p. 575–607, June 1997.

JONES, P.G.; ALLAWAY, D.; GILMOUR, D.M.; HARRIS, C.; RANKIN, D.; RETZEL, E.R.; JONES, C.A. Gene discovery and microarray analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) varieties. **Planta**, Berlin, v. 216, n. 2, p. 255-264, Dec. 2002.

KUHN, DV, HEATH, M, WISSER, RJ, MEEROW, A, BROWN, JS, LOPES, U E SCHNELL RJ. 2003. Resistance gene homologues in *Theobroma cacao* as useful genetic markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 107, n. 2, p. 191-202, July 2003.

LAKER, H.A.; SREENIVASAN, T.N.; RAJ KUMAR, D. Present status of witches' broom disease of cocoa in Trinidad. **Tropical Pest Management**, London, v. 34, n. 3, p. 318-323, July 1988.

LANAUD, C.; RISTERUCCI, A.M.; PIERETTI, I.; N'GORAN, J.A.K.; FARGEAS, D. Characterisation and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Molecular Breeding**, Amsterdam, v. 13, n. 3, p. 211-227, Apr. 2004.

LIVAK, K.L.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

LU, G.; JANTASURIYARAT, C.; ZHOU, B.; WANG, G.L. Isolation and characterization of novel defense response genes involved in compatible and incompatible interactions between rice and *Magnaporthe grisea*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 108, n. 3, p. 525-534, Feb. 2004.

LUZ, E.D.M.N.; BEZERRA, J.L.; RESENE, M.L.V.; OLIVEIRA, M.L. Cacau. In. VALE, F.X.R.; ZAMBOLI, L. (Ed). **Controle de doenças de planta**. Viçosa: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília: Ministério da agricultura e desenvolvimento, 1997. cap. 13, p. 611-656.

MUSE, R.B.; COLLIN, H.A.; ISAAC, S.; HARDWICK, K. Effects of the fungus *Crinipellis pernicios*, causal agent of witches broom disease, on cell and tissue cultures of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 145-154, 1996.

PEGLER, D.N. *Crinipellis pernicios* (Agaricales). **Kew Bulletin**, Nowick, v. 32, p. 731-736, 1978.

PENMAN, D.; BRITTON, G.; HARDIWICK, H.A.; COLLIN, H.A.; ISAAC, S. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 6, p. 671-675, June 2000.

PEREIRA, J.L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J.M.; ALMEIDA, L.C.C. . First record on the presence of witches' broom disease in the principal cocoa-producing area of Brazil. **Tropical Agriculture**, Londo, v. 67, n. 2, p. 188-189, Apr. 1990.

PINTO, L.R.M.; PIRES, J.L.. **Seleção de plantas de cacau resistentes a vassoura-de-bruxa**. Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento. 1998. 34p. (Boletim Técnico n. 181).

PIRES, J.L.; CASCARDO, J.C.M.; LAMBERT, S.V.; FIGUEIRA, A. Increasing cocoa butter yield through genetic improvement of *Theobroma cacao* L: seed fat content variability, inheritance, and association with seed yield. **Euphytica**, Wageningen, v. 103, n. 1, p. 115-121, 1998.

PODILA, G.K.; ZHENG, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; SUNDARAM, S.; HIREMATHS, S.; BRAND, J.H.; HYMES, M.J. Fungal gene expression in early symbiotic interactions between *Laccaria bicolor* and red pine. **Plant and Soil**, The Hague, v. 244, n. 1-2, p.117–128, July 2002.

POUND, F.J. Cacao and witchbroom disease in South America. In: TOXOPEUS, H. **Reprint archives of cocoa research**, Brussels: American Cocoa Research Institute, 1938. v. 1 . 44p.

POUND F.J. Cacao and witches' broom disease (*Marasmius perniciosus*). In: TOXOPEUS, H. **Reprint archives of cocoa research**, Brussels: American Cocoa Research Institute, 1943. 43p.

PURDY, L.H.; SCHIMDT, R.A. Status of cacao witches broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.

QUEIROZ, V.T.; GUIMARÃES, C.T.; AHNERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R.T.; PEREIRA, M.G.; MIRANDA, V.R.M.; LOGUÉRCIO, L.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, Berlin, v.122, n. 3, p. 268-272, Mar. 2003.

SANOGO, R.C.; POMELLA, A.; HERBAR, P.K.; BAYLE, B.; COSTA, J.C.B.; SAMUELS, G.J.; LUMESDEN, R.D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cocoa. **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 10, p. 1032-1037, Oct. 2002.

SILVA, F.C.O.; NETO, E.F.; KODAMA, K.R.; FIGUEIRA, A.. Avaliação das relações genéticas entre genótipos de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) contrastantes para reação à vassoura-de-bruxa através de marcadores RAPD. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21(supl.), p. 205, 1998.

SILVA, S.D.V.M.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacaueteiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 54-59, mar. 1999.

SILVA, S.D.V.M.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacaueteiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 54-59, mar. 1999.

SNOEIJERS, S.S.; PEREZ-GARÇIA, A.; JOOSTEN, M.H.A.J.; WIT, P.J.G.M. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 6, p. 493–506, July 2000.

STAUB, J.E.; SERQUEN, F.C.; GUPTA, M. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 5, p. 729-741, 1996.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v. 97, n. 21, p. 11655–11660, Oct. 2000.

STINTZI A., HEITZ T., PRASAD V., WIEDEMANN-MERDINOGLU S., KAUFFMANN S., GEOFFROY, LEGRAND M. AND FRITIG B. Plant ‘pathogenesis- related’ proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v. 5, p. 687–706, 1993.

SURUJDEO-MAHARAJ, S.; UMAHARAN, P.; BUTLER, D.R.; SREENIVASAN, T.N. An optimized screening method for identifying levels of resistance to *Crinipellis pernicios* in cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 4, p. 464-475, Aug. 2003.

TAO, Y.; XIE, Z.; CHEN, W.; GLAZEBROOK, J.; CHANG, H.-S.; HAN, B.; ZHU, T.; ZOU, G.; KATAGIRI, F. Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 2, p. 317–330, Feb. 2003.

THARA, V.K.; FELLERS, J.P.; ZHOU, J.M. In planta induced genes of *Puccinia tritici*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, n. 1, p. 51–56, Jan. 2003.

TRAIL, F.; XU, J.R.; MIGUEL, P.S; HALGREN, R.G.; KISTLER, H.C. Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, n. 2, p. 187–197, Mar. 2003.

VAN DEN ACKERVEKEN, G.F.J.M.; DUNN, R.M.; COZIJNSEN, T.J.; VOSSEN P.; VAN DEN BROEK, H.W.J.; DE WIT, P.J.G.M. Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *Avr9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. **Molecular Genomics and Genetics**, Berlin, v. 243, n. 3, p. 277–285, May 1994.

VERICA, J.A.; MAXIMOVA, S.N.; STREM, M.D.; CARLSON, J.E.; BAILEY, B.A.; GULTINAN, M.J. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 6, p. 404–413, Nov. 2004.

2 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA DO CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.) A VASSOURA-DE-BRUXA (AGENTE CAUSAL *Crinipellis pernicioso*)

Resumo

Genes diferencialmente Expressos Associados à resistência do cacauero (*Theobroma cacao* L.) A vassoura-de-bruxa (agente causal *Crinipellis perniciosa*)

O basidiomiceto *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer (Tricholomataceae), é um parasita hemibiotrófico causador da doença Vassoura-de-Bruxa do cacauero (*Theobroma cacao*). Os sintomas da vassoura incluem o excesso de brotações em ramos e almofadas florais, abortamento de flores e frutos novos e formação de manchas necróticas nos frutos em maturação. Para a identificação de genes diferencialmente expressos no hospedeiro, no período assintomático, duas bibliotecas subtrativas foram construídas confrontando o genótipo suscetível 'ICS 39' e o resistente 'CAB 214', inoculados. Foi identificado um total de 187 unigenes, sendo 83 da biblioteca de 'ICS 39' subtraída com o resistente, e 104 na biblioteca do resistente subtraída do suscetível. Os genes identificados estão relacionados principalmente com transdução de sinal; resposta a estímulos bióticos e abióticos; metabolismo; metabolismo de proteínas, metabolismo de DNA e RNA e manutenção celular. Uma análise detalhada de 10 genes por PCR quantitativo revelou diferenças na cinética da indução no período assintomático. A indução dos genes no genótipo suscetível em resposta ao *C. perniciosa* foi atrasada e reduzida, e no resistente houve uma indução mais rápida e intensa, com dois momentos de indução (24 e 120 horas após inoculação). A expressão dos genes ocorre no período em que o fungo inicia a colonização, e a validação dos genes corrobora com diversas hipóteses de mecanismos de resistência descritos em outros sistemas.

Palavras-chave: Cacauero, *Theobroma cacao*, Vassoura-de-Bruxa, *Crinipellis perniciosa*, Resistência, Biblioteca subtrativa por supressão, SSH, Expressão gênica, Fase assintomática.

Abstract

Genes diferentially expressed in *theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *crinipellis pernicioso*

The basidiomycete *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer (Tricholomataceae) is the causal agent of witches' broom disease in *Theobroma cacao* (cacao). The hemibiotrophic pathogen infects meristematic tissues (shoots, flower cushions, single flowers and developing fruits). Hypertrophic growth of infected buds ('brooms') is the most dramatic symptoms, but economic losses result from pod infection. To identify genes differentially expressed in the host during the symptomless stage, two subtractive suppressive libraries were constructed, subtracting in both directions transcripts from the inoculated susceptible genotype 'ICS 39' and from the resistant 'CAB 214'. A total of 187 unique sequences were identified, with 83 from the library of the susceptible genotype 'ICS 39' subtracted from the resistant; and 104 from the resistant library subtracted from the susceptible. The identified genes were mainly classified into signal transduction; response to biotic and abiotic stress; metabolism; RNA and DNA metabolism, protein metabolism; cellular maintenance. Quantitative reverse transcription amplification (RT-qPCR) of 23 genes identified as differentially expressed revealed distinct kinetics of gene induction at the asymptomatic stage. Expression induction in the susceptible genotype in response to *C. pernicioso* was delayed and limited, while in the resistant, there was a quicker and more intense reaction, with two peaks of gene induction at 48 and 120 h after inoculation. This pattern of gene expression occurred when the pathogen started colonization. Validation of these genes corroborated similar hypothetical mechanisms of resistance in other systems.

Keywords: Cacao; cocoa; *Thebroma cacao*; witches' broom; *Crinipellis pernicioso*; Resistência; Subtractive suppressive librarie; SSH, Gene expression; Asymptomatic stage.

2.1 Introdução

A Vassoura-de-Bruxa, causada pelo basidiomiceto *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer (*Tricholomataceae*), consiste numa importante enfermidade do cacaueiro, restrita a América do Sul e Caribe (PURDY; SMITH, 1996). A doença é endêmica da região Amazônica e a sua introdução em regiões produtoras de cacau provocou o colapso das lavouras no Suriname, Trinidad e Equador (ANDEBRAHN; ALMEIDA; NAKAIAMA, 1998); e mais recentemente no Sul da Bahia (PEREIRA et al., 1990). Anualmente estima-se que as perdas geradas pela doença nos países produtores da América alcance cerca de 450.000 toneladas ano⁻¹ (BOWERS et al., 2001).

Basidiósporos infectam tecidos meristemáticos do cacaueiro (ramos, almofadas florais, flores e frutos em desenvolvimento) induzindo uma série de sintomas, dependendo do órgão infectado e seu estágio de desenvolvimento (PURDY; SMITH, 1996). A hipertrofia de ramos infectados (vassouras) é o sintoma mais característico. Nas almofadas florais infectadas geralmente há formação de lançamentos vegetativos, desenvolvimento de flores anormais e frutos patenocárpicos. A infecção nos frutos resulta em perdas das sementes que representam em média 90% do potencial de produção da área ou período (ALBUQUERQUE et al., 2005). A produção futura é prejudicada indiretamente devido à infecção das almofadas florais e comprometimento da copa.

O processo de infecção se inicia com a germinação dos esporos depositados nos tecidos e com a penetração do tubo germinativo via estômato (FRIAS; PURDY; SCHMIDT, 1991). Durante a penetração e colonização intercelular dos tecidos, não são observadas estruturas especializadas, como apressórios e haustórios, e é neste estágio que o fungo desenvolve a fase biotrófica monocariótica do seu ciclo de vida, (FRIAS; PURDY; SCHMIDT, 1991; SILVA; MATSUOKA, 1999). Os primeiros sintomas de hiperplasia e hipertrofia nos ramos surgem com 15 a 30 dias após a infecção (DELGADO; COOK, 1976). Com a morte dos tecidos afetados, observa-se a presença de hifas dicarióticas exibindo crescimento intracelular, com a presença de grampos de conexão, caracterizando a fase saprofítica do fungo (DELGADO; COOK, 1976). Após um período de chuva, basidiocarpos emergem dos tecidos secos, produzindo basidiósporos.

Entre o período de 6 a 72 h, que compreende a penetração e o início da colonização, foi descrita a ocorrência de hiperplasia e hipertrofia das células do córtex, porém não foi possível visualizar a presença do fungo (LAKER; SREENIVASAN; RAJ KUMAR, 1988; SILVA; MATSUOKA, 1999). O crescimento micelial parece ser mais abundante aos sete dias (FRIAS; PURDY; SCHMIDT, 1991), e a colonização dos tecidos acontece tanto em material suscetível quanto resistente (SILVA; MATSUOKA, 1999). A colonização inicial dos tecidos é maior nos genótipos suscetíveis, porém a quantidade de micélio em tecidos colonizados aos 80 dias não diferencia suscetíveis de resistentes (FONSECA, 1990; SILVA; MATSUOKA, 1999). Para isolados de *C. perniciosa* também foi possível associar taxa de crescimento com patogenicidade, isolados classificados como mais patogênicos apresentavam maior taxa de crescimento no material resistente do que aqueles menos patogênicos (WHEELER, 1985). Frias, Purdy e Schmidt (1991) descrevem a ocorrência de fluorescência nas células dos hospedeiros próximas do local de penetração, que aparece restringir o crescimento micelial em alguns casos, enquanto em outros as hifas colonizavam os tecidos. A intensidade da fluorescência foi correlacionada negativamente com grau de colonização durante as primeiras 24 h, mas sete dias após a infecção as áreas colonizadas apresentavam coloração dourada. (FRIAS; PURDY; SCHMIDT, 1991). Nos tecidos de genótipos suscetíveis e resistentes, já colonizados, foi observado o consumo das reservas de amido aos 30 dias (ALMEIDA; AGUILAR; ARAÚJO, 1998) e foi demonstrado que a síntese de taninos em plantas suscetíveis inoculadas se diferencia do controle no terceiro dia após a inoculação, indicando que a resposta da planta deve ser induzida no período inicial da colonização, quando os sintomas não são visualizados (SCARPARI et al., 2005).

O método mais importante de controle da Vassoura-de-Bruxa é o uso de variedades resistentes. Os controles químico e biológico são ineficientes e a poda fitossanitária é um controle com efeitos provisórios (PURDY; SMITH, 1996). A avaliação da resistência tem sido feita baseada na incidência e manifestação dos sintomas, mas os mecanismos de resistência são desconhecidos (SILVA et al., 1998). A resistência de ‘Scavina 6’ possui caráter dominante e predominantemente monogênica (BARTLEY, 1986; BROWN et al. 2005; FALEIRO et al. 2006; QUEIRÓZ et al., 2003). Por mapeamento genético, foi identificado um loco principal de característica quantitativa (Quantitative Trait Loci - QTL), no grupo de ligação 9, responsável por explicar até 51% da variância fenotípica para resistência (BROWN et al. 2005; FALEIRO et al. 2006; QUEIRÓZ et al., 2003). No entanto, a resistência de ‘Scavina 6’ já foi quebrada no

Equador e clones com o gene de resistência têm apresentado sintomas de infecção na Amazônia e Sul da Bahia. A quebra da resistência está associada à variabilidade genética do patógeno e novas fontes de resistência têm sido buscadas na região Amazônica (FONSECA; ALBUQUERQUE, 2000; SERENO et al. 2006). Entre as novas fontes identificadas, os genótipos ‘CAB 214’ e ‘CAB 208’ têm se destacado, apresentando níveis de resistência importante na região Amazônica e no Sul da Bahia (ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2004).

Uma abordagem para identificação de genes e elucidação de mecanismos de regulação e controle da expressão é a identificação e caracterização de genes expressos diferencialmente entre genótipos, condições, ou estágios de desenvolvimentos distintos. Em *T. cacao*, genes associados à resistência e defesa foram identificados em bibliotecas de EST de folhas e sementes (JONES et al., 2002), e a partir de folhas tratadas com elicitores de resistência do tipo Benzothiadazole (BTH) etileno, metil jasmonato e NEP1, elicitor proteico purificado de *Fusarium oxysporum* (VERICA et al., 2004). A elaboração de bibliotecas de genes pela abordagem de Hibridização Subtrativa por Supressão (*Suppression Subtractive Hybridization*, SSH; DIATCHENKO et al. 1996) é mais objetiva, pois se baseia na subtração de cDNAs de tecidos e/ou genótipos em condições biológicas distintas de forma a enriquecer bibliotecas para os genes diferencialmente expressos em termos qualitativos e quantitativos. A técnica tem sido utilizada para identificar genes induzidos no patossistemas eucalipto-*Pisolithus tinctorios* e trigo-*Puccinia tritici*, revelando 30% de seqüências desconhecidas e únicas (THARA; FELLERS; ZHOU, 2003; VOIBLET et al., 2001). Outros estudos incluem as interações planta-patógeno *Gossypium barbadense* e *Verticillium dahliae* (ZUO et al., 2005); *Oryza sativa* e *Magnaphorte grisea* (LU et al., 2004); *Triticum aestivum* e *Gaeumannomyces graminis* (GUILLEROUX; OSBOURN, 2004); e *Coffea arabica* e *Hemileia vastratix* (FERNANDEZ et al., 2004). As bibliotecas tem sido utilizadas para identificar genes induzidos na interação simbiótica da micorrizas *Laccaria bicolor* e *Pinus* (PODILA et al. 2002).

Este trabalho teve como objetivo identificar prováveis genes induzidos na resposta de defesa de *T.cacao* inoculados com *C. pernicioso* no período assintomático baseados em duas bibliotecas, subtraídas nos dois sentidos, contrastando genótipos resistente (‘CAB 214’) e suscetível (‘ICS 39’) inoculados, amostrando o transcriptoma com 24, 48, 72, 120 e 240 h. As duas bibliotecas permitiram identificar 187 unigenes durante a infecção, com 23 genes escolhidos para serem validados pela amplificação de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR): 13 foram

da biblioteca subtrativa derivada do material resistente em relação ao resistente, enquanto os outros 10 foram das resistentes subtraído do suscetível. Esses 23 genes representavam seqüências provavelmente classificadas funcionalmente para transdução de sinal, fatores de transcrição, proteínas relacionadas com a patogênese e enzimas relacionadas com metabolismo secundário. Todos os genes foram mais expressos no genótipo resistente. Comparativamente, os genes tenderam para uma expressão precoce e a indução foi mais intensa nos genótipos resistentes em comparação com o suscetível.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Material vegetal e inóculo de *Crinipellis perniciosa*

Mudas clonais dos acessos ‘CAB 214’ (resistente à Vassoura-de-Bruxa) e ‘ICS 39’ (suscetível) foram obtidas a partir da enxertia em mudas de cacaueteiro comum enquanto plântulas do suscetível controle ‘Catongo’(albino mutante) foram obtidas de semente de fruto de polinização aberta. Após o pegamento das borbulhas dos acessos ‘CAB 214’ e ‘ICS 39’, foi aguardado o desenvolvimento dos ramos e a formação de folhas novas por 2-3 meses em casa de vegetação na ‘Estação de Recursos Genéticos do Cacaueteiro José Haroldo’, Marituba, PA, Brasil (1°12’S; 49°13’O). Ramos de cacaueteiros infectados com *C. perniciosa* foram coletados no mesmo local. A produção de basidiocarpos nos ramos infectados foi induzida pela exposição a períodos alternados de seco e molhado (12 h). Os basidiocarpos coletados foram lavados com água destilada e imersos em suspensão de 0,5% clorofenicol. Os estipes foram removidos e os píleos aderidos à tampa de placa de Petri com gel de silicone. Os basidiósporos ejetados por 12 h foram coletados em uma suspensão de 16 % glicerol em agitação. A suspensão de esporos foi filtrada em membrana de 0,45 µm e os basidiósporos retidos na membrana foram ressuspensos novamente em 2 ml de 16% glicerol e mantidos em nitrogênio líquido. O isolado ESJOH-1 foi mantido em meio de batata dextrose agar (BDA) a temperatura ambiente.

2.2.1.2 Inoculação da plantas

Os meristemas apicais foram inoculados depositando 30 µl de uma suspensão de basidiósporos (10^5 esporos ml^{-1}) e mantidas em câmara úmida por 24 h. Plântulas de ‘Catongo’ inoculadas foram utilizadas como controle da eficiência da inoculação. As pontas dos ramos de plantas de ‘CAB 214’ e ‘ICS 39’, inoculados e não inoculados, foram coletadas com 24, 48, 72, 120 e 240 h após a inoculação e armazenadas em nitrogênio líquido até a extração de RNA. Para cada período de amostragem, foram coletadas 8 plantas inoculadas de cada genótipo e mais uma planta não-inoculada. Para avaliação da eficiência da inoculação, uma planta inoculada e outra não inoculada de cada período de coleta foram mantidas para avaliação aos 30 dias após a inoculação, sendo avaliadas no total 5 plantas inoculadas e 5 não inoculadas. A incidência da doença foi estimada pelo número de plantas que apresentavam alguns sintomas da doença (vassoura terminal e/ou axilar; comprimento de vassoura terminal; ocorrência de inchamento do caule, pecíolo e/ou pulvínulo; número de vassouras axilar com mais de 1 cm).

2.2.1.3 Extração de RNA total de ramos

O RNA total de ramos de *T. cacao* e micélio cultivado *in vitro* de *C. perniciosa* foi extraído usando o protocolo proposto por Verica et al (2004). Brevemente, o RNA total foi extraído de 2 g de tecido de *T. cacao* composta por duas amostras, que foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para um tubo de centrífuga, onde foi adicionado 15 ml de tampão de extração (2 % CTAB; 2% PVP; 100 mM Tris pH 8,0; 5 mM EDTA; 2 M NaCl; 2% β-mercaptoetanol). Após a homogeneização, 15 ml de clorofórmio foi adicionado, homogeneizado e centrifugado a 8000 g por 20 min a 4°C. O sobrenadante, aproximadamente 10 ml, foi transferido para um novo tubo de 15 ml, e o RNA total foi precipitado com 5 ml de uma solução 8 M de cloreto de lítio e incubado a 4°C por 12 h. O RNA total foi coletado por centrifugação a 8000 g por 30 min. O RNA total ressuspendido foi então purificado com o kit RNeasy

(Quiagen; Hilden; Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade e concentração do RNA foram visualizadas em gel de 1,2% agarose.

2.2.1.4 Detecção de transcritos de *C. perniciosa* nas amostras inoculadas

A presença de *C. perniciosa* nos tecidos infectados de *T. cacao* foi verificada por RT-PCR. Iniciadores específicos de *C. perniciosa* para o gene da proteína ribossomal L35 (*RpL35*) (5' ACTTCGGGTGCAAAAGATTG 3'; 5' TGGTCCTTCTTCGTCTGCTT 3') foram desenhados em seqüências depositadas no banco de dados genômicos de *C. perniciosa* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>). O cDNA de tecidos infectados das amostras coletadas com 24, 48, 72, 120 e 240 h foram analisadas por RT-qPCR para *RpL35*, usando o fragmento amplificado do cDNA de *C. perniciosa* cultivado in vitro, como controle positivo. A detecção do transcritos foi baseada na curva de dissociação específica para os produtos de PCR e por eletroforese de gel de agarose 1.5% com brometo de etídio.

2.2.1.5 Construção da biblioteca SSH

As bibliotecas foram construídas usando o kit PCR selected cDNA subtraction (Clontech; Mount View; CA; EUA). O cDNA foi sintetizado a partir da mistura dos RNA totais dos cinco períodos de coleta, totalizando 1 µg para cada genótipo. O cDNA foi sintetizado utilizando o kit SuperSMART (Clontech), posteriormente foi purificado utilizando o kit GFX (Amersham Biosciences; Piscataway; NJ; EUA) e visualizado após eletroforese em gel de 1,2% agarose. A abordagem utilizada para construção das bibliotecas subtrativas foi a realização da subtração cruzada entre os dois tratamentos inoculados, suscetível ('ICS 39') e resistente ('CAB 214'), nos dois sentidos. Primeiramente, o cDNA obtido do acesso suscetível ('ICS 39') foi utilizado como *tester* e o resistente ('CAB 214') como *driver*, e na segunda subtração, o cDNA de 'CAB 214' foi *tester* e o de 'ICS 39' foi o *driver*. O objetivo foi obter duas bibliotecas enriquecidas, uma com genes mais expressos no genótipo suscetível inoculado, e outra enriquecida com genes mais expressos no genótipo resistente, restringindo as redundâncias de seqüências induzidas nos dois materiais.

O cDNA *tester* foi preparado fazendo a digestão com *RsaI*, e a população de moléculas foi separada em duas metades, e a ligação dos adaptadores 1 e 2 ocorreram separadamente. A população de cDNA utilizada como *driver* foi apenas digerida com a enzima *RsaI*. Cada mistura de cDNA *tester* foi hibridizada com excesso de driver separadamente e as duas subtrações foram misturadas e hibridizada novamente com mais driver. A supressão das seqüências em comum foi feita por PCR, utilizando iniciadores específicos aos adaptadores. Os iniciadores específicos para o gene GAPDH (desenhado baseado na seqüência TC385 do TIGR) e Actina (GESTEIRA et al, 2003) desenhados para *T. cacao* foram utilizados nos ensaios-controle nas diversas etapas de construção das bibliotecas. Os produtos de amplificação foram ligados no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega, WI, USA), transformado em células eletrocompetentes de *E. coli* (DH10B) e plaqueadas em meio seletivo. As colônias brancas foram isoladas e individualizadas em microplacas (96 poços) contendo meio seletivo com 8% de glicerol e estocadas a -80°C.

2.2.1.6 Sequenciamento

Uma amostra de clones para cada placa foi avaliada para presença de inserto através da amplificação utilizando o iniciador universal M13. Os produtos de amplificação das colônias foram seqüenciados diretamente. De cada suspensão de bactéria em glicerol foi coletado 1 µl que foi diluído em 11 µl de água esterilizada e desnaturado a 95°C por 5 min. A reação de amplificação continha 11 µl da solução de plasmídeo; 50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 1,5 mM MgCl₂; 100 µM de cada dNTP; 0,2 µM de cada iniciador M13; e 1,5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen do Brasil; SP, Brasil) no volume final de 19 µl. Para sequenciamento, foi utilizado 1 µl do produto previamente amplificado com o iniciador T7 ou SP6. O sequenciamento foi realizado usando o protocolo padrão do kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences) e realizado no sequenciador ABI-3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA).

2.2.1.7 Análise das seqüências e anotação

Os cromatogramas do sequenciamento foram examinados para qualidade e presença de vetor com o programa Phred/Phrap/Crossmatch (EWING; GREEN 1998; EWING et al. 1998) e

agrupadas com CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). As seqüências obtidas foram comparadas, utilizando a ferramenta BLASTX, com o banco de dados de *Arabidopsis thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/>), e de seqüências não redundantes do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Complementarmente as seqüências foram confrontadas contra o banco de EST do NCBI e o banco de específico de EST de *T. cacao* do GeneIndex do TIGR (<http://www.tigr.org/>). As seqüências identificadas no GeneIndex do TIGR são geradas por consenso-tentativo (TC), e a identificação funcional do TC foi baseada a no resultado de BLAST das seqüências disponíveis. As seqüências também foram comparadas com o banco de dados do genoma de *C. pernicioso* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>) (gentilmente permitido pelo Prof. Dr. Gonçalo A.G. Pereira). Para todas as buscas foram considerados *no hit* seqüências com valores $E > 10^{-3}$. Para a categorização dos genes identificados, foi utilizado o código dos genes homólogos de *Arabidopsis* às seqüências obtidas, e a classificação ontológica foi realizada submetendo esses códigos ao banco de dados do *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR; www.arabidopsis.org). Para os genes sem homólogos identificados no genoma de *Arabidopsis*, a ontologia foi realizada por palavra chave no banco de dados (<http://www.geneontology.org>).

2.2.1.8 Validação da biblioteca por amplificação enzimática quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Foram desenhados iniciadores para algumas seqüências selecionadas (Apêndice A), primeiramente, baseadas na função provável ou função na resposta de defesa. O gene da actina de *T. cacao* foi escolhido como controle interno para análise da expressão quantitativa, com iniciadores desenhados baseados na seqüência TC46 de *T. cacao* do Gene Index do TIGR. Os iniciadores foram desenhados usando o programa Primer3 e foram avaliados com NetPrimer (<http://www.prgmiersbio.com/netprimer>) em termo de estabilidade e erro de pargamento.

A transcrição reversa foi realizada com RNA previamente tratado com DNase I e foram utilizadas as mesmas amostras do preparo de ambas as bibliotecas. A reação foi conduzida utilizando o Kit SuperScript First Strand Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen) com oligo-dT. As amplificações quantitativas em tempo real das amostras de cDNA (RT-qPCR) foram conduzidas para reações com volume de 10 µl contendo 1 µl da diluição de cDNA 1:10 (v/v); 0.5 µM para cada iniciador específico (Apêndice A) e 5 µl Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-

UDG 2X (Invitrogen). As amplificações foram realizadas no termociclador RotorGene 3000 thermocycler (Corbett Life Science, Australia) em triplicatas, com incubação inicial de 50°C por 2 min, 95°C por 2 min, e seguidas de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 30 s, com a detecção da fluorescência no final da extensão de cada ciclo. Com término da reação, a curva de dissociação da fita de DNA para cada produto amplificado foi determinada entre as temperaturas de 72°C e 95°C. Os experimentos incluíram o controle negativo (reação sem cDNA) e a eficiência de amplificação para cada iniciador foi determinada pela curva padrão da diluição serial de cDNA (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). A aquisição dos dados foi feita através do programa RotorGene Real-Time Analysis 6.0 (Corbett), que disponibilizava o valores de *cycle threshold* (C_T) e eficiência de PCR (E). A média dos C_T das triplicata foi usada para determinar as diferenças na expressão utilizando a referência interna (actina) baseada na equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A avaliação da expressão diferencial dos genes foi inicialmente conduzida para as amostras das plantas não inoculadas para cada genótipo ('ICS 39' e 'CAB 214') nos vários tempos amostrados (48, 72, 120, 240 h), e contrastando ambos os genótipos. A mudança na expressão dos genes em plantas inoculadas foi comparada entre amostras inoculadas e amostras não inoculadas para os mesmos genótipos e para cada período amostrado. Esta mesma análise foi feita para as amostras de outro material resistente ('CAB 208') usando como referência uma mistura de cDNA de amostras não inoculadas de todos os períodos amostrados. Já que o experimento não contém repetição biológica, diferenças significativas na expressão foram estimadas baseadas no valor 2,8 vezes proposto por Benitez et al. (2005), enquanto diferenças relativas entre 0,24 e 2,8 foram consideradas não significativas.

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Ensaio de inoculação

As cinco plantas inoculadas dos genótipos 'ICS 39', 'CAB 214' e 'CAB 208' foram avaliadas com 30 dias, confirmando a eficiência da inoculação. As plantas-controle 'Catongo' apresentaram 83% de incidência de doença, com a ocorrência de pelo menos um tipo de sintoma, atestando a eficiência das inoculações realizadas. Entre as 5 plantas do genótipo 'ICS 39'

inoculadas deixadas para avaliação após realização das coletas, 4 apresentaram algum sintoma, enquanto que para a 5 plantas de ‘CAB 214’ e ‘CAB 208’ uma planta para cada genótipo apresentou sintomas de inchamento, não considerada como reação de suscetibilidade. Então, as inoculações foram consideradas eficientes e os genótipos tiveram respostas típicas de suscetibilidade e resistência.

2.2.2.2 Detecção de *C. perniciosa* pela amplificação de transcritos de *RpL35* em plantas inoculadas

A detecção de transcritos do gene *RpL35* de *C. perniciosa* em tecidos infectados de *T. cacao* foi baseada da detecção pela temperatura típica de dissociação na curva de denaturação do produto de PCR específico. Tendo como controle positivo o produto de PCR obtido a partir do cDNA do fungo cultivado *in vitro*. O produto de PCR com temperatura idêntica ao do controle positivo foi apenas detectado na amostras inoculadas, mas nunca obtidos em amplificações com amostras não inoculadas (Figura 1A-C). A detecção de transcritos de *RpL35* de *C. perniciosa* nas amostras inoculadas de ‘ICS 39’ pela análise da curva de denaturação foi possível com 24, 48, 72, 120 e 240 h depois na inoculação (Figura 1A). Os fragmentos com tamanho esperado também foram detectados por eletroforese (Figura 1D). Para o genótipo resistente ‘CAB 214’, transcritos de *RpL35* foram detectados com 24 e 48 h pela curva de denaturação (Figura 1B), mas somente o de 24 h em gel de eletroforese (Figura 1E). Para a amostra de ‘CAB 208’, o produto de amplificação específico foi detectado mais tarde, nas amostras com 48, 72 e 240 h depois da inoculação, quando analisadas pela curva de denaturação (Figura 1C) ou por gel de eletroforese (Figura 1F).

Figura 1 - Curva de dissociação do produto de PCR do gene Rpl35 utilizada para detecção de *C. perniciosia* em plantas inoculadas dos genótipos 'ICS 39', 'CAB 214' e 'CAB 208' (A,B e C) e visualização em gel de agarose 1,5% do produto de PCR obtidos (D, E e F). Foram utilizadas como controle positivo da reação de PCR o cDNA do fungo cultivado in vitro (F) e como controle negativo uma amostra de planta não inoculada (NI) e reação sem cDNA (B). Foram avaliadas amostras coletadas com 24, 48, 72, 120 e 240 horas após inoculação para os genótipos 'ICS 39', 'CAB 214' e 'CAB 208'. Os controles negativos não apresentaram pico de fluorescência e enquanto a reação com cDNA de *Crinipellis perniciosia* apresentou um pico a 85,5°C. As amostras inoculadas e positivas para presença do patógeno apresentaram o mesmo pico registrado para o controle positivo. A presença do produto de PCR foi confirmada em gel de agarose 1,5% para as amostras positivas de 'ICS 39' (D) e 'CAB 208' (F). Com o 'CAB 214' apenas foi visualizado o produto de PCR para a amostra positiva com 48 h (E). P-padrão de peso molecular referência para fragmentos acima de 50 pb.

2.2.2.3 Bibliotecas subtrativas por supressão de *T.cacao* inoculado

Foram obtidas duas bibliotecas enriquecidas para sequências diferencialmente expressas para interação *T. cacao* e *C. perniciosa*. Uma biblioteca foi enriquecida com sequências do genótipo suscetível ‘ICS 39’, pois utilizou como *tester* cDNA sintetizados a partir de amostras do suscetível inoculado, sendo subtraídas as sequências em comum com o *driver*, derivado do material resistente ‘CAB 214’ inoculado. A segunda biblioteca foi enriquecida com genes ativados na interação do patógeno com o genótipo resistente ‘CAB 214’, invertendo a condição de *driver* e *tester* utilizadas na biblioteca anterior.

No total, foram obtidos 960 clones, sendo 430 para cada biblioteca. Ao acaso foram sequenciados 288 clones da biblioteca enriquecida de ‘ICS 39’ e 320 clones da biblioteca de ‘CAB 214’. O tamanho médio dos fragmentos sequenciados foi de 400 pb, variando de 200 a 900 bp. A análise de agrupamento das sequências foi realizada separadamente para cada biblioteca com os programas PHRED/PHRAP/CAP3 para identificar sequências repetidas e agrupá-las em *contigs* e identificar as sequências únicas (*singlets*). Das sequências dos 288 clones da biblioteca enriquecida de ‘ICS 39’, foram obtidos 32 agrupamentos (*contigs*), gerados a partir de 114 sequências, restando 174 sequências únicas (*singlets*), representando 206 *unigenes*. Com nível de redundância estimado em 28,5%. Para a biblioteca enriquecida de ‘CAB 214’, as 320 sequências formaram 29 *contigs* a partir de 103 sequências, restando 216 sequências únicas (*singlets*), perfazendo um total de 245 *unigenes*, com redundância de 23,2%. O baixo nível de redundância para ambas as bibliotecas indicam que futuros sequenciamentos poderão revelar novas sequências.

2.2.2.4 Anotação das sequências

A anotação dos 206 *unigenes* da biblioteca enriquecida de ‘ICS 39’ foi realizada pelo algoritmo BLASTX a partir das análises de homologia nos bancos de *A. thaliana* e sequências não redundantes do NCBI. Com o algoritmo BLASTN foram feitas as buscas nos bancos de EST do NCBI e de *T. cacao* no *Gene Index* do TIGR. Essa abordagem de classificação, utilizando esses 4 bancos, permitiu caracterizar 108 sequências como genes presumíveis, sendo as demais sequências identificadas como *no hit* ou sequências com valores $E > 10^{-3}$. Cruzando os dados

obtidos na busca entre os bancos de dados, foi possível identificar as funções presumíveis de 83 seqüências (Apêndice B), considerando também genes hipotéticos e proteínas desconhecidas, restando 25 seqüências anotadas como EST sem identificação. Entre as 108 seqüências anotadas, 30 puderam ser identificadas no banco de dados do TIGR, sendo 3 EST não identificadas. As 30 EST de *T. cacao* derivaram de duas bibliotecas depositadas, sendo 8 exclusivas da biblioteca de genes de defesa induzidos (VERICA et al., 2004); 15 da biblioteca de EST de folhas e sementes (JONES et al., 2002); e 7 partilhados entre essas duas bibliotecas.

Na biblioteca enriquecida de ‘CAB 214’, entre as 245 seqüências obtidas, 127 foram resgatadas com alguma similaridade dos bancos de dados. Dessas 127, foi possível identificar a função de 104 unigenes (Apêndice B), considerando também genes hipotéticos e proteínas desconhecidas, restando 23 seqüências anotadas como EST sem identificação. As 127 seqüências resgatadas dos bancos, foram também submetidas e comparadas com banco de EST de *T. cacao* do TIGR, e estas seqüências foram relacionadas com 51 EST, sendo 46 com funções conhecidas e 5 não apresentaram relação com algum gene identificado. As 51 EST de *T. cacao* estão distribuídas nos dois bancos de EST de *T. cacao*, sendo 15 exclusivas da biblioteca de genes de defesa induzidos (VERICA et al., 2004); 26 exclusivas na biblioteca de sementes e folhas (Jones et al., 2002) e 10 compartilhados entrem as duas bibliotecas.

Os 187 unigenes anotados (83 derivados de ‘ICS 39’ e 104 de ‘CAB 214’) foram categorizados baseados nos códigos dos genes homólogos derivados do *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR; www.arabidopsis.org). Os genes sem homologia foram categorizados por palavra-chave. As seqüências foram categorizadas nas seguintes classes funcionais (Figura 2): de “genes relacionados com estresses e induzidos por estímulos abióticos/bióticos”; “metabolismo energético e transporte de elétrons”; “metabolismo”; “processos biológicos desconhecidos”; “metabolismo de proteínas”; “desenvolvimento e organização celular e biogênese”; “transdução de sinal”; “metabolismo de DNA e RNA”; e “transporte celular” (Figura 2). Na categorização total, a classe “metabolismo” conteve 19,8% das seqüências (37 de 187), enquanto a classe “genes relacionados com estresses e induzidos por estímulos abióticos/bióticos” representou 18% (34 de 187). A classe “processos biológicos desconhecidos” (12,8%); “metabolismo energéticos e transporte de elétrons” (11,2%); “metabolismo de proteína” (14,4%); e “metabolismo de DNA e RNA” (10,2%) apresentaram representação uniforme. As categorias “desenvolvimento e organização celular e biogênese”

(5,3%); “transdução de sinal” (6.4%); e “transporte celular” (1.1%) foram as que tiveram menores representações nas seqüências amostradas (Figura 2A).

Essa mesma categorização foi realizada para cada biblioteca separadamente, e a distribuição funcional apresentou diferenças. A biblioteca enriquecida de ‘ICS 39’ apresentou uma maior quantidade de seqüências associadas às classes ligadas a “resposta à estresse e estímulos biótico ou abióticos” (25,3%; 21 de 83); “metabolismo energético” (13,3%; 11 de 83); e “processos desconhecidos” (16,9%; 14 de 83). Já a biblioteca proveniente de ‘CAB 214’, demonstrou maior representatividade de seqüências nas classes de “metabolismo” (21,2%; 22 de 104); “metabolismo de proteínas” (18,3%; 19 de 104); “metabolismo de DNA” (13,5%; 14 de 104); “transporte celular” (1,9%; 2 de 104); e “organização celular e biogênese” (7,7%; 8 de 104) (Figura 2B).

Figura 2 - Distribuição das prováveis classes funcionais de todas as seqüências de unigenes anotadas de planta de *T. cacao* suscetível e resistente inoculadas com *C. pernicioso* (A) e para seqüências de unigenes representando candidatos induzidos na resposta de defesa do material 'ICS 39,' suscetível (B), e 'CAB 214', resistente (C).

2.2.2.5 Validação da biblioteca por amplificação enzimática quantitativas de transcritos reversos (RT-qPCR)

Entre os genes identificados nas duas bibliotecas SSH de *T. cacao* infectadas com *C. pernicioso*, 23 foram escolhidos para validação das bibliotecas, sendo 13 de ‘ICS 39’ e 10 de ‘CAB 214’, para investigar a expressão diferencial dos genes entre suscetível e resistentes por RT-qPCR nos períodos com 24, 48, 72, 120, e 240 h depois da inoculação. Os transcritos foram escolhidos por representarem significativamente categorias de prováveis genes associados a resistência e/ou mecanismo de defesa. Três genes traduziam para proteínas ricas em leucina - LRP (LRP-ICS, LRP-CAB, LRP.2-ICS), associadas com receptores de membrana; um provável gene que traduz para WD-40 (WD.40-ICS), relacionado com transdução de sinal e controle de crescimento hormonal em plantas; fatores de transcrição, incluindo ‘Ethylene Responsive Factor-type’ - ERF (ERF-ICS); No Apical Meristem - NAM (NAM-ICS), e ‘Short Vegetative Phase’ - SVP (SVP-ICS); proteínas relacionadas com a patogênese e resposta a estresse do tipo heveine (Hev-ICS), taumatina (Thau-ICS); quitinase (Chit-ICS); cisteine proteinase (Cyst-ICS); peroxidases (Perox-ICS; Perox-CAB); Glucanase (Gluc-CAB); enzimas do metabolismo secundário, incluindo cafeína sintetase (Caff-CAB), antocianina redutase (AR-CAB) e leuco-antocianidina dioxigenase (LAD-ICS) que traduzem para as enzimas chave da biosíntese de taninos e antocianinas; e epoxi-hidrolase (EH-CAB), enzima associada a síntese de cutina. Os outros genes selecionados tinham a indução previamente relatada na resposta a interação planta-microorganismo, incluindo EIG.7 (EIG.7-CAB; TAKEMOTO; DOKE; KAWAKITA, 2001); Citocromo oxidase P450 (C.P450-ICS); celulase (Cell-CAB); proteína USP (USP-CAB; HOHNJEK et al., 2000) e o gene ATS3 (ATS3-ICS, LEE et al., 2006).

Os iniciadores foram desenhados com as sequências obtidas a partir das bibliotecas de SSH (Apêndice A). Os transcritos do gene da actina foram utilizados como gene de referência para análises quantitativa da expressão. A eficiência de amplificação para todos os pares de iniciadores estavam próximo de 2 e o coeficiente de correlação próximo de 0,99 para a análise da curva de diluição (não mostrado). Como as eficiências entre os iniciadores eram muito similares, o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi utilizado para determinar a diferença na expressão relativa entre as condições avaliadas (inoculada e não inoculada) nos genótipos.

Inicialmente, o nível de expressão gênica foi estimado para as amostras não inoculadas de ambos os genótipos e em todos os períodos (de 24 a 240 h) a partir de uma referência média. No geral, a presença relativa de transcritos nas amostras não inoculadas do genótipo suscetível e resistente foi constante para todos os cinco períodos amostrados (dados não mostrados), exceto 24 h. Com 24 h apareceu um pico de indução para alguns genes provavelmente induzidos pelo estímulo mecânico causado durante a inoculação. Para determinar diferenças na expressão constitutiva entre genótipos, foi usado como limite de corte o valor arbitrário de 2,8 (BENITEZ et al. 2005) (Figura 3A).

Nas amostras não inoculadas do genótipo 'ICS 39', somente o genes Hev-ICS e Caff-ICS com 24 h apresentaram expressão acima da média. Para o 'CAB 214' nas amostras não inoculadas, existiu uma tendência geral para expressão diferencial com 24 h, com os maiores níveis para Thau-ICS, Hev-ICS, NAM-ICS, LRP-ICS, C.P450-ICS, LRP.2-CAB e Perox-ICS (Fig. 3A); (Figure 3A). Usando os níveis de expressão do genótipo suscetível 'ICS 39' como referência, foi possível estimar o nível de expressão diferencial entre os genótipos utilizando o valor 2,8 como referência. O nível de expressão diferencial do 'CAB 214' em relação ao 'ICS 39' apenas foi observado com 24 h e para 5 dos 6 genes induzidos nas amostras não inoculados, exceto o Hev-CAB (Figura 3B). O único gene que apresentou expressão diferencial em todos os momentos, caracterizando uma expressão basal diferencial entre genótipos foi o gene Hev-ICS e foi para o genótipo suscetível.

Figura 3 - Análise da expressão de 23 genes em meristemas de *T. cacao* não inoculados dos genótipos ‘ICS 39’ e ‘CAB 214’ nas coletas com 24 h (A) e expressão diferencial do ‘CAB 214’ em relação ao ‘ICS 39’, calculados pela razão da expressão do ‘CAB 214’ sobre o ‘ICS 39’. O eixo y representa o número de vezes da expressão relativa em relação a média da expressão dos cinco tempos (A) e em relação ao “ICS 39” (B). Os valores foram calculados a partir de Ct médio de três reações.

Subsequentemente o acúmulo de transcritos em amostras inoculadas para cada genótipo ('ICS 39', 'CAB 214' e 'CAB 208') foi avaliada usando como referência as plantas não inoculadas de cada período. (Tabela 1). Para o 'ICS 39', de 23 genes analisados 16 foram induzidos no geral em dois momentos: um pico precoce com 48 e/ou 72 h, e um pico tardio com 120 e/ou 240 h depois da inoculação (Tabela 1). Dez transcritos apresentaram picos de acúmulo em ambos os momentos (LRP-ICS, LRP-CAB, LRP.2-CAB, WD.40-ICS, ERF-ICS, Hev-ICS, Thau-ICS, Cyst-ICS, EH-CAB, Cell-CAB), enquanto 4 genes tiveram somente uma indução tardia com 120 e/ou 240 h (NAN-ICS, Caff-CAB, EIG7-CAB e C.P450-ICS). Somente dois transcritos (AR-CAB; LAD-ICS) apresentaram um acúmulo precoce no 'ICS 39' com 48 e/ou 72 h (Tabela 1). Sete genes não foram induzidos no genótipo suscetível após a inoculação (SVP-ICS, Chi-ICS, Perox-ICS, Perox-CAB, Gluc-CAB, ATS3-ICS, USP-CAB).

No entanto para o genótipo resistente 'CAB 214' dos 23 transcritos avaliados por RT-qPCR 21 foram induzidos, com exceção dos genes Chi-ICS e Gluc-CAB (Tabela 1). Dos 21 transcritos relativamente induzidos, 14 apresentaram um acúmulo precoce (48 a 72 h após inoculação) junto com um tardio (120 a 240 h). Enquanto sete transcritos (SVP-ICS, Perox-ICS; Perox-CAB, Caff-CAB, AR-CAB, LAD-ICS, C.P450-ICS, EIG7-CAB) apresentaram somente um acúmulo precoce. No geral, a mais importante indução aconteceu principalmente com 48 h.

Para validar o padrão de expressão observado nos dois genótipos inoculados com *C. pernicioso*, amostras de outro genótipo resistente ('CAB 208') foram analisadas (Tabela 1). Dos mesmos 23 transcritos analisados, 21 apresentaram acúmulo nas amostras inoculadas e somente dois genes (AR-CAB; C.P450-ICS) não mostrou acréscimo no acúmulo de transcritos. O padrão de expressão similar a do 'CAB 214' foi observado para o 'CAB 208', com um acúmulo precoce (48 a 72 h após a inoculação) e um pico de acúmulo tardio (120 a 240 h). Dos 21 transcritos com aumento da expressão, 11 (LRP-ICS, LRP-CAB, NAN-ICS, SVP-ICS, Cyst-ICS, Gluc-CAB, EH-CAB, EIG7-CAB, Cell-CAB, ATS3-ICS e USP-CAB) exibiram em ambos os períodos, 8 apresentaram somente um acúmulo precoce (LRP.2-CAB; WD.40-ICS; ERF-ICS; Hev-ICS; Thau-ICS; Chi-ICS; Perox-ICS; Perox-CAB) e dois tiveram somente o acúmulo tardio (Caff-CAB; LAD-ICS). O período de maior acúmulo de transcritos aconteceu com 72 h após inoculação. O padrão de expressão do 'CAB 214' pareceu ser diferente do 'CAB 208'.

Tabela 1 - Indução relativa dos genes $[2^{-\Delta(\Delta Ct)}]$ nas amostras inoculadas de 'ICS 39', 'CAB 214' e 'CAB 208' em relação as amostras não inoculadas. Valores da expressão determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real em quatro pontos após a inoculação, para genes identificados na biblioteca do suscetível (-ICS) e resistente (-CAB).

(Continua)					
Genes	Genótipo	48 h	72 h	120 h	240 h
LRP-ICS	ICS 39	2,80	4,46	5,18	1,16
	CAB 214	14,23	0,94	9,45	8,93
	CAB 208	7,00	89,84	1,26	3,64
LRP-CAB	ICS 39	4,07	0,27	1,79	12,77
	CAB 214	58,68	5,35	0,76	6,81
	CAB 208	10,70	24,76	2,39	3,89
LRP.2-CAB	ICS 39	4,27	2,64	3,64	8,63
	CAB 214	4,61	0,87	7,24	6,18
	CAB 208	8,17	36,5	0,69	1,94
WD.40-ICS	ICS 39	3,7	2,58	2,35	5,8
	CAB 214	13,72	3,97	4,48	2,32
	CAB 208	0,59	14,83	0,23	0,52
ERF-ICS	ICS 39	1,02	3,69	3,73	0,62
	CAB 214	7,66	1,81	3,09	1,33
	CAB 208	0,72	7,84	0,68	1,44
NAN-ICS	ICS 39	2,85	1,26	2,47	3,52
	CAB 214	6,31	0,54	14,49	6,81
	CAB 208	7,78	66,88	0,57	3,48
SVP-ICS	ICS 39	1,79	0,77	1,36	0,7
	CAB 214	4,37	2,27	2,02	1,42
	CAB 208	3,01	21,89	2,58	3,83
Hev-ICS	ICS 39	54,79	155,0	52,18	288,0
	CAB 214	13,15	1,55	5,72	20,56
	CAB 208	1,47	37,72	0,78	2,71

Tabela 1. Indução relativa dos genes [$2^{-\Delta(\Delta Ct)}$] nas amostras inoculadas de ‘ICS 39’, ‘CAB 214’ e ‘CAB 208’ em relação as amostras não inoculadas. Valores da expressão determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real em quatro pontos após a inoculação, para genes identificados na biblioteca do suscetível (-ICS) e resistente (-CAB).

Genes	Genótipo	(continuação)			
		48 h	72 h	120 h	240 h
Thau-ICS	ICS 39	2,95	32,54	7,72	3,71
	CAB 214	130,39	0,28	35,67	8,32
	CAB 208	3,71	51,27	0,23	2,22
Chi-ICSst	ICS 39	0,67	1,99	2,63	2,40
	CAB 214	0,44	0,39	1,97	0,73
	CAB 208	1,04	9,27	0,30	2,33
Cyst-ICS	ICS 39	3,24	1,53	7,03	4,43
	CAB 214	18,08	2,28	12,47	2,36
	CAB 208	3,61	17,88	0,53	10,27
Perox-ICS	ICS 39	2,80	1,06	2,76	1,00
	CAB 214	7,77	1,79	0,69	2,77
	CAB 208	3,61	10,52	0,46	2,21
Perox-CAB	ICS 39	1,29	1,56	2,82	2,14
	CAB 214	30,06	3,97	9,45	7,71
	CAB 208	1,79	25,78	0,53	2,04
Gluc-CAB	ICS 39	1,10	0,55	0,97	1,80
	CAB 214	2,60	1,52	2,24	2,07
	CAB 208	1,58	9,06	1,80	2,97
Caff-CAB	ICS 39	1,29	0,25	0,14	10,48
	CAB 214	38,67	5,22	0,22	0,94
	CAB 208	0,57	1,39	1,42	3,35
AR-CAB	ICS 39	3,70	0,35	1,90	2,49
	CAB 214	15,47	2,00	1,86	2,12
	CAB 208	1,93	0,07	0,51	0,05

Tabela 1. Indução relativa dos genes [$2^{-\Delta(\Delta Ct)}$] nas amostras inoculadas de ‘ICS 39’, ‘CAB 214’ e ‘CAB 208’ em relação as amostras não inoculadas, Valores da expressão determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real em quatro pontos após a inoculação, para genes identificados na biblioteca do suscetível (-ICS) e resistente (-CAB).

Genes	Genótipo	(Conclusão)			
		48 h	72 h	120 h	240 h
LAD-ICS	ICS 39	10,58	0,07	0,96	1,12
	CAB 214	6,26	4,80	0,22	2,76
	CAB 208	2,15	2,69	1,12	3,55
EH-CAB	ICS 39	4,81	0,8	2,70	8,44
	CAB 214	7,71	3,38	2,70	4,15
	CAB 208	7,16	13,74	3,36	3,73
EIG7-CAB	ICS 39	2,43	0,81	1,32	4,33
	CAB 214	6,09	1,21	2,87	1,82
	CAB 208	4,11	96,07	1,16	3,60
C,P450-ICS	ICS 39	1,58	0,21	0,17	4,57
	CAB 214	30,70	3,71	0,34	1,10
	CAB 208	1,03	0,45	1,07	1,16
Cell-CAB	ICS 39	3,04	0,56	3,42	11,55
	CAB 214	11,45	2,19	13,33	10,24
	CAB 208	7,63	68,84	1,30	4,35
ATS3-ICS	ICS 39	2,06	0,28	1,85	2,09
	CAB 214	17,59	1,58	6,76	2,2
	CAB 208	11,47	147,89	5,08	6,09
USP-CAB	ICS 39	2,15	0,48	2,68	1,36
	CAB 214	20,97	2,10	6,29	5,68
	CAB 208	6,07	11,63	1,07	4,36

2.2.3 Discussão

A análise em larga escala da expressão gênica durante a interação patógeno-hospedeiro permite uma visão aprofundada dos eventos moleculares fundamentais no estabelecimento da doença (BIRCH; KAMOUN, 2000; KAZAN et al., 2001). Em *T. cacao*, os mecanismos de resistência à Vassoura-de-Bruca são totalmente desconhecidos, sendo a avaliação da resistência baseada na incidência e manifestação dos sintomas (SILVA; LUZ; MATSUOKA., 1998). No estudo da interação planta-microrganismo, a construção de bibliotecas SSH tem se mostrado eficiente na obtenção de seqüências diretamente relacionadas com a resposta da planta ao organismo com o qual interage (FERNANDEZ et al., 2004; GUILLEROUX; OSBOURN, 2004; LU et al., 2004; ZUO et al., 2005). Como há relatos de alterações morfológicas e bioquímicas na fase inicial da interação, optou-se pela construção das bibliotecas com plantas de *T. cacao* inoculadas com *C. perniciosa* no período assintomático (FRIAS; PURDY; SCHMIDT, 1991; PENMAN et al., 2000; SILVA; MATSUOKA, 1999).

A anotação e categorização da seqüência de 'ICS 39' e 'CAB 214' identificadas nas bibliotecas SSH evidenciaram homólogos de genes previamente relacionados em outros estudos com reposta a patógeno ou elicitores (FERNANDEZ et al. 2004; GUILLEROUX; OSBOURN, 2004; LU et al., 2004; VERICA et al. 2004). Das seqüências anotadas de ambas as bibliotecas, 28% (23 em 81) foram comuns as de genes de defesa identificadas em uma biblioteca ,com 1280 unigenes, obtida a partir de tecidos induzidos por elicitores, como NEP (VERICA et al., 2004), enquanto 50% (41 de 81) relacionaram com a biblioteca derivada de tecidos normais com 1380 unigenes (sementes e frutos em desenvolvimento; JONES et al., 2002). Estes dados sugerem que outros genes são necessários para responder ao desafio imposto pela inoculação de *C. perniciosa*, além daqueles induzidos por elicitores. Demonstrando a necessidade de desenvolver bibliotecas específicas para interação patógeno hospedeiro. Em sistemas similares, a sobreposição de genes induzidos por elicitores e patógenos foi por volta de 20% dos genes analisados (SCHENK et al., 2000). A categoria com maior número de seqüências anotadas foi de metabolismo de proteínas que provavelmente esta associada com uma maior síntese e reciclagem de proteínas resultante da atividade gênica adicional e a do metabolismo secundário reflexo da produção de fitoalexinas.

A ausência de seqüências de fungo explica-se pela baixa representatividade no transcriptoma da interação planta-patógeno. A proporção relativa de seqüências relacionadas

com o patógeno foi estimada em 2% da população total de EST (86 em 4300) (KRUGER et al., 2002) e o pequeno número de clones seqüenciados restringiu as chances de obter genes do patógeno. Além disso, somente pequenas quantidades de micélio de *C. pernicioso* foram detectadas colonizando tecidos infectados (PENMAN et al., 2000).

O diagnóstico molecular de amostras inoculadas, baseado no RT-PCR com o gene *RpL35* da proteína ribossomal de *C. pernicioso*, foi capaz de detectar o patógeno na planta do genótipo suscetível amostradas em todos os tempos (Figura 1), corroborando com os dados de avaliação de sintomas. A detecção de transcritos de *C. pernicioso* nos genótipos resistente ‘CAB 214’ e ‘CAB 208’ confirmam o sucesso na inoculação, mas também corrobora com a resposta de resistência destes genótipos, restringindo aparentemente a presença do micélio detectável. O padrão de detecção no ‘CAB 214’ difere do ‘CAB 208’, possivelmente devido a restrição da colonização que acontece mais cedo (menos que 48 h) no ‘CAB 214’ contrastando com detecção mais avançada para o ‘CAB 208’ (Figura 1). Em materiais resistentes a retenção da colonização em tecidos infectados tem sido relatada baseada na detecção de micélio por microscopia (FONSECA, 1990; SILVA; MATSUOKA, 1999; WHEELER 1985). Desta forma, os genótipos resistentes aqui analisados diferem no que se refere na colonização de tecidos, apesar de fato ambos apresentarem fenótipos similares. Porém, como a detecção de *C. pernicioso* por RT-PCR foi realizada com mistura de RNA derivadas de duas plantas, novos experimentos devem ser conduzidos para confirmar o uso do *RpL35* como um método de detecção do patógeno e determinação indireta da colonização.

Nas avaliações em plantas não inoculadas de cada genótipo os genes foram estáveis. Indicando serem apenas induzidos na condição de desafio com o patógeno. Os poucos genes que foram induzidos nas amostras não inoculadas do ‘CAB 214’ com 24 h é devido o efeito das condições de inoculação. Indicando que estes genes no ‘CAB 214’ são mais sensíveis aos estímulos abióticos. Neste grupo de genes estão proteínas receptora de membrana, fator de transcrição, proteínas relacionadas com a patogênese e metabolismo secundário. Na comparação da expressão gênica das amostras não inoculadas entre os genótipos ‘ICS 39’ e ‘CAB 214’ não foi observada uma expressão gênica basal superior de um genótipo em relação a outro. Esta expressão diferencial caracterizaria uma assinatura gênica que associada a resistência (KAZAN et al., 2001) poderia servir como ferramenta para o melhoramento genético (HOLTER et al., 2000). A única exceção foi a maior expressão do provável gene da Heveína no ‘ICS 39’ (Hev-ICS; Fig.

3), homólogo ao da Heveína de *Triticum monococcum* (AAT67050.1), que traduz para um peptídeo que se liga a quitina da parede de fungos (BERTINI et al., 2006), mas com associação negativa com a resistência a *C. pernicioso*.

Os 23 genes foram induzidos nos materiais avaliados demonstrando diferenças na dinâmica da indução. Os materiais resistentes ‘CAB 214’ e ‘CAB 208’ tiveram a maior indução com 24 e 48 horas enquanto o suscetível com 120 e 240 horas após a inoculação. Em outros patossistemas, materiais suscetíveis e resistentes diferem quantitativamente na expressão mas não qualitativamente (BENITEZ et al., 2005; TAO et al., 2003), enquanto o suscetível apresenta uma indução tardia. Nas avaliações deste trabalho foram observadas diferenças qualitativas entre genótipos já que dos 23 genes avaliados 16 foram induzidos no suscetível e 21 nos resistentes. Um segundo momento de indução também foi observado na reposta de defesa. A segunda indução do resistente supera e/ou iguala a maior indução do suscetível, que foi tardia. Na interação *Ustilago maydis* e *Zea mays* nas plantas infectadas foi identificado dois momentos de expressão gênica. O primeiro acontece durante a colonização do fungo e outro anterior à manifestação dos sintomas (BASSE, 2005). As amostras coletadas com 240 h estão mais próximas dos 15 dias, quando surgem os primeiros sintomas, indicando que uma provável alteração da fisiologia dos fungos possa estar induzindo novamente a resposta de defesa da planta.

Uma forma de seleção de materiais resistentes seria a constatação da reposta precoce. O gene Tau-ICS, homólogo ao gene da Taumatina de *Vitis riparia* (AAD55090.1) que é rapidamente acumulada em altos níveis em resposta a estresse bióticos e abióticos (MENU-BOUAOUICHE et al., 2003), seria um bom candidato para determinação da reposta da planta à presença do patógeno por ter um maior acúmulo de transcritos. Enquanto os genes LRP-CAB e LRP-ICS determinariam a reposta precoce do ‘CAB 214’ e ‘CAB 208’, respectivamente.

A busca de genes de resistência candidatos inicia com a identificação de genes anotados em biblioteca SSH seguida pela validação da indução, comparando expressão entre genótipos resistentes e suscetíveis. Entre os genes com expressão induzidos no genótipo resistente mas não no suscetível estão o fator SVP (Short Vegetative Phase), duas peroxidases (Perox-ICS e Perox-CAB) e dois genes com funções desconhecidas (ATS-ICS e USP-CAB). O ICS-SVP (Short Vegetative Phase) tem homologia com o fator de transcrição MAD-Box de *Populus tomentosa* (AAR92206.1) que são exclusivos de planta e regulam a formação de flores, controlam o

florescimento e o crescimento vegetativo (NG; YANOFSKY, 2001). As peroxidases identificadas pertencem a classe III, sendo o gene ICS-Perox homólogo a peroxidase de *Quercus suber* (AAR31106.1) e o CAB-Perox homólogo a de *Vigna angularis* (BAA01950). A atividade das peroxidases constitui um dos primeiros eventos na interação planta patógeno (CHITTOOR; LEACH; WHITE, 1997) reforçando a parede celular e protegendo contra as formas ativas de oxigênio (KAWAOKA et al., 2003; QUIROGA et al., 2000) e mais de uma peroxidase foi identificada na resposta de defesa contra patógenos (CHITTOOR et al., 1997; SASAKI et al., 2004). O genes ICS-ATS3 homólogo ao de *Medicago truncatula* (ABE79354.1) não apresentam função conhecida mas estão associadas ao desenvolvimento da semente. Este gene apresenta o domínio funcional tipo PLAT e um gene com mesma característica foi também induzido na resposta de defesa além de estímulo abióticos (LEE et al., 2006). O gene CAB-USP tem homologia com uma proteína desconhecida com domínio USP (*Universal Protein Stress*) e sua indução em planta apenas foi relatada em condições que envolvem indução por etileno (SAUTER et al., 2002; ZEGZOUTI et al., 1999;), e nos estágios finais de nodulação em *Vigna faba* (HOHNJEC et al., 2000). As USP são proteínas inicialmente identificadas no citoplasma de bactéria e posteriormente em plantas, sendo induzida em condições de estresse (KERK et al., 2003).

A indução diferencial dos genes AR-CAB e C.P450-ICS diferenciam o ‘CAB 214’ do ‘CAB 208’ em contrapartida a indução dos genes Quit-ICS e Gluc-CAB diferenciam o ‘CAB 208’ do ‘CAB 214’ e ‘ICS 39’ (Tabela 1). O CAB-AR é homólogo a Leucoantocianina redutase de *Gossypium arboreum* (CAD91910.1), e esta enzima tem como função catalisar a síntese de taninos condensados ou pro-antocianidina (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Taninos condensados de *T. cacao* inibe a germinação e dificulta a formação do tubo germinativo de esporos de *C. pernicioso* (ANDEBRHAM et al., 1995; BROWNLEE; HEDGER; SCOTT, 1992). Análises bioquímicas confirmam o aumento da síntese deste composto em planta suscetíveis com 3 dias após inoculação (SCARPARI et al., 2005). A indução dos genes AR-CAB no período inicial reforça a possível importância deste composto na contenção inicial da colonização do fungo. O C.P450-ICS é homólogo ao da *A. thaliana* (AAM61354.1) que pertence a família citocromo monoxigenases P450. Genes desta família codificam para enzimas envolvidas na síntese de metabólitos secundários, hormônios de crescimento (giberelinas, ácidos jasmônicos e brassisteroides) e participam da dextoxificação (BOWEL et al., 1994; CHAPPLE, 1998).

O gene ICS-Quit tem homologia com a quitinases de *Gossypium hirsutum* (AAQ56599), uma glucanase que engloba as quitinase da classe I, III e IV. O gene ICS-Gluc é homólogo a o gene de *A. thaliana* (At1g18650.1) que codifica para uma glicosil hidrolase similar a beta-1,3-glucanase de *Camellia sinensis* (GI:15150341). A quitinase e glucanase têm como função degradar constituintes da parede dos fungos restringindo a colonização durante a patogênese (COLLINGE et al., 1993; KAUFFMANN et al., 1987). Avaliando a indução diferencial de genes pode se verificar uma tendência do ‘CAB 214’ em inibir a colonização por compostos antimicrobianos enquanto o ‘CAB 208’ pela indução de enzimas líticas que degradam a parede do fungo. Neste trabalho na avaliação de dois genótipos resistentes verificou-se que existe uma diferença qualitativa na expressão dos genes entre genótipo suscetível e resistente e entre os genótipos ‘CAB 214’ e ‘CAB 208’ sendo contrária as conclusões de Tao et al., (2003) e verificado por Benitez et al. (2005).

Os materiais resistentes apresentaram dinâmica diferenciada e a indução dos genes ligados a classe de transdução de sinal e fatores de transcrição não indicou diferenças entre os materiais. Para identificar fatores de transcrição associados a estas fontes de resistência a Vassoura-de-Bruxa seria necessário caracterizar o promotor dos genes induzidos. Um bom candidato seria o gene Caff-CAB este genes foi induzido precocemente no ‘CAB 214’ e tardiamente para os demais. A cafeína é aumentada na interação *T. cacao* e *C. perniciosa* (ANEJA; GIANFAGNA, 2001; SCARPARI et al., 2005) e apresenta ação antimicrobiana *in vitro* contra o fungo (ANEJA; GIANFAGNA, 2001). Em *Coffea arabica* não existe uma relação positiva entre produção de cafeína e resistência (GUERREIRO FILHO; MAZZAFERA, 2000, 2003) e em *T. cacao* esta associação não pode ser demonstrada pois foi apenas avaliada em plantas sintomáticas (ANEJA; GIANFAGNA, 2001, SCARPARI et al., 2005). O aumento da produção de cafeína pode ser o resultado da intensa atividade transcripcional ocasionada pela resposta ao estresse biótico ou abiótico (GUERREIRO FILHO; MAZZAFERA, 2000). A indução deste gene não esta associada a maior atividade transcripcional do ‘CAB 208’, pois foi induzido com 240 h. A indução de cafeína sintetase a apenas por um indutor como BTH (Benzothiadiazole) ou metil jasmonato, indica a existência de diferentes formas desta enzima em *T. cacao* (ANEJA; GIANFAGNA, 2001, BAILEY et al., 2005). Como o Caff-CAB apresentar um domínio metiltransferase, este estaria atuando na via metabólica de outros compostos entre eles metil salicilato ou metil jasmonato (ROSS et al., 1999; SEO et al., 2001) que entre outras

funções participam na resposta de defesa da planta.

A cinética e a indução diferencial qualitativamente e quantitativamente entre os genótipos corroboram com diferenças de sintomas da doença e níveis de resistência (ALBUQUERQUE; FIGUEIRA, 2004). Além disso, as análises de *locus* para características quantitativas (QTL) através de cruzamentos e mapeamentos sugerem diferentes loci entre os genótipos corroborando com os dados de padrão de expressão (ALBUQUERQUE, 2006).

2.3 Conclusões

A estratégia SSH demonstrou ser oportuna para obtenção de genes induzidos na resposta de defesa de *T. cacao* contra *C. pernicioso*. A avaliação da indução dos genes demonstra que resposta de defesa entre suscetível e resistente caracteriza por diferenças qualitativas além da dinâmica e intensidade da indução e que a resposta de resistência varia entre genótipos resistentes. Os genes estudados podem ser utilizados como candidatos a genes de resistência por que a expressão diferencial foi validada diferenciando os genótipos avaliados. A determinação de polimorfismo poderá gerar marcas a serem associadas a QTLs já mapeados. A caracterização de regiões promotoras possibilitará a identificação de fatores de transcrição envolvidos com o nível de regulação diferencial e momento de expressão entre genótipos.

Referências

ALBUQUERQUE, P.S.B. **Mapas de ligação e controladores de características quantitativas (QTL) associadas à resistência a *Crinipellis pernicioso* em acessos de cacaueiro (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia brasileira**. 2006. 133p. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

ALBUQUERQUE, P.S.B.; BASTOS, C.N.; LUZ, E.D.M.N.; SILVA, S.D.V.M. Doenças do cacaueiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZEMBE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. 4 ed. Piracicaba: Ceres 2005. v. 2, cap. 18, p 151-164.

ALBUQUERQUE, P.S.B.; FIGUEIRA, A. Genetic mapping and identification of genomic regions associated with witches' broom resistance, derived from alternative sources from the brazilian amazon (CAB genotypes). **INGENIC Newsletter**, St. Augustine, v. 9, p. 39-42, 2004.

ALMEIDA, A.F; AGUILAR, M.A.G.; ARAÚJO, I.S. Anatomical modifications in two genotypes infected by *Crinipellis pernicioso*. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 10, n. 3, p. 199-202, 1998.

ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L.C. DE; NAKAIAMA, L.H.I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicioso* (STAHEL) Singer: a experiência da amazônia brasileira. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 10, n. 2, p. 49-60, maio 1998.

ANDEBRHAM, T.; HAMMERSTONE JR, J.F.; ROMANCZKY JR, L.J.; FURTEK, D.B. Sensitivity of *Crinipellis pernicioso* to procyanidins from *Theobroma cacao* L. **Physiological Molecular Plant pathology**, London, v. 46, n. 5, p. 339-348, May 1995.

ANEJA, M.; GIANFAGNA, T. Induction and accumulation of caffeine in young, actively growing leaves of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by wounding or infection with *Crinipellis pernicioso*. **Physiological Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, v.1, p. 13–16, July 2001.

BARTLEY, B.G.D. **Cacao, *Theobroma cacao***. Rome: FAO, 1986. p 25-42. (FAO Plant Production and Protection Paper n. 70)

BASSE, C.W. Dissecting defense-related and developmental transcriptional responses of maize during ustilago maydis infection and subsequent tumor formation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 138, n. 3, p. 1774–1784, July 2005.

BENITEZ, Y.; BOTELLA, M.A.; TRAPERO, A.; ALSALIMIYA, M.; CABALLERO, J.L.; DORADO, G.; BLANCO, J.M. Molecular analysis of the interaction between *Olea europaea* and the biotrophic fungus *Spilocaea oleagina*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 6, n.6, p. 425–438, July 2005.

BERTINI, L.; CASCONI, A.; TUCCI, M.; D'AMORE, R.; Di BERARDINO, I.; BUONOCORE, V.; CAPORALE, C.; CARUSO, C. Molecular and functional analysis of new members of the wheat PR4 gene family. **Biological. Chemistry**, Walter De Gruyter, v. 387, n. 8, p. 1101-1111, Aug.. 2006.

BIRCH, P.R.J.; KAMOUN, S. Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. In: WOOD, R (Ed). **New technologies for life sciences**: a trends guide. New York: Elsevier Science, 2000. p. 77–82.

BOWERS, J.H.; BAILEY, B.A.; HEBBAR, P.K.; SANOGO, S.; LUMSDEN, R.D. The impact of plant diseases on world chocolate production. Disponivel em: < Plant Health Prog, 10.1094/PHP-2001-0709-01-RV (<http://www.apsnet.org/online/feature/cacao/> online)> Acesso em: 14 nov. 2001

BROWN, J.S.; SCHNELL, R.J.; MOTAMAYOR, J.C.; LOPES, U.; KUHN, D.N.; BORRONE, J.W. Resistance gene mapping for witches`broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F₂ population using SSR markers and candidate genes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, St. Joseph, v. 130, n. 3, p. 366-373, May 2005.

BROWNLEE, H.E.; HEDGER, J.N.; SCOTT, I.M. Effect of a range of procyanidins on the cocoa pathogens *Crinipellis perniciosus*. **Physiological Molecular Plant Pathology**, London, v. 40, n. 4 , p. 227-232, April 1992.

CHAPPLE, C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome p450-dependent monooxygenases. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 311–343, 1998.

CHITTOOR, J.M.; LEACH, J.E.; WHITE, F.F. Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 10, n.7, p. 861-871, 1997.

COLLINGE, D.B.; KRAGH, K.M.; MIKKELSEN, J.D.; NIELSEN, K.K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases. **Plant Journal**, Oxford. v. 3, n. 1, p. 31–40, Jan. 1993.

DELGADO, J.C.; COOK, A.A. Nuclear condition of the basidia basidiospore and mycelial of *Marasmius perniciosus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 66-72, 1976.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.F.C.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, L.; LUKYANOV, L.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBER, P. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 12, p. 6025-6030, June 1996.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Sprig Harbor, v. 8, n.3, p. 186–194, Mar. 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P.. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Sprig Harbor v. 8, n.3 , p. 175–185, Mar. 1998.

FALEIRO, F.G.; QUEIROZ, V.T.; LOPES, U.V.; GUIMARÃES, C.T.; PIRES, J.L.; YAMADA, M.M.; ARAÚJO, I.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA FILHO, G.A.; BROWN, J.S.; SCHNELL, R.; FERREIRA, C.F.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Mapeamento genético molecular do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) e QTLs associados à resistência à vassoura-de-bruxa. **Euphytica**, Wageningen, v. 149, n. 2, p. 227-235, Sept. 2006.

FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C.; BOM, M.C.; PETITOT, A.S.; SILVA, M.C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; RIBEIRO, A.; ARGOUT, X.; NICOLE, M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 6, p. 527–536, Nov. 2004.

FOSNECA, S.E.A. Avaliação de resistência a *Crinipellis pernicioso* em novos clones de *Theobroma cacao*. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 2, n. 3, p. 137-143, 1990.

FRIAS, G.A.; PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A. Infection biology of *Crinipellis pernicioso* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 6, p. 552-556, 1991.

GESTEIRA, A.S.; MICHELI, F.; FERREIRA, C.F.; CASCARDO, J.M.C. Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicioso*. **Biotechniques**, Natick, v. 35, n. 3, p. 494-496, Sept. 2003.

GUERREIRO FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, n. 6, p. 1447-1464, June 2000.

GUERREIRO FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Caffeine and resistance of coffee to the berry borer *Hypothenemus hampei* (coleoptera: scolytidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 24, p. 6987-6991, Nov. 2003.

GUILLEROUX, M.; OSBOURN, A. Gene expression during infection of wheat roots by the ‘take-all’ fungus *Gaeumannomyces graminis*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 3, p. 203-216, May 2004.

HOHNJEC, N.; KÜSTER, H.; ALBUS, U.; FROSCH, S.C.; BECKER, J.D.; PÜHLER, A.; PERLICK, A.M.; FRÜHLING, M. The broad bean nodulin VfENOD18 is a member of a novel family of plant proteins with homologies to the bacterial MJ0577 superfamily. **Molecular and Genetal Genetics**, Berlin, v. 264, n. 3, p. 241-250, Oct. 2000.

HOLTER, N.S.; MITRA, M.; MARITAN, M.; CIEPLAK, M.; BNAVAR J.R.; FEDOROFF, N.V. Fundamental patterns underlying gene expression profiles: Simplicity from complexity. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 97, n. 15, p. 8409–8414, July 2000.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program **Genome Research**, Cold Spring Habor, v. 9, n. 9, p. 868-877, Sept. 1999.

JONES, P.G.; ALLAWAY, D.; GILMOUR, D.M.; HARRIS, C.; RANKIN, D.; RETZEL, E.R.; JONES, C.A. Gene discovery and microarray analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) varieties, **Planta**, Berlin, v. 216, n. 2, p. 255-264, Dec. 2002.

KAUFFMANN, S.; LEGRAND, M.; GEOFFROY, P.; FRITIG, B. Biological function of pathogenesis-related proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3-b-glucanase activity. **EMBO Journal**, Eynsham/Oxford, v. 6, n. 11, p. 3209-3212, Nov. 1987.

KAWAOKA, A.; MATSUNAGA, E.; ENDO, S.; KONDO, S.; YOSHIDA, K.; SHINMYO, A.; EBINUMA, H. Ectopic expression of a horseradish peroxidase enhances growth rate and increases oxidative stress resistance in hybrid aspen. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 132, n. 3, p. 1177–1185, July 2003.

KAZAN, K.; SCHENK, P.M.; WILSON, I.; MANNERS, J.M. DNA microarrays: new tools in the analysis of plant defence response. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, n. 3, p. 177–185, May 2001.

KERK, D.; BULGRIEN, J.; SMITH, D.W.; GRIBSKOV, M. Arabidopsis proteins containing similarity to the universal stress protein domain of bacteria. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 131, n. 3, p. 1209–1219, Mar. 2003.

KRUGER, W.M.; PRITSCH, C.; CHAO, S.; MUEHLBAUER, G.J. Functional and comparative bioinformatic analysis of expressed genes from wheat spikes infected with *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 5, p. 445-455. May 2002.

LAKER, H.A.; SREENIVASAN, T.N.; RAJ-KUMAR, D. Present status of witches' broom disease of cocoa in Trinidad. **Tropical Pest Management**, London, v. 34, n. 3, p. 318-323, July 1988.

LEE, S.C.; KIM, S.H.; AN, S.H.; YI, S.Y.; HWANG, B.K. Identification and functional expression of the pepper pathogeninduced gene, CAPIP2, involved in disease resistance and drought and salt stress tolerance. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 62, n. 1-2, p. 151–164, Sept. 2006.

LIVAK, K.L.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

LU, G.; JANTASURIYARAT, C.; ZHOU, B.; WANG, G.L. Isolation and characterization of novel defense response genes involved in compatible and incompatible interactions between rice and *Magnaporthe grisea*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 108, n. 3, p. 525–534, Feb. 2004.

MENU-BOUAOUICHE, L.; VRIET, C.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; VAN DAMME, E.J.; ROUGE, P. A molecular basis for the endo-beta 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. **Biochimie**, Paris, v. 85, n. 1-2, p. 123–131. Jan./Fev. 2003.

NG, M.; YANOFSKY, M. Function and evolution of the plant MADS-box gene family. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 2, n. 3, p. 186–195, Mar. 2001.

PENMAN, D.; BRITTON, G.; HARDIWICK, H.A.; COLLIN, H.A.; ISAAC, S. Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 6, p. 671-675, June 2000.

PEREIRA, J.L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J.M.; ALMEIDA, L.C.C. First record on the presence of witches' broom disease in the principal cocoa-producing area of Brazil. **Tropical Agriculture**, London, v. 67, n. 2, p. 188-189, Apr. 1990.

PODILA, G.K.; ZHENG, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; SUNDARAM, S.; HIREMATHS, S.; BRAND, J.H.; HYMES, M.J. Fungal gene expression in early symbiotic interactions between *Laccaria bicolor* and red pine. **Plant and soil**, The Hague, v. 244, n. 1-2, p.117–128, July 2002.

PURDY, L.H.; SCHIMDT, R.A. Status of cacao witches broom: Biology, Epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.

QUEIROZ, V.T.; GUIMARÃES, C.T.; AHNERT, D.; SCHUSTER, I.; DAHER, R.T.; PEREIRA, M.G.; MIRANDA, V.R.M.; LOGUÉRCIO, L.L.; BARROS, E.G.; MOREIRA, M.A. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. **Plant Breeding**, Berlin, v. 122, n. 3, p. 268-272, Mar. 2003.

QUIROGA, M.; GUERRERO, C.; BOTELLA, M.A.; BARCELÓ, A.; AMAYA, I.; MEDINA, M.I.; ALONSO, F.J.; FORCHETTI de, S.M.; TIGIER, H.; VALPUESTA, V. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, n, 4, p. 1119–1127, Apr. 2000.

ROSS, J.R.; NAM, K.H.; D'AURIA, J.C.; PICHERSKY, E. *S*-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 367, n. 1, p. 9–16, July 1999.

SASAKI, K.; IWAI, T.; HIRAGA, S.; KURODA, K.; SEO, S.; MITSUHARA, I.; MIYASAKA, A.; IWANO, M.; ITO, H.; MATSUI, H.; OHASHI, Y. Ten rice peroxidases redundantly respond to multiple stresses including infection with rice blast fungus. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 45, n. 10, p. 1442–1452, Oct. 2004.

SAUTER, M.; RZEWUSKI, G.; MARWEDEL, T.; LORBIECKE, R. The novel ethylene-regulated gene OsUsp1 from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 379, p. 2325–2331, Dec. 2002.

SCARPARI, L.M.; MEINHARDT, L.W.; MAZZAFERA, P.; POMELLA, A.W.V.; SCHIAVINATO, M.A.; CASCARDO, J.C.M.; PEREIRA, G.A.G. Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 413, p. 865–877, Mar. 2005.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; WILSON, I.; ANDERSON, J.P.; RICHMOND, T.; SOMERVILLE S.C.; MANNERS, J.M. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, Washington, v. 97, n. 21, p. 11655–11660, Oct. 2000.

SEO, H.S.; SONG, J.T.; CHEONG, J.; LEE, Y.; LEE, Y.; HWANG, I.; LEE, L.S.; CHOI, Y.D. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 98, n. 8, p. 4788–4793, Apr. 2001.

SERENO, M.L.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; VENCovsky, R.; FIGUEIRA, A. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Conservation Genetics**, Durahan, v. 7, n. 1, p. 13-24, Mar. 2006.

SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; MATSUOKA, K. Seleção de variáveis na avaliação de progênies de cacaueiro (*Theobroma cacao*) quanto a resistência a *Crinipellis pernicioso*. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 10, p. 87-94, 1998.

SILVA, S,D,V,M,; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis pernicioso* em cacaueiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 54-59, mar. 1999.

TAKEMOTO, D.; DOKE, N.; KAWAKITA, K. Characterization of elicitor-inducible tobacco genes isolated by differential hybridization. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 67, n. 2, p. 89-96, May 2001.

TAO, Y.; XIE, Z.; CHEN, W.; GLAZEBROOK, J.; CHANG, H,-S.; HAN, B.; ZHU, T.; ZOU, G.; KATAGIRI, F. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 2, p. 317–330, Feb. 2003.

THARA, V.K.; FELLERS, J.P.; ZHOU, J.M. In planta induced genes of *Puccinia triticina*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, n. 1, p. 51–56, Jan. 2003.

VERICA, J.A.; MAXIMOVA, S.N.; STREM, M.D.; CARLSON, J.E.; BAILEY, B.A.; GUILTINAN, M.J. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 6, p. 404–413, Nov. 2004.

VOIBLET, C.; DUPLESSIS, S.; ENCELOT, N.; MARTIN, F. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. **The Plant Journal**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 181-191, Jan. 2001.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis: A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, n. 2, p. 485–493, June 2001.

WHEELER, B.E.J. The growth of *Crinipellis pernicioso* in living and dead cocoa tissue, In: In: MOORE, D.; CASSELTON, L.A.; WOOD, D.A.; FRANKLAND, J.C. (Ed.). **Developmental Biology of Higher Fungi**. Cambridge: Cambridge University, 1985. p. 103-116.

ZEGZOUTI, H.; JONES, B.; FRASSE, P.; MARTY, C.; MAITRE, B.; LATCHÉ, A.; PECH, J.C.; BOUZAYEN, M. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene responsive and ripening-related genes isolated by differential display. **The Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 589-600, June 1999.

ZUO, K.; WANG, J.; WU, W.; CHAI, Y.; SUN, X.; TANG, K. Identification and characterization of differentially expressed genes of *Gossypium barbadense* infected by *Verticillium dahliae* with suppression subtractive hybridization. **Molecular Biology**, Moscow (Moskva), v. 39, n. 2, p. 191–199, Mar./Apr. 2005.

3 GENES DE *Crinipellis pernicios* RESPONSIVOS A FALTA DE NITROGÊNIO *IN VITRO* SÃO DIFERENCIALMENTE REGULADOS DURANTE A INFECÇÃO DE CACAUEIROS (*Theobroma cacao*)

Resumo

Genes de *Crinipellis perniciosa* responsivos a falta de nitrogênio *in vitro* são diferencialmente regulados durante a infecção de cacaueiros (*Theobroma cacao*)

O fungo *Crinipellis perniciosa* é o causador da Vassoura-de-Bruxa do cacaueiro (*Theobroma cacao*) e os mecanismos de patogenicidade desse fungo são amplamente desconhecidos. Em outros organismos, o metabolismo de Nitrogênio (N) está associado a genes de patogenicidade, com o cultivo *in vitro* em condições limitantes desse nutriente favorecendo a expressão destes genes. Genes presumíveis de patogenicidade de *Crinipellis perniciosa* foram identificados em uma biblioteca enriquecida por hibridização subtrativa supressiva para genes induzidos sob baixa disponibilidade de N. Na biblioteca, de 159 seqüências únicas (*unigenes*) identificadas, 59 foram anotadas por similaridade e classificadas por ontologia gênica. As categorias mais representadas foram “Metabolismo” e “Rotas, facilitação e transporte celular”, que somaram 21 dos 59 genes identificados (35%), junto com a classe “Função biológica desconhecida” com 26 genes (44%), cujas funções presumíveis, baseadas em domínios funcionais e dados da literatura, parecem estar associadas à atividade lignolítica, esporulação, metabolismo secundário e patogênese. Duas seqüências foram categorizadas como “Genes de defesa, virulência e reposta celular”, e esses genes presumíveis codificam proteínas alergênicas, cujas homólogas de outros organismos são indutoras da resposta de defesa em plantas ou animais. Foi avaliada a expressão diferencial por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) dos genes presumíveis de *C. perniciosa* codificando duas proteínas alergênicas, e as enzimas Aril-sulfatase; Aril-álcool oxidase; Aldo-ceto redutase; Citocromo P450; Fenilalanina amônio-liase; e Peroxidase em condições *in vitro* contrastantes para tipo e quantidade de N fornecido, sendo que apenas a Peroxidase não foi validada como diferencialmente expressa. Esses mesmos genes foram avaliados para expressão em plantas inoculadas, e dos sete expressos diferencialmente sob a carência de N, seis foram induzidos durante os períodos assintomáticos, corroborando a hipótese de convergência na via de sinalização para estresse nutricional abiótico e a patogênese.

Palavras chave: *Theobroma cacao*, Vassoura-de-Bruxa, *Crinipellis perniciosa*, Patogenicidade, Estresse de nitrogênio, Biblioteca subtrativa por supressão, SSH, Expressão gênica, Fase assintomática.

Abstract

Crinipellis pernicios*a responsive genes to nitrogen starvation *in vitro* are differentially regulated during infection of *Theobroma cacao

*Crinipellis pernicios*a is the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao* (cacao) and pathogenicity genes and mechanisms of this fungus are largely unknown. In other organisms, nitrogen (N) metabolism has been associated with genes of pathogenicity, with *in vitro* culture under limiting N conditions favouring pathogenicity gene expression. Putative pathogenicity genes from *Crinipellis pernicios*a were identified in a cDNA library enriched by subtractive suppressive hybridization for genes induced under limiting N. From the 159 identified unique sequences (unigenes) in the library, 59 were annotated by similarity and classified by gene ontology. The most represented categories were "Metabolism" and "Cellular Transport, Transport Facilitation and Route" containing 21 of the 59 identified genes (35%), together with "Unknown biological function" with 26 genes (44%), which putative functions, identified by functional domains and literature data, appeared to be associated with lignolytic activity; sporulation; secondary metabolism; and pathogenesis. Two sequences were categorized as "Defense genes, Virulence, and Cell response". These two putative genes coded for allergenic proteins, which homologues from other fungi are inducers of animal or plant defense. Differential gene expression was evaluated by quantitative amplification of reversed transcripts (RT-qPCR) of the putative *C. pernicios*a genes coding for the two allergenic proteins, and for the enzymes Aril-sulfatase; Aril-alcohol oxidase; Aldoketo reductase; Cytochrome P450; Phenylalanine amonnia lyase; and Peroxidase from mycelia grown *in vitro* in contrasting conditions for type and amount of N. Only the putative Peroxidase was not validated as differentially expressed. The same eight genes were analysed for expression in inoculated plants, and from the seven differentially expressed under N deprivation, six were induced under the symptomless stage of the disease, corroborating the hypothesis of convergence between the signal pathway for nutritional stress and pathogeneis.

Keywords: *Thebroma cacao*, Witches' broom, *Crinipellis pernicios*a, Pathogenicity, Nitrogen starvation, Subtractive suppressive librarie, SSH, Gene expression; Asymptomatic stage.

3.1 Introdução

O basidiomiceto *Crinipellis pernicioso* (Tricholomataceae) é o agente causal da doença Vassoura-de-Bruxa do cacaueiro (*Theobroma cacao*), uma enfermidade endêmica na região amazônica, cuja disseminação inviabilizou cultivos comerciais no Suriname, Trinidad e Equador (ANDEBRAHN; ALMEIDA; NAKAIAMA, 1998). No Brasil, a introdução do patógeno na região Sul da Bahia em 1989, causou a devastação das lavouras e a indústria chocolateira local. Anualmente, estima-se que as perdas geradas pela doença na América do Sul e Caribe alcance cerca de 450.000 toneladas ano⁻¹, representando 235 milhões de dólares (BOWERS et al., 2001). A única forma eficiente de controle a enfermidade é o uso de cultivares resistentes, e apesar da contínua busca de fontes de resistência, pouco se conhece sobre os fatores de patogenicidade do fungo.

Crinipellis pernicioso apresenta um ciclo de vida hemibiotrófico, desenvolvendo no hospedeiro uma fase biotrófica inicial, seguida de outra necrotrófica (PURDY; SMITH 1996). A fase biotrófica se inicia com a germinação de esporos, que penetram pelo estômato, e colonizam o apoplasto (FRIAS; PURDY; SCHMIDT, 1991). Nesta fase, a hifa apresenta micélio haplóide e monocariótico, com diâmetro de 5 a 8 µm e não desenvolve estruturas especializadas de nutrição. O fungo geralmente infecta regiões meristemáticas, como gemas apicais, flores e frutos imaturos. Com o desenvolvimento da fase biotrófica, os sintomas típicos de hipertrofia e hiperplasia, característicos para cada órgão infectado, surgem após 15 dias. Nas gemas apicais de ramos, são observados inchamentos e excessos de brotação, denominados de ‘vassoura verde’. A infecção de almofadas florais causa a reversão dos meristemas florais em vegetativos, e flores são abortadas ou geram frutos partenocárpicos pequenos e disformes (DELGADO ;COOK, 1976). Nos frutos em desenvolvimento (até 12 semanas), aparecem por ocasião da maturação (20-24 semanas) manchas necróticas duras, enquanto que no interior dos frutos a colonização do fungo compromete a produção e qualidade das sementes (EVANS, 1980). A fase necrotrófica se inicia com a invasão das células pelas hifas dicarióticas de 1,5 a 3 µm de diâmetro contendo grampos de conexão e 2 núcleos haplóides (DELGADO; COOK, 1976; GRIFFITH ; HEDGER, 1994). Após a morte dos tecidos, surgem os basidiocarpos onde são produzidos os basidiósporos, completando o ciclo da doença. Os sintomas de vassoura verde têm sido associados com a fase biotrófica, enquanto que a morte dos tecidos com fase necrotrófica, mas o estímulo ou fatores que

regem a mudança de fase é desconhecido, apesar de ambas as fases serem obtidas em *in vitro* (GRIFFITH; HEDGER, 1993; MEINHARDT et al., 2006).

O fungo pode ser classificado em biotipos-C (isolados que infectam *T. cacao*), -S (solanáceas) e -L (lianas), de acordo com o hospedeiro que infecta, sendo a classificação correlacionada com incompatibilidade somática e análise com marcadores moleculares (ARRUDA et al., 2003; GRIFFITH et al., 2003), mas os fatores que determinam a especificidade de hospedeiros são desconhecidos. Dentro do biotipo-C, há a divisão de grupos geográficos, que se associam com a patogenicidade a ‘Scavina 6’, único genótipo largamente utilizado como fonte de resistência (WHEELER; MEPSTED, 1988). A patogenicidade é confirmada pela taxa de crescimento do fungo em tecidos infectados, com os isolados mais patogênicos apresentando uma maior colonização nos tecidos de genótipos descendentes de ‘Scavina 6’ (WHEELER, 1985). A diferenciação por marcadores moleculares de isolados patogênicos, ou de localidades ou hospedeiros distintos tem sido buscada, porém sem sucesso (ARRUDA et al., 2003). Pouco se conhece sobre a contribuição do patógeno na manifestação dos sintomas. Há a hipótese de que a hiperplasia e hipertrofia dos tecidos, observada em vassouras, seria o resultado de um desbalanço hormonal causado pelo patógeno (MUSE et al., 1996), mas a capacidade catalítica do fungo foi apenas verificada *in vitro* (KRUPASAGAR; SEQUEIRA, 1969). Avanços recentes têm sido relatados sobre a fisiologia do fungo, como a obtenção da fase biotrófica *in vitro* (MEINHARDT et al., 2006) e a observação de estrutura de invasão *in vitro* (KILARU; HASENSTEIN, 2005). A identificação de genes candidatos de fatores de patogenicidade auxiliaria na investigação deste patógeno durante a infecção para seleção de genótipos resistentes e na possível diferenciação de isolados.

Genes de patogenicidade podem ser definidos com genes essenciais ou necessários para o desenvolvimento da doença, e os tipos de genes dependem do processo de infecção e da espécie do patógeno (IDNURM; HOWLLET, 2001). A identificação de genes de patogenicidade pode ter como ponto inicial, a busca em bancos de dados de genes relacionados com enzimas líticas, desintoxicadoras ou de síntese de fitotoxinas (IDNURM; HOWLLET, 2001). Mas a busca nos bancos de dados de ESTs (*Expression Sequence Tags*) de fungos fitopatogênicos, demonstrou que apenas 19 genes são comuns aos fitopatógenos sequenciados até o presente (SOANES; TALBOT, 2006), existindo a necessidade de identificação de novos genes por diversas abordagens. Novos genes podem ser identificados a partir do sequenciamento de bibliotecas da

interação patógeno-hospedeiro, mas a baixa representatividade de genes do patógeno nesse tipo de biblioteca requer um número exaustivo de clones seqüenciados (KRUGER et al., 2002; GUILLEROUX; OSBOURN, 2004). Uma outra limitação de bibliotecas de interação é a dificuldade na identificação exata dos genes do transcriptoma do hospedeiro e do patógeno, requerendo o uso das ferramentas específicas (BIRCH; KAMOUN, 2000).

Uma abordagem direcionada para identificar genes potenciais responsáveis pela virulência e patogenicidade seria por meio da busca de genes induzidos no cultivo *in vitro* sob carência de Carbono (C) e/ou Nitrogênio (N) (PIETERSE et al., 1994; TALBOT et al., 1997; TRAIL et al., 2003; VAN DEN ACKERVEKEN et al., 1994;). A identificação dos primeiros genes de patogenicidade permitiu verificar que a expressão destes genes aumentava sob cultivo *in vitro* na ausência de N (VAN DEN ACKERVEKEN et al., 1994). Com a descoberta de novos genes de patogenicidade, foi possível correlacionar a maior expressão destes genes sob deficiência de N e/ou C, e verificar a tendência de serem mais expressos sob carência de Nitrogênio (revisado por SNOEIJERS et al., 2000). Esta tendência foi reforçada pela identificação na região promotora de genes de patogenicidade, de seqüências específicas para acoplamento de fatores de transcrição relacionados com metabolismo de N, tanto em fungos quanto bactérias (SNOEIJERS et al., 2000). Esses dados indicam que o ambiente colonizado inicialmente pelo patógeno no hospedeiro deva ser carente em N (SNOEIJERS et al., 2000; TALBOT et al., 1997) ou aminoácidos essenciais para patogênese (SOLOMON; TAN, OLIVER, 2003), servindo de estímulo para ativação dos genes de patogenicidade *in planta*. Baseado nessa abordagem, genes candidatos de patogenicidade foram identificados em *Gibberella zeae* (TRAIL et al., 2003) e *Magnaporthe grisea* (DONOFRIO et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi identificar genes diferencialmente expressos em *C. perniciosa* sob estresse nutricional de N *in vitro*, visando verificar as alterações fisiológicas causadas pelo estresse, e selecionar genes de patogenicidade presumíveis para estudo de expressão em planta assintomáticas, infectadas pelo patógeno. As seqüências de *C. perniciosa* foram obtidas utilizando o método subtração por supressão, criando uma biblioteca enriquecida com genes expressos em cultivo com baixa concentração de N. Entre os transcritos, foram identificados genes presumíveis relacionados com patogênese, metabolismo secundário e formação de basidiocarpo, e oito foram selecionados para avaliação de expressão *in vitro* e em plantas inoculadas com *C. perniciosa*. Foram caracterizados sete genes expressos

diferencialmente *in vitro* sob condições de restrição de N, dos quais seis foram mais expressos nas duas condições avaliadas: durante o desenvolvimento da fase biotrófica sob carência de N *in vitro* ou na interação com o cacaueteiro durante o período assintomático da doença.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Método

3.2.1.1 Material vegetal, inóculo e isolado de *Crinipellis perniciosa*

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação na ‘Estação de Recursos Genéticos do Cacaueiro José Haroldo’, Marituba, PA, Brasil (1°12’S; 49°13’W). As mudas clonais do acesso ‘ICS 39’ (altamente suscetível) foram obtidas a partir da enxertia de borbulhas sobre mudas de cacaueiro comum, enquanto as plântulas do controle suscetível ‘Catongo’ (albino mutante) foram obtidas de sementes de fruto de polinização aberta. Após o pegamento dos enxertos com ‘ICS 39’, foi aguardado o desenvolvimento dos ramos e a formação de folhas novas por 2-3 meses. O inóculo de *C. perniciosa* foi obtido de ramos de cacaueiros infectados, oriundos do mesmo local. A produção de basidiocarpos nos ramos infectados foi induzida pela exposição a períodos alternados de seco e molhado (12 h). Os basidiocarpos coletados foram lavados com água destilada, imersos em suspensão de 0,5% clorofenicol. Os estipes foram removidos e os píleos aderidos à tampa de placa de Petri com gel de silicone. Os basidiósporos ejetados por 12 h foram coletados em uma suspensão de 16% glicerol sob agitação. A suspensão de esporos foi filtrada em membrana de 0,45 µm, e os basidiósporos retidos na membrana foram ressuspensos novamente em 2 ml de 16% glicerol e mantidos em N líquido. O isolado ESJOH-1, obtido a partir de esporos germinados em meio Ágar-água e transferidos para meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), foi conservado em meio BDA a temperatura ambiente.

3.2.1.2 Condições de cultivo utilizadas para elaborar a biblioteca

Discos de ágar do isolado ESJOH 1 cultivado em meio BDA foram transferidos para 200 ml de meio líquido sintético (*Yeast Carbon Base*, Bencto Dickinson Microbiology Systems, MD, EUA) contendo 2 mM de Tartarato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6]$, 4 mM de nitrogênio] e cultivado por 30 dias sob fotoperíodo de 12 h. Como controle negativo, o mesmo isolado foi cultivado em 200 ml de meio líquido sintético (*Yeast Carbon Base*) contendo 100 mM de nitrato de potássio (KNO_3) sob mesmo fotoperíodo. Os cultivos foram aerados sob agitação de 150 rpm. Após o cultivo, a fase líquida foi separada por filtração a vácuo, e o micélio foi lavado 3 vezes com água destilada e armazenado – 80°C. A extração de RNA foi conduzida utilizando Trizol (Invitrogen; MD; EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

3.2.1.3 Construção da biblioteca SSH

A biblioteca foi construída usando o kit *PCR selected cDNA subtraction* (Clontech; CA; EUA). O cDNA foi sintetizado utilizando o kit *SuperSMART* (Clontech), e posteriormente purificado utilizando o kit GFX (Amersham Biosciences; NJ; EUA), e visualizado após eletroforese em gel de 1,2% agarose. A abordagem utilizada para construção da biblioteca subtrativa foi a realização da subtração entre o cDNA obtido do cultivo com Tartarato de amônio (*tester*) contra aquele do cultivo com nitrato de potássio (*driver*). O cDNA *tester* foi preparado fazendo a digestão com *RsaI*, e a população de moléculas foi separada em duas metades, e a ligação dos adaptadores 1 e 2 do kit ocorreram separadamente. A população de cDNA utilizada como *driver* foi apenas digerida com a enzima *RsaI*. Cada mistura de cDNA *tester* foi hibridizada com excesso de *driver* separadamente e as duas subtração foram misturadas e hibridizada novamente com mais *driver*. A supressão das seqüências em comum foi feita por PCR, utilizando iniciadores específicos aos adaptadores. Os iniciadores específicos para o gene Actina de *C. perniciosus* (GESTEIRA et al., 2003) foram utilizados nos ensaios-controle nas diversas etapas de construção das bibliotecas, conforme sugerido no manual do kit. Os produtos de amplificação foram ligados no plasmídeo pGEM-T Easy (Promega, WI, EUA), transformado em células eletrocompetentes de *E. coli* (DH10B) e plaqueadas em meio seletivo. As colônias brancas foram isoladas e individualizadas em microplacas (96 poços) contendo meio seletivo com 8% de glicerol e estocadas a -80°C.

3.2.1.4 Sequenciamento

Uma amostra de clones de cada placa foi avaliada para presença de inserto por amplificação utilizando os iniciadores universais M13. Os produtos de amplificação das colônias foram seqüenciados diretamente. De cada suspensão de bactéria em glicerol, foi coletado 1 µl que foi diluído em 11 µl de água esterilizada e desnaturado a 95°C por 5 min. A reação de amplificação continha 11 µl da solução de plasmídeo; 50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl pH 8,4; 1,5 mM MgCl₂; 100 µM de cada dNTP; 0,2 µM de cada iniciador M13; e 1,5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen do Brasil; SP, Brasil) no volume final de 19 µl. Para seqüenciamento, foi utilizado 1 µl do produto previamente amplificado com o iniciador T7. O seqüenciamento foi realizado usando o protocolo padrão do kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences) e realizado no seqüenciador ABI-3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA. USA).

3.2.1.5 Análises das seqüências e anotação

Os cromatogramas foram examinados para qualidade e presença de vetor com os programas Phred/Phrap/Crossmatch (EWING; GREEN, 1998) e agrupados com CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). As seqüências obtidas foram comparadas por BLASTX com a do banco de dados de seqüências não redundantes do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do *Aspergillus graminearum* e *Ustilago maydes* do MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/>). As seqüências também foram comparadas com o banco de dados do genoma de *C. pernicioso* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>, gentilmente permitido pelo Prof. Dr. Gonçalo A.G. Pereira) utilizando BLASTN. Foram considerados *no hit* seqüências com valores $E > 10^{-4}$. Para a categorização dos genes identificados foi utilizado o código dos genes homólogos de *Aspergillus graminearum* às seqüências obtidas, e a classificação ontológica foi realizada submetendo esses códigos ao banco de dados do MIPS. Para os genes sem homólogos identificados no genoma de *Aspergillus graminearum*, a ontologia foi realizada por palavra chave no banco de dados (<http://www.geneontology.org>).

3.2.1.6 Validação da biblioteca por amplificação enzimática quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Inicialmente foi avaliada a expressão de uma amostra de genes presumíveis de patogenicidade nas condições de cultivo *in vitro*. Foram desenhados iniciadores para algumas seqüências selecionadas (Apêndice C), e os genes da Actina e da Tubulina de *C. pernicioso* foram escolhidos como controle interno de expressão. Os iniciadores para os genes da Actina e Tubulina de *C. pernicioso* foram desenhados de acordo com seqüências disponíveis no banco de dados do genoma (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>). Os iniciadores foram desenhados usando o programa Primer3 e foram avaliados com NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>) em termos de estabilidade e de pareamento indesejável.

A transcrição reversa foi realizada com RNA previamente tratado com DNase I e foram utilizadas as mesmas amostras de fungo do preparo da biblioteca. A reação foi conduzida utilizando o kit *SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). As amplificações quantitativas em tempo real da amostras de cDNA (RT-qPCR) foram conduzidas para reações com volume de 10 µl contendo 1 µl cDNA (diluição 1:10 v/v); 0,5 µM para cada iniciador específico (Apêndice C) e 5 µl *Platinum SYBR-green qPCR SuperMix-UDG 2X* (Invitrogen). As amplificações foram realizadas no termociclador RotorGene 3000 (Corbett Life Science, Australia) em triplicatas. A amplificação foi conduzida em incubação inicial a 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão (2 *steps*); ou por 50°C por 2 min, 95°C por 2 min e seguidas de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 62°C por 15 e 72 °C por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão (3 *steps*). Com o término da reação, a curva de dissociação da fita dupla de DNA (*melting curve*) para cada produto amplificado foi determinada entre as temperaturas de 72°C e 95°C. Os experimentos incluíram o controle negativo (reação sem cDNA) e a eficiência de amplificação para cada iniciador foi determinado pela curva padrão da diluição serial de cDNA (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). A aquisição dos dados foi feita através do programa RotorGene Real-Time Analysis 6.0 (Corbett), que disponibilizava o valores de *cycle threshold* (C_T) e eficiência de PCR (E). A média dos C_T das triplicatas foi usada para

determinar as diferenças na expressão utilizando a referência interna (Actina e/ou Tubulina) baseada na equação $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.2.1.7 Inoculação das plantas

Os meristemas apicais das plantas clonais suscetíveis ('ICS 39') foram inoculados depositando 30 µl de uma suspensão de basidiósporos (10^5 esporos ml^{-1}) e mantidas em câmara úmida por 24 h. Plântulas de 'Catongo' inoculadas foram utilizadas como controle da eficiência da inoculação. As pontas dos ramos de plantas de 'ICS 39', inoculados e não inoculados, foram coletadas com 24, 48, 72, 120 e 240 h após a inoculação e armazenadas em nitrogênio líquido até a extração de RNA.

3.2.1.8 Extração de RNA total de ramos

O RNA total de ramos de *T. cacao* foi extraído usando o protocolo proposto por Verica et al. (2004). Brevemente, o RNA total foi extraído de 2 g de tecido de *T. cacao*, obtidas a partir do meristema de duas plantas, que foi macerado em N líquido e transferido para um tubo de centrífuga, onde foi adicionado 15 ml de tampão de extração (2% CTAB; 2% PVP; 100 mM Tris pH 8,0; 5 mM EDTA; 2 M NaCl; 2% β-mercaptoetanol). Após a homogeneização, 15 ml de clorofórmio foi adicionado, emulsificado e centrifugado a 8000 g por 20 min a 4°C. O sobrenadante, aproximadamente 10 ml, foi transferido para um novo tubo de 15 ml, e o RNA total foi precipitado adicionando 5ml de uma solução 8 M de Cloreto de lítio após incubação a 4°C por 12 h. O RNA total foi coletado por centrifugação a 8000 g por 30 min. O RNA total ressuspendido foi então purificado com o kit RNeasy (Quiagen; Hilden; Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade e concentração do RNA foram visualizadas em gel de 1,2% agarose. As amostras de RNA analisadas representavam duas plantas.

3.2.1.9 Detecção de transcritos e análise da expressão dos transcritos de *C. pernicioso* nas plantas inoculadas

A detecção de transcritos de *C. pernicioso* nas amostras inoculadas foi realizada nas

mesmas condições anteriores, apenas alterando as reações de amplificação sendo realizadas com 1 µl de cDNA tratado com DNase I sem diluição. A identificação do transcrito de genes do fungo nas amostras inoculadas foi baseada na curva de dissociação do produto amplificado pelos iniciadores propostos, entre as temperaturas de 72°C e 95°C (curva de *melting*), tendo como referência a amplificação realizada com cDNA do fungo cultivado *in vitro*. A detecção de transcritos foi realizada nos tempos 24, 48, 72, 120 e 240 h após a inoculação no genótipo suscetível ICS 39. Os fragmentos corados com SYBER green I foram analisados por eletroforese em gel de 1,5% agarose. Os valores de C_T (*cycle threshold*) foram usados pra determinar a expressão gênica pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A expressão foi determinada tendo como referência interna o gene da Actina de *T. cacao*, cujos iniciadores foram desenhados baseados na sequência de TC45 do *T. cacao* Gene Index do TIGR. Os valores de expressão foram relativos a primeira detecção dos genes (48 h), e as reações para estes genes foram realizadas com amostras diluídas 10^{-1} . A expressão dos genes do fungo também foi determinada para cada período tendo como referência interna o transcrito Asp13-CpN para o mesmo período avaliado.

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Desenvolvimento do fungo nas condições de cultivo

O fungo foi cultivado em meio líquido com baixa concentração de N reduzido (4 mM N na forma de Tartarato de amônio), em comparação ao cultivo convencional em meio rico (100 mM de N oxidado na forma de Nitrato de potássio). As culturas apresentaram diferenças visuais na produção de micélio e produção de pigmentação nas hifas e no meio líquido entre o tratamento com Tartarato ou Nitrato (Figura 1A-B). O cultivo de *C. pernicioso* em meio líquido contendo nitrato de potássio apresentou visualmente maior massa micelial e coloração creme, enquanto que o fungo cultivado na presença de Tartarato de amônio apresentou crescimento menos vigoroso e apresentou coloração vermelha (Figura 1B). A coloração do meio com tartarato se inicia no 7º dia e intensificando até o 30º. A pigmentação está presente nas hifas e meio líquido (Figura 1). Aos 30 dias de cultivo, foi obtido micélio suficiente para extração de RNA para ambas as condições.

Figura 1 - Cultivo de *Crinipellis pernicioso* com 30 dias. A - Cultivo em meio líquido sintético ('Yest Carbon Base') contendo 100 mM de Nitrato de potássio com abundante crescimento micelial e cloração creme B - Cultivo meio líquido sintético (Yest Carbon Base) contendo 2 mM de Tartarato de amônio com crescimento micelial menos abundante e com produção de pigmento vermelho. Os cultivos foram mantidos no fotoperíodo de 12 h sob oxigenação forçada por rotação de 100 rotações por minuto.

3.2.2.2 Bibliotecas subtrativas

Para examinar a resposta transcricional de *C. pernicioso* sob condições limitantes de N, foi construída uma biblioteca normalizada pela subtração de seqüências similares por hibridização e supressão (SSH). Foi obtido cDNA de micélio necrotrófico cultivado em meio rico contendo N oxidado na forma de Nitrato de potássio (*driver*), que foi utilizado para remover seqüências similares aos cDNAs obtidos de micélio cultivado sob baixa concentração de N na forma de Tartarato de amônio (*driver*).

A biblioteca enriquecida para genes expressos na condição de baixa concentração de N continha 192 clones, e o seqüenciamento desses clones revelou fragmentos de tamanho médio de 400 pb, variando de 200 a 700 pb. A triagem e a análise de agrupamento dessas seqüências

foram realizadas com os programas Phred/Phrap/CAP3 para identificar seqüências repetidas e agrupá-las em *contigs* e identificar as seqüências únicas (*singlets*). Das 192 seqüências obtidas, foi possível obter 25 agrupamentos (*contigs*), gerados a partir de 64 seqüências de clones individuais, restando 134 seqüências únicas (*singlets*), totalizando um conjunto de 159 *unigenes*. Portanto, a redundância (número de seqüências repetidas no conjunto) foi de 12,5% para a biblioteca SSH

3.2.2.3 Anotação das seqüências

Dos 159 *unigenes* identificados, foi possível anotar 59 genes presumíveis (Tabela 2), sendo as demais 100 seqüências caracterizadas como ‘*no hit*’ ou como apresentando baixa similaridade (valores $E > 10^{-4}$) em comparação aos três bancos de dados avaliados. Das 59 seqüências anotadas por BLASTX no NCBI e no MIPS, 46 (78%) foram confirmadas por BLASTN no banco de seqüências parciais do genoma de *Crinipellis perniciosa* (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura/>).

Na categorização dessas 59 seqüências anotadas, o grupo mais representado foi o de ‘Função Biológica Desconhecida’ com 26 componentes (44%); seguido das categorias ‘Metabolismo’ (19%) e ‘Rotas/facilitação e transporte celular’ (17%) (Tabela 2). A classe de genes associada ‘Virulência, resposta celular e defesa’ apresentou apenas duas seqüências (*Asp f 13-like protein* e *88 kDa immunoreactive mannoprotein*; (Apêndice D).

3.2.2.4 Validação da biblioteca por amplificação enzimática quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

Para validação da expressão diferencial entre as bibliotecas de micélios crescidos em condições de N distintas (tipo e quantidade) foi conduzida a análise de amplificação enzimática quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) de oito genes presumíveis identificados (Apêndice D). Os oito transcritos analisados foram selecionados por representarem categorias de prováveis genes associados à virulência e patogenicidade, incluindo *Aspf13-CpN* e *88KD-CpN* da categoria ‘Virulência, resposta celular e defesa’ (Apêndice D), cujos homólogos possuem evidências de participação na indução da reposta de defesa (PAZZAGLI et al., 1999; SEIDL et

al., 2006). Outros três transcritos escolhidos para validação pertenciam as categorias ‘Metabolismo’, os genes presumíveis codificam para a Aril-sulfatase (AS-CpN) associado ao metabolismo de N, e para Aldoceto redutase (AK-CpN) e Fenilalanina amônio-liase (PAL-CpN) do metabolismo de Carbono. Os três transcritos restantes representaram a categoria ‘Função biológica desconhecida’, incluindo homólogos aos genes codificando as enzimas Aril-alcool oxidase (AAO-CpN); Citocromo P450 (P450-CpN) e Cloroperoxidase presumível (Perox-CpN; Tabela 2). A análise da expressão dos genes foi realizada tendo como genes referência interna a Actina (GESTEIRA et al., 2003) e Tubulina de *C. perniciososa*, que foram desenhados a partir de seqüências disponíveis no banco de dados genoma *Crinipellis perniciososa* (Apêndice A).

Dos oito genes escolhidos, sete demonstraram acúmulo de transcritos na condição de carência de N (Figura 2). Apenas o homólogo a Cloroperoxidase presumível (Perox-CpN), não confirmou a diferenciação esperada em acúmulo de transcritos no tratamento de baixo N (tartarato de amônio) em relação ao nível normal, apresentando o mesmo comportamento que os genes de referência (dados não mostrados). Os genes mais expressos nas condições de carência de N foram AS-CpN e P450-CpN (Figura 2). A estabilidade dos genes de referência entre os tratamentos também foi avaliada, não se verificando a expressão diferencial entre Actina e Tubulina nas condições testadas (Figura 2). Não houve diferenças contrastantes quando se utilizou o gene da Actina ou da Tubulina como referência (Figura 2), demonstrando não haver regulação nessas condições para esses dois genes.

Figura 2 - Genes de *Crinipellis pernicioso* diferencialmente expressos em cultivo restrito de nitrogênio por 30 dias. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método $[2^{-\Delta(\Delta C_t)}]$ a partir dos valores de C_t determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real. Foram utilizados com referência os genes da tubulina e actina de *C. pernicioso*, ambos não tiveram alteração na expressão entre os tratamentos (Ref Actin e Ref Tubulin). O eixo y representa o número de vezes da expressão relativa em relação a referência.

3.2.2.5 Detecção de *C. pernicioso* em plantas inoculadas através da amplificação de genes transcritos pelo fungo

As plantas de 'ICS 39', genótipo suscetível à Vassoura-de-Bruixa, apresentaram sintomas na avaliação com 30 dias após a inoculação (dados não mostrados). Os iniciadores para os genes da Actina e Tubulina de *C. pernicioso* foram testados, mas apresentaram amplificação inespecíficas com as reações realizada com o cDNA extraído de plantas, não sendo então utilizados nas análises (dados não mostrados; Leal Jr. et al., submetido). Quando os iniciadores específicos para os genes Aspfl3-CpN, 88KD-CpN, AS-CpN, AK-CpN, P450-CpN e PAL-CpN (Tabela 1) foram empregados na amplificação de cDNA extraído de amostras não inoculadas nos períodos com 24, 48, 72, 120 e 240 h, não houve a produção de fragmentos (dados não mostrados). Um exemplo de ausência de amplificação desses transcritos pode ser visto na Figura 3 para as amostras coletadas a 24 h (assinalado como NI – não inoculado). Já com as amostras inoculadas, foi possível a detecção de transcritos dos genes Aspfl3-CpN; 88KD-CpN; AS-CpN; AK-CpN; P450-CpN; e PAL-CpN em momentos distintos (Figura 3A-3M). Todos os genes foram positivamente identificados de acordo com a curva de dissociação a partir de 48 h. Os

genes Aspfl3-CpN; 88KD-CpN e AS-CpN apresentaram detecção contínua a partir de 48 h, enquanto que os outros transcritos (AK-CpN, P450-CpN e PAL-CpN) apresentaram detecção intermitente entre 72 e 120 h. Do primeiro grupo, o transcrito de Aspfl3-CpN foi detectado até 240 h, enquanto que aqueles dos genes 88KD-CpN e AS-CpN ficaram restrito até 120 h após a inoculação (Figura 3).

Os fragmentos amplificados a partir das amostras de plantas infectadas apresentaram variações na temperatura de dissociação em relação ao do cDNA do fungo. Os fragmentos de Aspfl3-CpN obtido das amostras infectadas tiveram uma média na temperatura de dissociação de $85,3^{\circ}\text{C} \pm 0,14$, enquanto que o do cDNA de *C. perniciosa* crescido *in vitro* foi de 85°C . Os fragmentos de 88KD-CpN obtidos das amostras infectadas tiveram uma temperatura de dissociação de $85,5^{\circ}\text{C}$ e para o *C. perniciosa in vitro* de $83,3^{\circ}\text{C}$. Com o transcrito AS-CpN a média foi de $83,4 \pm 0,11$ e o de *C. perniciosa in vitro* $83,2^{\circ}\text{C}$; PAL-CpN foi de $84,3^{\circ}\text{C} \pm 0,17$ e o *in vitro* $84,3^{\circ}\text{C}$; P450-CpN foi $83,8^{\circ}\text{C}$ e o *in vitro* 84°C ; AK-CpN foi $83,3^{\circ}\text{C}$ e o *in vitro* 83°C . Estas variações podem ser observadas nos gráficos de dissociação (Figura 3). A amplificação e tamanho dos produtos de PCR foram confirmados após eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 3).

Figura 3 - Curva de dissociação e confirmação da amplificação por análise de eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR dos genes Aspfl3-CpN (A, G), 88KD-CpN (B, H), AS-CpN (C, I), AK-CpN (D, J), P450-CpN (E, L) e PAL-CpN (F, M). Nas reações foram utilizados cDNA do fungo cultivado *in vitro* (F) e cDNA de plantas de 'ICS 39' não inoculada (NI) e inoculadas (24, 48, 72, 120 e 240). A reação com cDNA de *Crinipellis pernicioso* apresentou pico de fluorescência característico para os produtos amplificados para cada par de iniciador gene específico. Os controles negativos (NI e B) não apresentaram pico de fluorescência. As amostras inoculadas e positivas para presença do patógeno apresentaram o mesmo pico registrado para o controle positivo (A, B, C, D, E e F). O produto de PCR foi confirmado em gel de agarose 1,5% para as amostras positivas (G, H, I, J, L e M). P-padrão de peso molecular referência para fragmentos acima de 50 pb.

3.2.2.6 Análise da expressão dos transcritos de fungos nas plantas inoculadas

De forma a quantificar a expressão dos genes de *C. pernicioso* durante a interação compatível com *T. cacao*, foi conduzida a determinação da expressão dos genes do fungo tendo como referência o gene da Actina de *T. cacao* 48 h após a inoculação (Figura 4; barras negras), pois foi quando os primeiros transcritos do patógeno foram detectados (Figura 3), estabelecidos como valor de expressão igual a unidade. Para os genes que apresentaram uma regulação positiva durante a infecção (Figura 4), foi verificado acúmulo de transcritos nos momentos mais tardios (120 – 240 h), exceto para 88KD-CpN, que teve a expressão reduzida durante todo o período analisado. A expressão relativa também foi analisada tendo como referência um dos genes do fungo, Aspfl3-CpN (Figura 4, barras brancas). O gene Aspfl3-CpN foi escolhido por ser induzidos 48 h após inoculação e assim permanecer até 240 h (Figura 3), sendo possível calcular a expressão relativa para os demais genes sempre para o mesmo período de indução. Baseado nesta expressão relativa foi possível verificar a magnitude da expressão dos genes de *C. pernicioso* no tempo 48 h após inoculação, e como se comportaram em relação a Aspfl3-CpN nos demais períodos. O gene P450-CpN foi mais expresso que o Aspfl3-CpN a 48 e 240 h pós-inoculação (Figura 4). Já o gene presumível AS-CpN apresentou expressão similar ao Aspfl3-CpN com 48 h, e maior expressão com 120 h. Os genes AK-CpN, 88KD-CpN e PAL-CpN tiveram menor expressão.

Figura 4 - Análise expressão dos genes Asp f13-CpN, 88KD-CpN, AS-CpN, AK-CpN, P450-CpN e PAL-CpN de *C. pernicioso* nas amostras inoculadas de 'ICS 39' com diagnóstico positivo. A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método $[2^{-\Delta(\Delta C_t)}]$ a partir dos valores de C_t determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real. A análise foi realizada a partir de 48 h, quando aconteceu a primeira detecção. A evolução da expressão do gene é verificada tendo como referência o gene da Actina de *T. cacao* e o tempo 48 h, que apresenta valor de expressão relativa 1. Nesta análise todos os genes tiveram maior indução no momento mais distante da primeira detecção, com exceção do gene 88KD-CpN (coluna branca). Na análise da expressão dos genes tendo como referência a expressão do Asp f13-CpN, apenas o genes AS-CpN e P450-CpN apresentaram expressão similar ou superior a Asp f13-CpN. A expressão do gene Asp f13-CpN quando comparado com ele mesmo apresenta valor 1 em todos os tempos. O eixo y representa o número de vezes da expressão relativa em relação a referência.

3.2.3 Discussão

A constatação que genes potenciais responsáveis pela virulência e/ou patogenicidade de fitopatógenos seriam induzidos em condições de cultivo *in vitro* sob carência de N (SNOEIJERS et al., 2000; TALBOT et al., 1997; VAN DEN ACKERVEKEN et al., 1994) permitiu o direcionamento de estratégias de identificação de genes candidatos. A busca de genes presumíveis de patogenicidade em bibliotecas de interação planta-patógeno é limitada devido a baixa representatividade de genes do fungo e sua diferenciação dos genes do hospedeiro (TRAIL et al., 2003). No presente estudo, a biblioteca subtrativa supressiva gerada a partir de micélio de *Crinipellis pernicioso* cultivado sob condições limitantes de N identificou 159 seqüências únicas (*unigenes*), das quais permitiu anotar 59 genes presumíveis, categorizados como genes envolvidos na nutrição, reprodução, produção de compostos secundários e patogênese (Apêndice D). A condição limitante de N empregada para *C. pernicioso* foi de 4 mM, que é inferior aquela estimada para ambientes saprotróficos, como a madeira com 7,5 mM N (BODDY; WATKINSON, 1995). Alguns genes selecionados de acordo com a sua representatividade e categorização, foram empregados em análises de RT-qPCR e validaram majoritariamente (7 em 8, 87,5%) suas expressões diferenciais entre as condições contrastantes de concentração e forma de N. Paralelamente, o acúmulo diferencial de seis desses oito transcritos em plantas suscetíveis de *T. cacao* infectadas corrobora a hipótese de correlação entre o acúmulo dos mesmos transcritos em resposta ao estresse abiótico e a patogênese, sugerindo uma sobreposição na sinalização da resposta destes estímulos.

As classes mais representativas na categorização dos genes identificados foram aquelas de ‘Metabolismo’ e ‘Rotas, facilitação e transporte celular’. Estas classes já foram relatadas como predominantes nas condições de estresse nutricional para fitopatógenos (DIVON et al., 2005). A equivalência na percentagem de genes representados entre a classe de ‘Metabolismo’ e ‘Rota, facilitação e transporte celular’ evidencia a importância destes processos na reestruturação celular em condições deficientes de N, com maior contribuição de genes relacionados com transportadores de membrana. Na classe ‘Metabolismo’ os genes identificados podem estar envolvidos no metabolismo de N, síntese de aminoácidos além do metabolismo de carbono e lipídeos. A presença de genes ligados ao metabolismo de C sugere a convergência de sinalização entre o estresse nutricional de N e C. A identificação na biblioteca das seqüências ‘2B02-CpN’ e

‘Contig 20’ (Apêndice D), presumivelmente codificando respectivamente a enzima 2-keto-3-deoxy-D-arabino-heptulosonate aldolase, responsável pela primeira reação catalítica da rota de síntese do chiquimato, e a enzima fenilalanina amônio-liase, sugere a ativação da síntese de compostos fenólicos e/ou pigmentos via rota do ácido chiquimico (GILL, 2001).

A biblioteca apresentou uma grande percentual de seqüências (44%) sem função conhecida, mas com valores condizentes aos descritos para bibliotecas similares, que variaram de 27 a 42% (TRAIL et al., 2003; SOANES; TALBOT, 2006). No presente estudo, a função das seqüências categorizadas como ‘Função biológica desconhecida’ foi relacionada por meio de domínios funcionais e descrições prévias na literatura, e para parte desses genes, há similares nos bancos de dados pesquisados, relacionados com a fase reprodutiva; atividade lignolítica (KEYSER; ZEIKUS, 1978; CROAN; KIM-YOUNG; KIM, 1997); e metabolismo secundário (YU; KELLER, 2005), reflexos da falta de Nitrogênio. A condição limitante de N empregada para *C. pernicioso* foi de 4 mM, que é inferior aquela estimada para ambientes saprotróficos, tais como a madeira, que contém cerca de 7,5 mM N (BODDY; WATKINSON, 1995). A similaridade do transcrito AOO-CpN com seqüências de Aril-álcool oxidase, enzima ativada durante a atividade lignolítica em fungos (JONG; FIELD; BONT, 1994), e a expressão diferencial de AOO-CpN no meio com baixa concentração de N, corrobora a hipótese de ativação do metabolismo lignolítico nas condições estudadas. A carência de N parece também induzir a transição de *C. pernicioso* para a fase reprodutiva, pois foram identificadas duas seqüências na biblioteca SSH com similaridade a genes fundamentais para formação de basidiocarpos de *Coprinopsis cinerea*: o clone 1F06-CpN (Apêndice D) possui similaridade com o gene *Ich1* (BAA32788.1), essencial para formação de corpos de frutificação (MURAGUCHI; KAMADA, 1998), enquanto o Contig 13 aparenta codificar um Citocromo P450, similar a outro identificado como o gene *eln2*, associada ao alongamento do estipe (MURAGUCHI; KAMADA, 2000). Porém, o estímulo ou tempo de permanência do meio não foi suficiente para observar estruturas reprodutivas nas condições utilizadas.

A produção de pigmentos no cultivo com tartarato de amônio (Figura 1), demonstra a ativação do metabolismo secundário do fitopatógeno (YU; KELLER, 2005). A produção de pigmentos em *C. pernicioso* já foi relatada em reação a incompatibilidade, degradação de ligninas, ou indução por luz (HEDGER; PICKERING, 1987; BASTOS; ANDEBRHAN; ALMEIDA, 1988). Ambas condições de cultivo foram expostas ao mesmo fotoperíodo e

radiação, portanto o efeito da luz não pode ser considerado como o fator indutor. Nas seqüências obtidas na biblioteca de *C. pernicioso*, além de sugerir a ativação do metabolismo secundário pela via do ácido chiquímico, associado à síntese de alguns pigmentos e/ou toxinas em basidiomicetos (GILL, 2001). Também foram identificados genes com domínio similar àqueles presentes em genes envolvidos no metabolismo/síntese de policetídeos e antibiótico, tais como Versicorolin B sintase (fg12161; Apêndice D); O-metilesterigmatocistina oxireductase (fg12003); e isopenicilina N sintase (XP762189.1). A Versicorolin B e Esterigmatocistina são compostos intermediários da síntese do policetídeo aflatoxina em *Aspergillus flavus*, e genes homólogos codificando enzimas desta rota estão associados à produção de fitotoxina em *Dothistroma pini* (BRADSHAW et al., 2002). Genes da fase reprodutiva e metabolismo secundário não foram exclusivos desta biblioteca, e já foram relatados para outras bibliotecas de *Fusarium oxysporum* cultivado em condições de carência de nutrientes (DIVON et al., 2005).

O fator de transcrição identificado na biblioteca apresenta o domínio funcional do tipo *Zn(II)₂Cys₆ Binuclear Cluster DNA Binding* (AAW46587.1), apenas identificado em fungos, e que pode regular o metabolismo primário e secundário; resistência a drogas; e desenvolvimento meiótico (TODD; ADRIANOPOULOS, 1997). Diversas das funções representadas pelos genes identificados, poderiam ser reguladas em *C. pernicioso* por este fator de transcrição, como a resposta à deficiência de N; síntese de aflotoxina e esterigmatocistina; ativação de enzimas de utilização de quimato/chiquimato; e regulação da formação primórdios e/ou basidiocarpo (TODD; ADRIANOPOULOS, 1997). Este fator de transcrição possui importância fundamental por ser determinante na mudança de fase no ciclo de vida do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* (DUFRESNE et al., 2000).

Os genes de patogênese e virulência identificados na biblioteca diretamente por ontologia (CpN-1E02 e CpN-2F10), seriam presumivelmente homólogos a genes que codificam uma proteína alergênica do ascomiceto *Cochliobolus lunatus* (AAQ87930.1), e outra do basidiomiceto *Cryptococcus neoformans* (AAW41285.1). A proteína alergênica codificada de *Cochliobolus lunatus* (AAQ87930.1) é similar a Asp f13 de *Aspergillus fumigatus*, patógeno humano (Asp f13). Esta proteína está agrupada com demais já descritas para Ascomicetos fitopatogênicos, e tem uma constituição média de 120 aminoácidos, contendo 4 cisteínas, e são produzidas abundantemente *in vitro* (HALL et al., 1999; PAZZAGLI et al., 1999; SEIDL et al., 2006; REMENTERIA et al., 2005). A função geral desta classe no processo é desconhecida, mas

há evidências da sua participação na indução da reposta de defesa em *Platanus acerifolia* (PAZZAGLI et al., 1999), e na contribuição para adesão do fungo em superfícies ou células do hospedeiro (HALL et al., 1999). A outra proteína alergênica de *Cryptococcus neoformans* é uma mano-proteína constituintes de parede, caracterizada por induzir a resposta de defesa em humanos (HUANG et al., 2002). Homólogos desta proteína são encontrados no banco de dados do *Ustilago maydis*, um basidiomiceto fitopatogênico que induz crescimento anormal dos tecidos de *Zea mays* (BANUETT, 1995). Ambos os genes foram escolhidos para validação da expressão diferencial na condição de deficiência de N *in vitro* e em plantas inoculadas.

Os transcritos similares aquele codificante para a proteína alergênica Aspfl3-CpN, apesar de detectados em meios de cultivos completos (HALL et al., 1999; SEIDL et al., 2006), apresentam acúmulo sob estresse nutricional (SEIDL et al., 2006). O aumento da expressão de Aspfl3-CpN sugere a influência do status do N na sua regulação gênica. A detecção Aspfl3-CpN em plantas infectadas corrobora a participação deste tipo de proteína na patogênese de basidiomicetos, podendo a expressão do gene ao longo do tempo ser correlacionado com a colonização pelo fungo (descrito por FRIAS; PURDY; SCHMIDT, 1991) e com a mudança de fase biotrófica para necrotrófica (RENLIN et al., 1999). Na interação *Malva pusilla* e o fungo hemibiotrófico *Colletotricum gloeosporioides*, a baixa expressão do gene da Actina (Act A) nas primeira 96 h estaria associada ao crescimento lento da fase biotrófica, e o aumento da expressão correlacionaria com a mudança para fase necrotrófica, caracterizada pelo crescimento rápido (JIN et al., 1999). Até 120 h, a expressão do gene Aspfl3-CpN foi constante, caracterizando uma colonização lenta, que aumenta no período entre 120 e 240 h, típico de crescimento mais intenso. A relação com crescimento micelial é reforçada pela característica do produto do gene Aspfl3-CpN, associado com as paredes das hifas (BODDI et al., 2004). O gene 88KD-CpN foi menos expresso que o Aspfl3-CpN *in vitro* e nas plantas assintomáticas. Durante a colonização, a expressão decresce em relação a sua indução inicial e apesar de ser um constituinte da parede, há indícios da expressão não estar associada ao crescimento. Glicopeptídeos de fitopatógenos funcionam como indutores da resposta de defesa (BOLLER, 1995), e os glicopeptídeo ricos em manose apresentam duplicidade de função. Quando os oligassacarídeos encontram-se ligados a proteína, esta funciona com indutor da resposta; no entanto quando liberado da porção protéica funciona com repressor (BASSE et al. 1992). O padrão de expressão distinto dos dois genes presumíveis indutores da reposta da planta, pressupõe diferentes contribuições durante a

interação com *T. cacao* e os indícios de polimorfismo poderiam ser explorados no estudo de variabilidade no fungo. Os genes Aspfl3-CpN e 88KD-CpN apresentaram polimorfismo quando comparados com o banco de dados de seqüências genômicas da vassoura-de-bruxa (dados não mostrados), e a variação de temperatura na curva de dissociação (*melting*) dos fragmentos do gene 88KD-CpN das amostras de tecidos infectados e do fungo, indicam um polimorfismo na composição de nucleotídeos.

Os genes envolvidos no desenvolvimento da doença podem variar de acordo com o processo de infecção e a espécie do patógeno (IDNURM; HOWLLET, 2001). Assim para validação e estudo em plantas inoculadas foram escolhidos, além dos genes Aspfl3-CpN e 88KD-CpN, seis genes cujas famílias já foram relatadas com papel na interação planta-microrganismo. Os genes escolhidos foram o da Aril-sulfatase (AS-CpN, GOODWIN et al., 2000); Aldo-ceto redutase (AK-CpN, ITO et al., 2004); Aril-álcool oxidase (AAO-CpN; SEGERS et al., 2001); Citocromo P450 (P450-CpN, SIEWERS et al., 2006; MALONEY; VANETTEN, 1994); e Fenilalanina amônio-liase (PAL-CpN, NEHLS; ECKE; HAMPP et al., 1999). A cloroperoxidase foi o único escolhido sem critério pré-determinado. Destes genes avaliados, todos foram validados para expressão diferencial *in vitro*, a exceção Perox-CpN. Quatro foram detectados sendo expressos em tecidos de plantas infectadas (AS-CpN, P450-CpN, AK-CpN e PAL-CpN), validando-os como atuantes na fase de infecção e colonização na interação *C. pernicioso* e *T. cacao*.

A expressão do gene Aril-sulfatase foi utilizada como marca de deficiência de enxofre no cultivo *in vitro* *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* sendo reprimido na presença de enxofre e metionina (MARZLUF, 1997). Por ser o gene mais induzido no cultivo *in vitro* de *C. pernicioso* sugere que a quantidade de enxofre e metionina no meio não foram suficientes para a repressão do gene. A Aril-sulfatase de *Colletotrichum gloeosporioides* foi menos sensível a repressão causada pela presença de enxofre e metionina do que a de *Neurospora crassa* (GOODWIN et al., 2000; MARZLUF, 1997;), podendo o da *C. pernicioso* apresentar o mesmo comportamento, indicando similaridade na função fisiológica. A indução da Aril-sulfatase de *Colletotrichum gloeosporioides* também foi associada com a fase biotrófica na interação com *Malva pusilla* (GOODWIN et al., 2000), aumentando sua expressão com desenvolvimento da fase biotrófica e decrescendo com o início da fase necrotrófica, quando surgem os sintomas no hospedeiro (GOODWIN et al., 2000). No patossistema *C. pernicioso*-*T. cacao*, a indução do

gene AS-CpN e o seu maior acúmulo aconteceram no período assintomático, e seus transcritos não foram detectados após 240 h de inoculação. Portanto o gene homólogo presumível da Aril-sulfatase de *C. perniciosus* demonstrou o mesmo padrão de expressão que a do *C. gloeosporioides* durante sua interação com o hospedeiro. Esses dados sugerem que a mudança para fase necrotrófica em *C. perniciosus* pode estar acontecendo no período anterior a manifestação dos sintomas, antecipando o evento que aconteceria com a morte dos tecidos infectados. O gene AAO-CpN, apesar de ser expresso diferencialmente durante a restrição de N, não foi induzido nas plantas inoculadas assintomáticas. A participação deste gene ainda pode ser relacionada com a fase tardia do desenvolvimento da Vassoura-de-Bruxa, como em *Cladosporium fulvum* (SEGERS et al., 2001), necessitando ser avaliado em períodos mais avançados da doença, quando ocorre a transição de sintomas de vassoura verde para seca.

A regulação da expressão de genes homólogos presumíveis de P450-CpN, AK-CpN e PAL-CpN por estresse nutricional já foi relatada (ANDREWS et al., 2004; DODDAPANENI; YADAN, 2005; NEHLS; ECKE; HAMPP et al., 1999), e o presente trabalho demonstra a influência do N nessa regulação. A proteína/enzima resultante poderia proporcionar condição antioxidante *in vitro* (ANDREWS et al., 2004); apresentar ação desintoxicante (DODDAPANENI et al., 2006); participar na aquisição de nutrientes (NEHLS; ECKE; HAMPP et al., 1999); e/ou produção de toxinas e pigmentos (ITO et al., 2004; NEHLS; ECKE; HAMPP et al., 1999; SIEWERS et al., 2006). Na planta, os genes foram induzidos de forma interrupta com intervalo de 168 h, diferentemente dos genes Aspfl3-CpN, 88KD-CpN, indicando que outros fatores nutricionais (SOLOMON; TAN; OLIVER, 2003), e a própria interação com o hospedeiro poderia estar interferindo na regulação dos genes. O gene mais expresso com 48 h foi o P450-CpN, baseados na expressão do gene Aspfl3-CpN (Figura 4), dobrando seu acúmulo com 120 h, de acordo com o genes da actina de *T. cacao*. Genes da família Citocromo-P450 com função na interação planta-patógeno são responsáveis pela síntese de toxinas (SIEWERS et al., 2006), ou atuam como desintoxicador de fitoalexinas (MALONEY; VAN ETTEN, 1994). A produção de toxinas e hormônios poderia facilitar a colonização dos tecidos, alterando fisiologia do hospedeiro em favor do patógeno. Os genes AK-CpN e PAL-CpN poderiam estar atuando neste sentido na interação *C. perniciosus* e *T. cacao*. Em *Alternaria alternata*, o homólogo de Aldoceto redutase é essencial para produção da toxina (ITO et al., 2004), e produto do gene da Fenilalanina amônio-liase participa da síntese de compostos fenólicos (NEHLS; ECKE; HAMPP

et al., 1999). A indução precoce dos genes poderia estar contribuindo na indução das alterações celulares, que acontecem no início da infecção (SILVA; MATUSOKA, 1999), e tardia com a manifestação dos sintomas, quando a expressão é maior, reforçando a hipótese que os produtos desses genes estariam atuando como facilitador da colonização e com resultados na sintomatologia que aparece após 360 h.

A indução de seis genes em plantas suscetíveis inoculadas, dos sete genes diferencialmente expressos *in vitro* corrobora a hipótese que o estresse nutricional de N e patogênese compartilham em algum momento a mesma via de sinalização. A variação no perfil de expressão do gene Aspfl3-CpN e da Aril-sulfatase (AS-CpN) sugere que a mudança de fase do patógeno estaria acontecendo durante o período assintomático. A relação das fases do ciclo de vida do fungo, com a morte dos tecidos não está clara, já que em tecidos infectados, tem sido possível visualizar durante as primeiras alterações morfológicas, hifas intercelulares dicarióticas sem grampos de conexão, e ambas as fases em tecidos sintomáticos como vassouras verdes e secas (CALLE et al., 1982; SILVA; MATSUOKA, 1999). Os dados moleculares corroboram as descrições histológicas. A mudança de fase de *C. perniciosa* possivelmente ocorre ainda no período anterior a morte dos tecidos. Em contrapartida, a intensificação do metabolismo secundário pelo fungo, que o protege do ataque da planta e favorece a colonização do hospedeiro com provável participação na indução de sintomas.

3.3 Conclusões

A validação dos genes identificados na biblioteca SSH demonstra a influência do N no metabolismo de *C. perniciosa* e a existência de uma via de sinalização comum entre resposta ao estresse abiótico e a patogênese. A expressão dos genes identificados indica que a mudança de fase de *C. perniciosa* esta acontecendo antes da manifestação dos sintomas. Com provável atuação do metabolismo secundário na produção de substâncias que favoreçam a colonização dos tecidos e indução de sintomas. Além de prover genes candidatos para quantificação indireta de *C.perniciosa* em tecidos infectados de *T.cacao* e marcadores da fase biotrófica.

Referências

ANDEBRAHN, T.; ALMEIDA, L.C. DE; NAKAIAMA, L.H.I. Resistência de *Theobroma cacao* L. a *Crinipellis pernicios* (STAHEL) Singer: a experiência da Amazônia brasileira. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 10, n. 2, p. 49-60, maio 1998

ANDREWS, D.L.; GARCÍA-PEDRAJAS, M.D.; GOLD, S. Fungal dimorphism regulated gene expression in *Ustilago maydis*: I. Filament up-regulated genes. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 4, p. 281–293, July 2004.

ARRUDA, M.C.; MILLER, R.N.G.; FERREIRA, M.A.S.V.; FELIPE, M.S.S. Comparison of *Crinipellis pernicios* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 236-244, Apr. 2003.

BASSE, C.W.; BOCK, K.; BOLLER, T. Elicitors and suppressors of the defense response in tomato cells. Purification and characterization of glycopeptide elicitors and glycan suppressors generated by enzymatic cleavage of yeast invertase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, n. 15, p. 10258-10265, May 1992.

BASTOS, C.N.; ANDEBRHAN, T.; ALMEIDA, L.C. Comparação morfológica de isolados de *Crinipellis pernicios*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 202-206, 1988.

BANUETT, F. Genetics of *ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.29, p. 179-208, 1995.

BIRCH, P.R.J.; KAMOUN, S. Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions. In: WOOD, R (Ed.). **New technologies for life sciences: a trends guide**. New York: Elsevier Science, 2000. p. 77–82.

BODDI, S.; COMPARINI, C.; CALAMASSI, R.; PAZZAGLI, L.; CAPPUGI, G.; SCALA, A. Cerato-platanin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and hyphae of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. Platani. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 233, n. 2, p. 341–346, Apr. 2004.

BODDY, L.; WATKINSON, S.C. Wood decomposition, higher fungi, and their role in nutrient redistribution. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 1377–1383, 1995.

BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular**, Palo Alto, v. 46, n. , p. 189-214, June 1995.

BOWERS, J.H.; BAILEY, B.A.; HEBBAR, P.K.; SANOGO, S.; LUMSDEN, R.D. . The impact of plant diseases on world chocolate production. Disponivel em: < Plant Health Prog. 10.1094/PHP-2001-0709-01-RV (<http://www.apsnet.org/online/feature/cacao/> online)> Acesso em: 14 nov. 2006.

BRADSHAW, R.E.; BHATNAGAR, D.; GANLEY, R.J.; GILLMAN, C.J.; MONAHAN, B.J.; SECONI, J.M. *Dothistroma pini*, a forest pathogen, contains homologs of aflatoxin biosynthetic pathway genes.. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 6, p. 2885–2892, June 2002.

CALLE, H.; COOK, A.A.; FERNANDO, S.Y. Histology of witches' broom caused in cacao by *Crinipellis perniciosa*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 11, p.1479-1481, 1982.

CROAN, S.C.; KIM-YOUNG, H.; KIM, Y.H. Carpogenesis and basidiosporogenesis by *Flammulina velutipes*, *Schizophyllum commune* and *Trametes versicolor* in vitro. **Mater Org**, Berlin, v. 31, p. 1-16, 1997.

DELGADO, J.C.; COOK, A.A. Nuclear condition of the basidia basidiospore and mycelial of *Marasmius pernicius*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 54, p. 66-72, 1976.

DIVON, H.H.; ROTHAN-DENOYES, B.; DAVYDOV, O.; PIETRO, A.; FLUHR, R. Nitrogen-responsive genes are differentially regulated in planta during *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* infection. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 6, n. 4, p. 459–470, July 2005.

DODDAPANENI, H.; YADAV, J.S. Microarray-based global differential expression profiling of P450 monooxygenases and regulatory proteins for signal transduction pathways in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 274, n. 5, p. 454–466, Dec. 2005.

DONOFRIO, N.M.; LUNDY, R.; PAN, H.; BROWN, D.E; JEONG, J.S; COUGHLAN S.; MITCHELL, T.K.; DEAN, R.A. Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 43, n. 9, p. 605–617, Sept. 2006.

DUFRESNE, M.; PERFECT, S.; PELLIER, A.; BAILEY, J.A.; LANGIN, T. 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**, Rockville, v. 12, n. 9, p. 1579–1589, Sept. 2000.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Sprig Harbor, v. 8, n.3, p. 186–194, Mar. 1998.

FRIAS, G.A.;PURDY, L.H.; SCHMIDT, R.A.. Infection biology of *Crinipellis perniciosa* on vegetative flushes of cacao. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 75, n. 6, p. 552-556, 1991.

GESTEIRA, A.S.; MICHELI, F.; FERREIRA, C.F.; CASCARDO, J.M.C. Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis perniciosa*. **Biotechniques**, Natick, v. 35, n. 3, p. 494-496, Sept. 2003.

GILL, M. The Biosynthesis of Pigments in Basidiomycetes. **Australian Journal of Chemistry**, Melbourne, v. 54, n. 12, p. 721–734, 2001.

GOODWIN, P.H.; LI, J.; JIN, S. Evidence for sulfate derepression of an arylsulfatase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* during infection of round-leaved mallow, *Malva pusilla*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 4, p.169-176, Oct. 2000.

GRIFFITH, G.W.; HEDGER, J.N. A novel method for producing basidiocarps of the cocoa pathogen *Crinipellis perniciosus* using a bran-vermiculite medium. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 99, n. 4, p. 227-230, July 1993.

GRIFFITH, G.W.; HEDGER, J.N. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosus*. **Heredity**, London, v. 71, n. 3, p. 278-289, 1994.

GRIFFITH, G.W.; NICHOLSON, J.; NENNINGER, A.; BIRCH, R.N.; HEDGER, J.N. Witches' broom and frosty pods in cacao. **New Zealand Journal of Botany**, Wellington, v. 41, p. 423–435, 2003.

GUILLEROUX, M.; OSBOURN, A. Gene expression during infection of wheat roots by the 'take-all' fungus *Gaeumannomyces graminis*. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 5, n. 3, p. 203-216, May 2004.

HALL, N.; KEON, J.P.R.; HARGREAVES, J.A. A homologue of a gene implicated in the virulence of human fungal diseases is present in a plant fungal pathogen and is expressed during infection. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 1, p. 69-73, July 1999.

HEDGER, J.N.; PICKERING, V. Variability of population of the witch's broom disease of cocoa (*Crinipellis perniciosus*). **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 88, p. 533-546, 1987.

HUANG, C.; NONG, S.; MANSOUR, M.K.; SPECHT, C.A.; LEVITZ, S.M. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-Cell responses. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 10, p. 5485–5493, Oct. 2002.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 9, n. 9, p. 868-877, Sept. 1999.

IDNURM, A, HOWLETT, BJ. . Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, n. 4, p. 241–255, July 2001.

JONG, E.; FIELD, J.A.; BONT, J.A.M. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p. 153-188, 1994.

ITO, K.; TANAKA, T.; HATTA, R.; YAMAMOTO, M.; AKIMITSU, K.; TSUGE, T. Dissection of the host range of the fungal plant pathogen *Alternaria alternata* by modification of secondary metabolism. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 52, n. 2, p. 399–411, Apr. 2004.

JIN, S.; XU, R.; WEI, Y.; GOODWIN, P.H. Increased expression of a plant actin gene during a biotrophic interaction between round-leaved mallow, *Malva pusilla*, and *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*. **Planta**, Berlin, v. 209, n. 4, p. 487-494, Oct. 1999.

KEYSER, P.; KIRK, T.K.; ZEIKUS, J.G. Ligninolytic Enzyme System of *Phanerochaete chrysosporium*: Synthesized in the Absence of Lignin in Response to Nitrogen Starvation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 135, n. 3, p. 790-797, Sept. 1978.

KRUGER, W.M.; PRITSCH, C.; CHAO, S.; MUEHLBAUER, G.J. Functional and comparative bioinformatic analysis of expressed genes from wheat spikes infected with *Fusarium graminearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 5, p. 445-455. May 2002.

KILARU, A.; HASENSTEIN, K.H. Development and pathogenicity of the fungus *crinipellis perniciosus* on interaction with cacao leaves. **Biochemistry And Cell Biology**, Palo Alto, v. 95, n. 1, p. 101-107, Jan. 2005.

KRUPASAGAR, V.; SEQUEIRA, L. Auxin destruction by *Marasmius perniciosus*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 56, n. 4, p. 390-397, 1969.

LIVAK, K.L.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

MALONEY, A.P., VANETTEN, H.D. A gene from the fungal plant pathogen *Nectria haematococca* that encodes the phytoalexin detoxifying enzyme pisatin demethylase defines a new cytochrome P450 family. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 243, n. 5, p. 506–514, June 1994.

MARZLUF G.A. Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous fungi and yeast. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 51, p. 73-96, 1997.

MEINHARDT, L.W.; BELLATO, C.M.; RINCONES, J.; AZEVEDO, R.A.; CASCARDO, J.C.M.; PEREIRA, G.A.G. In Vitro Production of Biotrophic-Like Cultures of *Crinipellis perniciosus*, the Causal Agent of Witche's-Broom Disease of *Theobroma cacao*. **Current Microbiology**, New York, v. 52, n. 3, p. 191–196, Mar. 2006.

MURAGUCHI, H.; KAMADA, T. The *ich1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for pileus formation in fruiting. **Development**, Cambridge, v. 125, n. 16, p. 3133-3141, Aug. 1998.

MURAGUCHI, H.; KAMADA, T. A mutation in the *eln2* gene encoding a cytochrome p450 of *coprinus cinereus* affects mushroom morphogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 29, n. 1, p. 49–59, Feb. 2000.

MUSE, R.B.; COLLIN, H.A.; ISAAC, S.; HARDWICK, K. Effects of the fungus *Crinipellis perniciosus*, causal agent of witches broom disease, on cell and tissue cultures of cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Plant Pathology**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 145-154, 1996.

NEHLS, U.; ECKE, M.; HAMPP, R. Sugar-and Nitrogen-dependent regulation of an *amanita muscaria* phenylalanine ammonium lyase gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 6, p. 1931–1933, Mar. 1999.

PAZZAGLI, L.; CAPPUGI, G.; MANAO, G.; CAMICI, G.; SANTINI, A.; SCALA, A. Purification, characterization, and amino acid sequence of cerato-platanin, a new phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 35 p. 24959–24964, Aug. 1999.

PERES FILHO, ASA. . Agronegócio brasileiro; ciência, tecnologia e competitividade. In: ARAÚJO, C (Ed). **Cadeia produtiva do cacau**. Brasília: CNPQ, 1998. p. 275, 1998.

PIETERSE, C.M.J.; DERKSEN, A.M.E.; FOLDERS, J.; GOVERS, F. Expression of the putative pathogenicity genes ipiB and ipiO of *Phytophthora infestans* in planta and in vitro. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 244,n. 3, 269–277, Aug. 1994.

PURDY, L.H.; SCHIMDT, R.A. Status of cacao witches broom: Biology, Epidemiology, and management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, p. 573-594, 1996.

REMENTERIA, A.; LÓPEZ-MOLINA, N.; LUDWIG, A.; VIVANCO, A.B.; BIKANDI, J.; PONTÓN, J.; GARAIZAR, J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 22, n. 1, p. 1-23, Mar. 2005.

SEGERS, G, BRADSHAW, N, ARCHER, D, BLISSETT, K, OLIVER, RP. Alcohol oxidase is a novel pathogenicity factor for *Cladosporium fulvum*, but aldehyde dehydrogenase is dispensable. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.14, n. 3, p. 367–377, Mar. 2001.

SEIDL, V.; MARCHETTI, M.; SCHANDL, R.; ALLMAIER, A.; KUBICEK, C.P. Epl1, the major secreted protein of *Hypocrea atroviridis* on glucose, is a member of a strongly conserved protein family comprising plant defense response elicitors. **FEBS Journal**, Oxford, v. 273, n. 18, p. 4346–4359, Sept. 2006.

SIEWERS, V.; VIAUD, M.; JIMENEZ-TEJA, D.; COLLADO, I.G.; GRONOVER, C.S.; PRADIER J.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P. Functional analysis of the cytochrome p450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, n. 6, p. 602–612, June 2006.

SILVA, S.D.V.M.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Crinipellis perniciosa* em cacaueiros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 54-59, Mar. 1999.

SNOEIJERS, S.S.; PEREZ-GARÇIA, A.; JOOSTEN, M.H.A.J.; WIT, P.J.G.M. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, n. 6, p. 493–506, July 2000.

SOANES, D.M.; TALBOT, N.J. Comparative genomic analysis of phytopathogenic fungi using expressed sequence tag (EST) collections. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 7, n. 1, p. 61–70, Jan. 2006.

SOLOMON, P.S.; TAN, K.C.; OLIVER, R.P. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, n. 3, p. 203–210, May 2003.

TALBOT, N.J., MCCAFFERTY, H.R.K., MA, M., MOORE, K. AND HAMER, J.E. .Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, n. 3, p.179–195, Mar. 1997.

TODD, R.B.; ANDRIANOPOULOS, A. Evolution of a fungal regulatory gene family: the zn(ii)2cys6 binuclear cluster DNA binding motif. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 21, n. 3, p. 388–405, June 1997.

TRAIL, F.; XU, J.R.; MIGUEL, P.S; HALGREN, R.G.; KISTLER, H.C. Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, n. 2, p. 187–197, Mar. 2003.

VAN DEN ACKERVEKEN, G.F.J.M.; DUNN, R.M.; COZIJNSEN, T.J.; VOSSEN P.; VAN DEN BROEK, H.W.J.; DE WIT, P.J.G.M. Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *Avr9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 243, n. 3, p. 277–285, May 1994.

VERICA, J.A.; MAXIMOVA, S.N.; STREM, M.D.; CARLSON, J.E.; BAILEY, B.A.; GUILTINAN, M.J. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 6, p. 404–413, Nov. 2004.

WHEELER, BEJ, MEPSTED, R. Pathogenic variability amongst isolates of *Crinipellis pernicios* from cocoa (*Theobroma cacao*). **Plant Pathology**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 475-488, Dec. 1988.

WHEELER, B.E.J. The growth of *Crinipellis pernicios* in living and dead cocoa tissue, In: In: MOORE, D.; CASSELTON, L.A.; WOOD, D.A.; FRANKLAND, J.C. (Ed.). **Developmental biology of higher fungi**. Cambridge: Cambridge University, 1985. p. 103-116.

YU, J.H.; KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 437–458, 2005.

APÊNDICES

Apêndice A - Iniciadores utilizados na reação de RT-PCR quantitativo.

(continua)

Nome do Gene	Gene	Acesso NCBI ou TIGR	Sequência dos Iniciadores	
			<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
Actin	Actina	TC 46	TCCTCTTCCAGCCATCTCTC	TCTCCTTGCTCATTCCGGTCT
LRP-ICS	Proteína transmembrana rica com regiões repetidas de Leucina	BAD94141.1	ATTGCCGATTTTGGACTTG	CATCACTCTTCTCGTTGACTTTG
WD,40-ICS	Proteína com região repetida WD-40	AAN15676.1	CTCTTCTTGGGATGGGGATG	AGGGGCTGCTACATAAACGA
ERF-ICS	Fator de resposta ao etileno (ERF1)	AAT77192.1	TGAGCAAACCAGAGCAGGA	CCCAGCCAAAGTCAGAACA
NAM-ICS	Proteína da família 'No apical meristem' (NAM),	At5g13180.1	CAACTACTGCTTTCTTCGTGGT	GCCTGTTTTCTATGATTTCTGA C
SVP-ICS	Fator de transcrição MADbox	AAR92206.1	CTGTGTGATGCTGATGTTGCT	TTGTTGCGATTGTTGGAGTG
Hev-ICS	Heveína	AAT67050.1	ATGGGAACGGCATCAAACA	AAGTGGGAAGCCTAACTTTGTA G

Apêndice A - Iniciadores utilizados na reação de RT-PCR quantitativo.

(continuação)

Nome do Gene	Gene	Acesso NCBI ou TIGR	Sequência dos Iniciadores	
			<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
Perox-ICS	Peroxidase	AAR31106.1	AAGGGTCTCCTCCATTCTGAC	CTTGATGTCGCCCATTTTG
Quit-ICS	Quitinase classe I	AAQ56599.1	CGATGTGGAGGTGGATGAC	AGGTAGTGGGAGACGATGTTG
Tau-ICS	Proteína relacionada com a patogense-Taumatina	AAD55090.1	GGTGTCTGATTCTTACAGTTATC C	CACTCTTGGCTCTTGCTTCC
LD-ICS	Leuco-antocianidina Dioxigenase	-	ACTCAGGGGACAGAGAGGTG	CGGGATACACAAGATGGAAGA
CistProt-ICS	Cisteine Proteinase	At1g47128.1	CACTTGCTGTGACGACCACTAC	CTGTCTTTCATCCTCCCTTT
ATS.3-ICS	Proteína 3 relacionada com embrião de semetne (ATS3)	At2g41470.1	TGGATGGAAACCAGAGAGTG	CAAGAAATCACAGCAGCAAAA
C.P450-ICS	Citocromo P450	AAM61354.1	CTCAGGCGACACCCTCCA	GTCCACACCAACCCCATC

Apêndice A - Iniciadores utilizados na reação de RT-PCR quantitativo.

(continuação)

Nome do Gene	Gene	Acesso NCBI ou TIGR	Sequência dos Iniciadores	
			<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
LRP-CAB	Proteína transmembrana rica de regiões repetidas de leucina	AAB65490.1	ATGAGGGAAGTTTTAAAGATGATT AGA	GGACAGTGTCCGACCACCT
LRP.2-CAB	Proteína transmembrana rica de regiões repetidas de leucina	NP_175397.1	ACTATTTCACTCAGGTTGGTCCT	CGCACTCATCTTTTGATTTTTG
Gluc-CAB	Beta-1,3-glucanase	AAM47584	AACACTGCTTGGAGGATTGG	CCTTCAAATGGTGGTTGCT
Perox-CAB	Peroxidase 12	BAA01950	TGGAAGAGGAAGTGGAGGAG	GACACAAAGAAAGGGAGAAGCA
AR-CAB	Antocianidina redutase	CAD91910.1	CTGAAAAGGCAGCATGGAA	AAAGCAAAGATGTGGCAAGG
Caffei-CAB	Cafeína sintase	BAE79730.1	TTTCAGAGCCCGTTTTGTCT	TGCTTCTTTTCCCTGCTTGT
USP-CAB	Proteína desconhecida	BAA94980.1	CTCTGCAAGCAGCAAGAATG	TTCATGACAACGGGATCAGA

Apêndice A - Iniciadores utilizados na reação de RT-PCR quantitativo.

(conclusão)

Nome do Gene	Gene	Acesso NCBI ou TIGR	Sequência dos Iniciadores	
			<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
EIG.7-CAB	Proteína EIG-J7 induzida por elicitor	XP_467841.1	AGTTTACGGTGGAGCAATGG	ACTTCCGATCACTCCGATCA
EH-CAB	Epoxi-Hidrolase	AAB02006.1	TGTTGAGGAAGGAAATGATGAG	TGGCAAAATTAAGGAGTCTGTG
Cel-CAB	celulase	TC113	CTGATGCCTTGAGAGGGAAG	CCACGAAATCCAAAGAGACTT

Apêndice B - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de material suscetível (ICS 39) e resistentes inoculados (CAB 214) foram submetidos ao banco TAIR, NCBI e TIGR. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional.

(continua)

Anotação^a	Valor <i>E</i>^b	TAIR^c	NCBI/TIGR^c	Biblioteca
Resposta a estímulos bióticos e abióticos				
Quitinases classe VII	5×10^{-54}	At1g05850.1	AAP80801.1	ICS 39
Quitinases classe I	$1,2 \times 10^{-42}$	At3g16920.1	AAQ56599.1	ICS 39
Endo-quitinase classe III	5×10^{-37}	TC101	-	ICS 39
Proteína tipo Heveina (HEL)	$1,5 \times 10^{-7}$	At3g04720.1	AAT67050.1	ICS 39
Taumatina	$7,5 \times 10^{-6}$	At1g20030.1	AAD55090.1	ICS 39
Peroxidase	$3,3 \times 10^{-16}$	At5g58390.1	AAR31106.1	ICS 39
Família de proteínas similar a alergênica Bet v I	9×10^{-34}	At1g70850.1	CAC83579.1	ICS 39
Proteína de transferência de lipídeo (LTP3)	$1,2 \times 10^{-23}$	At5g59320.1	AAF35186.1	ICS 39
Lacase	$8,0 \times 10^{-38}$	At5g60020	AAU95426.1	ICS 39
Proteína 'Heat shock' com 70 kDa	$3,5 \times 10^{-6}$	At3g12580.1	NP_915417.1	ICS 39
Proteína 'Heat shock' com 31,2 kDa	$1,3 \times 10^{-29}$	At1g06460.1	-	ICS 39
Proteína abundante na fase tardia da embriogenesese	$2,0 \times 10^{-5}$	-	T09877	ICS 39
Proteína abundante na fase tardia na embriogenesese	$2,0 \times 10^{-5}$	-	T09878	ICS 39
Proteína abundante na fase tardia na embriogenesese	$2,0 \times 10^{-5}$	-	T09879	ICS 39
Metalotioneina tipo 2	$2,0 \times 10^{-5}$	-	CAC39481.2	ICS 39
Metalotioneina tipo 2	8×10^{-4}	At3g09390.1	-	ICS 39

Apêndice B - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de material suscetível (ICS 39) e resistentes inoculados (CAB 214) foram submetidos ao banco TAIR, NCBI e TIGR. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional.

Anotação ^a	Valor <i>E</i> ^b	TAIR ^c	NCBI/TIGR ^c	(continuação)
				Biblioteca
Metalotioneína tipo 2	2,1 x 10 ⁻³⁹	TC9	-	ICS 39
Metalotioneína tipo 2	2,3 x 10 ⁻⁵¹	At3g09390.1	-	ICS 39
Metalotioneína tipo 2	2,3 x 10 ⁻⁴⁸	TC9	-	ICS 39
Proteína 'Blue copper'	6,6 x 10 ⁻¹⁰	At1g72230.1	BAD37230.1	ICS 39
Calmodulina (CAM5)	7,6 x 10 ⁻⁴⁴	At2g27030.3	NP_850097.1	ICS 39
Ca ²⁺ -ATPase	4,4 x 10 ⁻⁴⁹	At1g07810.1	CAA70946.1	ICS 39
Beta-1,3-glucanase	1,8 x 10 ⁻¹⁷	At1g18650.1	AAM47584	CAB 214
Proteína de semente com 21 kDa	2 x 10 ⁻⁴	At1g17860.1	CAA39860.1	CAB 214
Proteína de semente com 21 kDa	1,2 x 10 ⁻¹⁷	TC1	-	CAB 214
Peroxidase 12	6,7 x 10 ⁻¹³	At1g71695.1	BAA01950	CAB 214
Endoquitinase ácida (CHIB1)	6,7 x 10 ⁻⁴⁴	At5g24090.1	BAC65326.1	CAB 214
Endoquitinase ácida (CHIB1)	1,6 x 10 ⁻²⁰	At5g24090.1	-	CAB 214
Endoquitinase ácida (CHIB1)	1,8 x 10 ⁻²⁰	At5g24090.1	BAA96445.1	CAB 214
Proteína de transferência de lipídeo	1 x 10 ⁻⁴⁵	TC98	-	CAB 214
Celulase	5,4 x 10 ⁻⁵⁷	TC113	-	CAB 214
Proteína da família 'Disease resistance-responsive'	6,9 x 10 ⁻¹⁴	At1g65870.1	AAZ20288.1	CAB 214
Proteína 'Heat shock' cognata com de 80 kDa	3,4 x 10 ⁻³⁶	At5g56030.1	P36181	CAB 214

Apêndice B - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de material suscetível (ICS 39) e resistentes inoculados (CAB 214) foram submetidos ao banco TAIR, NCBI e TIGR. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional.

				(continuação)
Anotação^a	Valor <i>E</i>^b	TAIR^c	NCBI/TIGR^c	Biblioteca
Proteína 'Heat shock' com 15,7 kDa	$3,8 \times 10^{-14}$	At5g37670.1	BAC43412.1	CAB 214
Fator de homeotase de cobre	$8,6 \times 10^{-30}$	At1g66240.1	AAT12488.1	CAB 214
Proteína universal de estresse (USP)	$2,7 \times 10^{-26}$	At3g17020.1	BAA94980.1	CAB 214
Energia				
Citocromo P450	$1,4 \times 10^{-57}$	At1g11600.1	AAM61354.1	ICS 39
Precursor da proteína do cloroplasto (OEE1)	$6,0 \times 10^{-15}$	TC85	-	ICS 39
Proteína do Fotossistema II	$2,5 \times 10^{-25}$	At1g06680.1	BAD83567.1	ICS 39
Fosfoproteína de 10kDa	$1,4 \times 10^{-22}$	AtCg00710	CAA73768.1	ICS 39
Proteína de acoplamento a Clorofila A-B	1×10^{-34}	At2g34420.1	BAA25395.1	ICS 39
Proteína de acoplamento a Clorofila A-B	$5,8 \times 10^{-18}$	TC541	-	ICS 39
Proteína de acoplamento a Clorofila A-B	$3,2 \times 10^{-21}$	At3g61470.1	T09838	ICS 39
Proteína de acoplamento a Clorofila A-B	$1,0 \times 10^{-21}$	CAA57492.1	CAA57492.1	ICS 39
Subunidade da NADH desidrogenase	$7,7 \times 10^{-59}$	AtCg00420	CAF28596.1	CAB 214
Proteína da família LYR	$2,8 \times 10^{-51}$	At4g34700.1	AAM63041.1	CAB 214
Ubiquinol-citocromo C redutase	$3,6 \times 10^{-28}$	At3g52730.1	AAN15706.1	CAB 214
Citocromo b5	$7,3 \times 10^{-14}$	At2g32720.1	AAN15404.1	CAB 214
Citocromo P450	$1,5 \times 10^{-42}$	At1g11600.1	AAM61354.1	CAB 214

Apêndice B - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de material suscetível (ICS 39) e resistentes inoculados (CAB 214) foram submetidos ao banco TAIR, NCBI e TIGR. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional.

				(continuação)
Anotação^a	Valor <i>E</i>^b	TAIR^c	NCBI/TIGR^c	Biblioteca
Provável proteína de Membrana	1,1 x 10 ⁻²⁶	At2g34250.1	AAF18411.1	CAB 214
Proteína de acoplamento a Clorofila A-B	2,4 x 10 ⁻³⁹	At5g28450.1	NP_198197.1	CAB 214
Proteína de acoplamento a Clorofila A-B	4,4 x 10 ⁻²⁹	At5g28450.1	CAA57492	CAB 214
Proteína de acoplamento a Clorofila A-B	6,7 x 10 ⁻³⁹	At2g34420.2	NP_916688.1	CAB 214
Proteína de acoplamento a Clorofila A-B	2,9 x 10 ⁻³³	At3g54890.1	AAA34140.1	CAB 214
Metabolismo				
Frutose-bisfosfato aldolase	7,2 x 10 ⁻²⁸	At2g36460.1	AAM61668.1	ICS 39
Álcool desidrogenase (ADH)	2,5 x 10 ⁻⁴	At1g77120.1	AAF04851.1	ICS 39
Álcool desidrogenase	4,0 x 10 ⁻⁸		AAF04851.1	ICS 39
Malato desidrogenase [NAD]	3,9 x 10 ⁻⁵²	At1g53240.1	AAM64855.1	ICS 39
Glicosil hidrolase da família 9	3 x 10 ⁻³¹	At2g32990.1	AAP68324.1	ICS 39
1-4-Beta-mano endohidrolase	1,3 x 10 ⁻¹⁷	At5g66460.1	AAP49511.1	ICS 39
Proteína similar a Galactoquinase	3,1 x 10 ⁻¹⁸	At4g16130.1	CAB10392.1	ICS 39
Ribulose 1 5-bisfosfate carboxilase	8,4 x 10 ⁻⁴²	TC27	-	ICS 39
UTP--glucose-1-fosfato uridilil transferase	1,2 x 10 ⁻⁸	At3g03250.1	AAL33919.1	ICS 39
Lipase da classe 3	4,6 x 10 ⁻²⁶	At2g05260.1	XP_464982.1	ICS 39
Lipase da classe 3	1 x 10 ⁻¹⁸	At1g56630.1	XP_467967.1	ICS 39

Apêndice B - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de material suscetível (ICS 39) e resistentes inoculados (CAB 214) foram submetidos ao banco TAIR, NCBI e TIGR. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional.

Anotação ^a	Valor <i>E</i> ^b	TAIR ^c	NCBI/TIGR ^c	(continuação)
				Biblioteca
Proteína contendo domínio ACT	2×10^{-54}	At5g04740.1	AAT02642	ICS 39
Antocianidina sintase	$8,0 \times 10^{-66}$	At4g22880.1	AAU12369.1	ICS 39
Glicosil transferase NTGT2	$8,0 \times 10^{-6}$	-	BAB88935.1	ICS 39
Glicosil transferase NTGT2	2×10^{-14}	-	BAB88935.1	ICS 39
Betaina-aldeído desidrogenase	$1,5 \times 10^{-46}$	At3g48170.1	AAR23816.2	ICS 39
Provável álcool desidrogenase	$8,1 \times 10^{-37}$	TC690	-	CAB 214
Sucrose sintase	$3,8 \times 10^{-64}$	At5g20830.1	BAA88905.1	CAB 214
Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	$4,6 \times 10^{-10}$	TC255	-	CAB 214
Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase	$1,5 \times 10^{-12}$	At3g04120.1	CAA42904.1	CAB 214
Aldolase fructose bisfosfato	$3,2 \times 10^{-41}$	At3g52930.1	CAB77243.2	CAB 214
Proteína Glicosil hidrolase da família 1	$5,4 \times 10^{-23}$	At3g18080.1	AAM61427.1	CAB 214
Provável calmodulia que se liga a uma proteína 'Heat-shock'	$1,5 \times 10^{-7}$	At3g49050.1	AAP40348.1	CAB 214
Chalcona sintase	$8,8 \times 10^{-26}$	At5g13930.1	CAA36317.1	CAB 214
Chalcona sintase	3×10^{-106}	At5g13930.1	AAB72091.1	CAB 214
Proteína da família das Chalcona sintase	$1,3 \times 10^{-34}$	TC128	-	CAB 214

Apêndice B - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de material suscetível (ICS 39) e resistentes inoculados (CAB 214) foram submetidos ao banco TAIR, NCBI e TIGR. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional.

				(continuação)
Anotação^a	Valor <i>E</i>^b	TAIR^c	NCBI/TIGR^c	Biblioteca
Proteína da família das Chalcona-flavanona isomerase	5,1 x 10 ⁻⁴⁴	At5g05270.2	AAM65565.1	CAB 214
Proteína da família das Chalcona-flavanona isomerase	2,8 x 10 ⁻⁴⁹	At5g05270.2	AAT94362.1	CAB 214
Proteína da família das Chalcona-flavanona isomerase	6,7 x 10 ⁻⁵¹	At5g05270.2	AAT94362.1	CAB 214
Antocianidina redutase	1,0 x 10 ⁻⁴⁰	-	CAD91910.1	CAB 214
Flavonoide 3-O-glicosil transferase	7,2 x 10 ⁻³⁹	At5g17050.1	BAB41022.1	CAB 214
Proteína contendo domínio GRAM	8,1 x 10 ⁻⁸	At1g02120.1	NP_171714.1	CAB 214
Formate--tetrahydrofolate ligase	1,1 x 10 ⁻²⁵	At1g50480.1	P28723	CAB 214
Geranilgeranil redutase	3,5 x 10 ⁻¹¹	At1g74470.1	AAY52460.1	CAB 214
Epoxi hidrolase	7,7 x 10 ⁻⁹	At3g51000.1	AAB02006.1	CAB 214
Cafeína sintase	2,2 x 10 ⁻⁸	At4g36470.1	-	CAB 214
Metabolismo de Proteínas				
Proteína L26 ribossomal 60S	2,5 x 10 ⁻⁴⁹	At3g49910.1	At3g49910.1	ICS 39
Proteína L9 Ribossomal 60S	1,8 x 10 ⁻³⁶	At1g33140.1	AAK00376.1	ICS 39
Fator de translação de eucariotos	2,1 x 10 ⁻⁴⁴	At5g54940.2	AAM77753.1	ICS 39
Histidil-tRNA sintetase	9,1 x 10 ⁻⁰⁶	At3g02760.1	AAD10242.1	ICS 39
Fosfatidilinositol 3-e 4-quinase	1 x 10 ⁻⁵⁰	At2g46500.2	AAM15268.1	ICS 39
Homologo da ubiquitina	8,4 x 10 ⁻³⁹	TC138		ICS 39

Apêndice B - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de material suscetível (ICS 39) e resistentes inoculados (CAB 214) foram submetidos ao banco TAIR, NCBI e TIGR. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional.

				(continuação)
Anotação^a	Valor <i>E</i>^b	TAIR^c	NCBI/TIGR^c	Biblioteca
Cisteína proteínase (RD21A)	6,1 x 10 ⁻²⁷	At1g47128.1	AAX84673.1	ICS 39
Cisteína proteínase	6 x 10 ⁻³⁶	At3g45310.1	AAB97142.1	ICS 39
Proteína da família das ATPase do tipo AAA	2,9 x 10 ⁻⁸	At2g18190.1	AAD31347.1	ICS 39
Proteína S15 Ribossomal 40S	1,6 x 10 ⁻²³	At5g09510.1	AAP44665.1	CAB 214
Proteína S17 Ribossomal 40S protein S17	4,2 x 10 ⁻⁵⁹	TC204	-	CAB 214
Proteína S1940S Ribossomal 40S	2,3 x 10 ⁻²⁹	At5g61170.1	AAQ65147.1	CAB 214
Proteína L13A Ribossomal 60S	5,7 x 10 ⁻²⁵	At5g48760.1	AAM65734.	CAB 214
Proteína L15 Ribossomal 60S	2,6 x 10 ⁻³⁹	At4g16720.1	AAM64649.1	CAB 214
Proteína L27 Ribossomal 60S	8,2 x 10 ⁻³⁰	At4g15000.1	AAM62713.1	CAB 214
Proteína L 13a ribossomal 60S	5,4 x 10 ⁻²²	At5g48760.1	AAM65734.1	CAB 214
Proteína L27a Ribossomal 60S	2,6 x 10 ⁻¹¹	At1g70600.1	AAD13388.1	CAB 214
Provável enzima de conjugação da ubiquitina	1,9 x 10 ⁻⁵⁰		XP_468586.1	CAB 214
Enzima de conjugação da ubiquitina	3,2 x 10 ⁻²⁶	At3g57870.1	AAB63513.1	CAB 214
Protease específica da ubiquitina (UBP3)	5,3 x 10 ⁻¹⁶	At4g39910.1	CAB80654.1	CAB 214
Enzima de conjugação da ubiquitina (E2)	9,4 x 10 ⁻¹²	At2g36060.1		CAB 214
SKP1	1,6 x 10 ⁻⁶⁴	At5g42190.1	AAD34458.1	CAB 214
Subunidade beta do Proteossoma 20S	2,6 x 10 ⁻³¹	At1g13060.1	AAL26914.1	CAB 214

Apêndice B - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de material suscetível (ICS 39) e resistentes inoculados (CAB 214) foram submetidos ao banco TAIR, NCBI e TIGR. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional.

(continuação)				
Anotação^a	Valor <i>E</i>^b	TAIR^c	NCBI/TIGR^c	Biblioteca
Subunidade do complexo regulatório da Protease 26S	1,3 x 10 ⁻⁰⁷	At2g20140.1	NP_910447.1	CAB 214
Ciclofilina	8,2 x 10 ⁻¹¹	At2g29960.1	AAM63088.1	CAB 214
Proteinase aspartica	3,6 x 10 ⁻³⁶	At1g62290.1	CAC86003.1	CAB 214
Organização celular, biogenese e desenvolvimento				
Cafeoil-CoA 3-O-metiltransferase	1,8 x 10 ⁻¹⁶	At4g34050.2	AAN78178.1	CAB 214
Expansina (EXP1)	2,2 x 10 ⁻¹⁸	At1g69530.2	CAD33923.1	ICS 39
Proteína contendo domínio Rhodanese	2,9 x 10 ⁻⁸	At4g27700.1	BAD33770.1	ICS 39
Proteína da família 'No apical meristem' (NAM)	2,3 x 10 ⁻⁴	At5g13180.1	-	ICS 39
Alfa Tubulina 2	8,5 x 10 ⁻⁸⁹	TC24	-	CAB 214
Alfa Tubulina 6 (TUA6)	2,4 x 10 ⁻⁵³	At4g14960.2	At4g14960.2	CAB 214
Beta Tubulina 5 (TUB5)	1,9 x 10 ⁻⁰⁹	At1g20010.1	AAQ92666.1	CAB 214
Beta Tubulina 5 (TUB5) ,	7,3 x 10 ⁻¹²	At1g20010.1	XP_542786.1	CAB 214
Proteína associada ao microtubulo	8,8 x 10 ⁻²⁵	At5g55230.1	At5g55230.1	CAB 214
Expansina	2,4 x 10 ⁻⁴⁵	At1g69530.3	AAM46999.1	CAB 214
Transdução de sinal				
Proteína transmembrana rica em regiões repetida de Leucina	1,3 x 10 ⁻⁴⁶	At1g09970.1	BAD94141.1	ICS 39
Proteína contendo domínio C2	2,5 x 10 ⁻¹¹	At4g34150.1	AAN31905.1	ICS 39

Apêndice B - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de material suscetível (ICS 39) e resistentes inoculados (CAB 214) foram submetidos ao banco TAIR, NCBI e TIGR. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional.

Anotação ^a	Valor <i>E</i> ^b	TAIR ^c	NCBI/TIGR ^c	(continuação)
				Biblioteca
RabGAP/TBC	6×10^{-22}	At3g49350.1	ABE88406	ICS 39
Proteína do tipo Serina/Treonina quinase (MHK)	$8,9 \times 10^{-20}$	At4g13020.2	CAB78344.1	ICS 39
Proteína da família das quinase	$1,6 \times 10^{-9}$	At1g70520.1	BAC43506.1	ICS 39
Família de proteína rica em regiões repetidas de leucina	$1,7 \times 10^{-09}$	At1g60630.1	AAB65490	CAB 214
Família de proteína rica em regiões repetidas de leucina	$3,3 \times 10^{-18}$	At1g49750.1	NP_175397.1	CAB 214
PRKF 1	$4,4 \times 10^{-04}$	At5g58950.1	CAA66149.1	CAB 214
Fosfatase 2C	$2,4 \times 10^{-69}$	At4g38520.2	CAB90634.1	CAB 214
<i>Similar EF-hand calcium binding</i>	7×10^{-92}	At5g04170.1	-	CAB 214
<i>Similar EF-hand calcium binding</i>	2×10^{-89}	TC435	-	CAB 214
Metabolismo de DNA e RNA				
Proteína ligante ao Oligouridilate	$1,5 \times 10^{-27}$	At3g14100.1	AAM65229.1	ICS 39
G/HBF-1	$4,0 \times 10^{-5}$	-	CAA71687.1	ICS 39
Fator de transcrição MADbox	$6,00 \times 10^{-43}$	-	AAR92206.1	ICS 39
Fator de reposta ao etileno (ERF1)	$5,00 \times 10^{-58}$	-	AAT77192.1	ICS 39
Histona H2A	$2,0 \times 10^{-27}$	AAT08680.1	AAT08680.1	CAB 214
Histona H2A	$7,3 \times 10^{-21}$	At5g02560.1	AAF65769.1	CAB 214

Apêndice B - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de material suscetível (ICS 39) e resistentes inoculados (CAB 214) foram submetidos ao banco TAIR, NCBI e TIGR. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional.

				(continuação)
Anotação^a	Valor <i>E</i>^b	TAIR^c	NCBI/TIGR^c	Biblioteca
Histona H2B	1,5 x 10 ⁻¹⁷	At5g02570.1	AAQ65121.1	CAB 214
Histona H3	3,3 x 10 ⁻¹⁸	At5g10980.1	AAR06361.1	CAB 214
Histona H3	3,2 x 10 ⁻²⁷	At5g65360.1	XP_320336.2	CAB 214
Provável snRNP-G	3,1 x 10 ⁻²⁹	At2g23930.1	AAP21306	CAB 214
Proteína ligante a Oligouridilato	3 x 10 ⁻¹⁸	At1g17370.1	CAB75429.1	CAB 214
Fator auxiliar ao U2 snRNP, subunidade maior	2,9 x 10 ⁻¹¹	At1g60830.1	CAA77135.1	CAB 214
Fator auxiliar ao U2 snRNP, subunidade maior	2,0 x 10 ⁻⁸	-	CAA77136.1	CAB 214
Fator de iniciação da translação de eucariotos (eIF4E)	6,7 x 10 ⁻¹³	At3g13920.1	CAA46188.1	CAB 214
Proteína da família Zinc finger (CCCH-type)	8,7 x 10 ⁻¹³	At3g51120.1	NP_190681.2	CAB 214
Proteína da família SART-1	8,1 x 10 ⁻⁰⁸	At5g16780.1	CAC01842.1	CAB 214
Proteína relacionada com a matrix nucleolar	6,4 x 10 ⁻²⁷	At5g05210.1	AAN28833.1	CAB 214
Família de proteína das Endoribonuclease L-PSP	8 x 10 ⁻²⁹	At3g20390.1	XP_478414.1	CAB 214
Transporte Celular				
Proteína 2a intrínseca na membrana plasmática	3,4 x 10 ⁻⁷	At3g53420.1	AAW55294.	ICS 39
Proteína 70 da endomenbrana	4,3 x 10 ⁻²⁷	At3g13772.1	BAB01926.1	ICS 39
Proteína receptora do lúmen do retículo endoplasmático	2,2 x 10 ⁻¹⁹	At3g25040.1	Q9ZTN2	CAB 214

Apêndice B - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de material suscetível (ICS 39) e resistentes inoculados (CAB 214) foram submetidos ao banco TAIR, NCBI e TIGR. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional.

(continuação)				
Anotação ^a	Valor <i>E</i> ^b	TAIR ^c	NCBI/TIGR ^c	Biblioteca
Proteína que se liga a fração pequena da GTP (RAN3)	8 x 10 ⁻³⁷	At5g55190.1	AAN31865.1	CAB 214
Processos biológicos desconhecidos				
Promotor de crescimento ligado à auxina	3,0 x 10 ⁻¹⁰	-	AAK84479.1	ICS 39
Subunidade da redutase do Citocromo C	5,0 x 10 ⁻¹³	-	CAA57768	ICS 39
Proteína com região repetida WD-40	2 x 10 ⁻¹⁶	At4g03020.1	AAN15676.1	ICS 39
Proteína específica do embrião	1,7 x 10 ⁻¹⁴	At2g41470.1	ABE79354.1	ICS 39
Proteína com domínio maf	6 x 10 ⁻¹⁴	At5g42770.1	XP_470606.1	ICS 39
Provável proteína inibidora da translação	9,5 x 10 ⁻¹⁴	At3g20390.1	XP_478414.1	ICS 39
Proteína transcrita	7,5 x 10 ⁻²⁰	At1g27350.1	AAQ09002.1	CAB 214
Produto protéico não nomeado	1,0 x 10 ⁻²⁴	-	CAA33557.1	ICS 39
Proteína transcrita	3,8 x 10 ⁻⁴	At2g42610.2	-	ICS 39
Proteína transcrita	1,1 x 10 ⁻¹³	At4g10060.1	AAX95400.1	ICS 39
Desconhecida	5,8 x 10 ⁻¹¹	At4g10300.1	AAM62609.1	ICS 39
Similar a <i>O-linked GlcNAc transferase</i>	9 x 10 ⁻⁶	At5g28220.1	CAC12882.1	ICS 39
Proteína desconhecida	2,4 x 10 ⁻⁴⁰	At3g62580.1	NP_567130.1	ICS 39
Proteína transcrita	8,4 x 10 ⁻²³	At5g40510.1	AAM62596.1	ICS 39
Proteína desconhecida	6,0 x 10 ⁻⁰⁴	-	BAD61297	ICS 39
Proteína desconhecida	5 x 10 ⁻¹⁷	At1g20430.1	AAL66899.1	ICS 39

Apêndice B - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de material suscetível (ICS 39) e resistentes inoculados (CAB 214) foram submetidos ao banco TAIR, NCBI e TIGR. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional.

Anotação ^a	Valor <i>E</i> ^b	TAIR ^c	NCBI/TIGR ^c	(conclusão)
				Biblioteca
Proteína desconhecida	7,1 x 10 ⁻⁵	At4g27450.1	AAM64968.1	CAB 214
Proteína 2A induzida sob submersão	1 x 10 ⁻⁴⁹	At4g14710.1	AAM63805.1	CAB 214
Proteína similar a <i>Pollen Ole e 1 allergen</i>	7 x 10 ⁻³¹	At4g08685.1	AAM78186.1	CAB 214
Proteína EIG-J7 induzida por elicitor	7,8 x 10 ⁻¹⁴	At4g39730.1	XP_467841.1	CAB 214
Proteína da família DJ-1	6,9 x 10 ⁻³¹	At1g53280.1	AAM60860.1	CAB 214
Proteína desconhecida	5,8 x 10 ⁻⁰⁹	At1g63310.1	BAC43465.1	CAB 214
Proteína desconhecida	9,1 x 10 ⁻²¹	At1g14450.1	XP_466277.1	CAB 214
Proteína contendo domínio de ligação metil-CpG	1,8 x 10 ⁻⁷¹	-	TC337	CAB 214
Proteína desconhecida	8,9 x 10 ⁻¹⁸	At3g59400.1	AAN13026.1	CAB 214
Proteína provável	1,5 x 10 ⁻⁰⁸	At4g01780.1	CAB77748.1	CAB 214

^a Provável identificação indicada no melhor *e-value* para seqüências de *A. thaliana* (TAIR), NCBI ou TIGR (EST de *T. cacao*).

^b Valores maiores que *e*⁻³ não foram considerados significativos.

^c Numero de acesso nos bancos de dados TAIR, Gene Bank ou TIGR (EST de *T. cacao*).

* Seqüências identificadas no bando de dados de EST de *T cacao* do TIGR

Apêndice C - Iniciadores para genes de referência (Act-Tc, Act-Cp e Tub-Cp) e genes alvos, escolhidos da biblioteca de SSH, utilizados na reação de RT-PCR quantitativo para estudo da expressão *in vitro* e inoculadas de *T. cacao*.

Primer	Tamanho Fragmento (pb)	Gene	Acesso NCBI	Sequência	
				<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
Act-Tc	172	Actina	TC46	TCCTCTTCCAGCCATCTCTC	TCTCCTTGCTCATTCCGGTCT
Act-Cp	273	Actina	-	CCACAATGGAGGACGAAGT CG	CCCGACATAGGAGTCCTTCT G
Tub-Cp	337	Tubulina	-	GTGAATTGGTCGCTAACAC G	CTCAGCAAATGTTTCGATGCT
Aspf13-CpN	286	Proteína alegênica Asp f 13	AAQ87930.1	TTCACAACGATTCCCAACCT	TTACAAGCCGCAGACAGAA C
88KD-CpN	104	Manoproteína imunoreativa 88 kDa	AAW41285. 1	TGCCATCAGGAATGATACG A	TCTCTTTGCTCCCCCTCAA
AS-CpN	205	Aril-sulfatase	AAW42619. 1	GTTGTTGGAGGCGAGATTG	GTATTGGAACGGTGGTTTG G
AK-CpN	100	Aldo-ceto redutase	XP_749025.1	CACGGTCGGATTTCATTAGG T	GACGGCGGGAACCTTGACT
P450-CpN	121	Provável CyP450 monoxigenase	XP383013.1	GGAGCAAGAGAAGGCGATT A	CTTCTGGGCTTCTGGGTACA
PAL-CpN	107	Fenilalanina amônio liase	CAA09013.1	CGATTTGAGGACCAATGAA CT	GCCACCTTACACGAAGAGG A
AAO-CpN	310	Aril-álcool oxidase	AAC72747.1	AGGTTGAAGGTATGCGGTT G	TGGGCTTGGGAATCTGTCT
Perox-CpN	269	Cloroperoxidase	CAC03461.1	GACCAATCGAAACCCCATC	TCTGGGATACGCTCCTCAAC

Apêndice D - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de *Crinipellis pernicioso* foram submetidos ao banco NCBI e MIPS. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional. Derivada de análise de ontologia gênica

continua

Anotação^a	Valor <i>E</i>^b	NCBI/MIPS^c	Organism	Unigenes
Metabolismo				
Precursor da Arilsulfatase	5.0 x 10 ⁻²¹	AAW42619.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Contig8*
2-nitropropano dioxigenase	3.0 x 10 ⁻⁴⁸	fg05919	<i>Fusarium graminearum</i>	CpN-1B07
Aldo-ceto redutase	1.0 x 10 ⁻²⁰	XP749025.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Contig12*
D-lactaldeído desidrogenase	4.0 x 10 ⁻¹¹	AAW43615.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Contig9*
Alfa-1.2-mannosil transferase	8.6 x 10 ⁻¹⁸	fg07370	<i>Fusarium graminearum</i>	Contig19*
Família da II 2-Ceto-3-deoxi-D-arabino-heptulose aldolase	2.0 x 10 ⁻⁵⁶	AAW42352.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CpN-2B02*
Fenilalanina amonio liase	5.0 x 10 ⁻⁸⁰	CAA09013.1	<i>Amanita muscaria</i>	Contig20*
O-acetil homoserine sulfidrilase	3.0 x 10 ⁻⁴⁴	CAC34631.1	<i>Pichia pastoris</i>	CpN-1B09
Fenilacetil-CoA ligase	2.0 x 10 ⁻¹⁵	XP753894.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	CpN-1G08*
Triacilglicerol lípase	5.0 x 10 ⁻⁰⁶	XP746588.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	CpN-2B10*
Esterase	6.0 x 10 ⁻⁰⁵	NP770641.1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CpN-2G11*
Rotas, facilitação e transporte celular				
Permease de amino ácido similar a indol	4.0 x 10 ⁻⁴¹	AAB61277.1	<i>Neurospora crassa</i>	CpN-1D12*
Transportador de peptídeo (PTR2A)	7.0 x 10 ⁻⁶²	AAZ32401	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	Contig14
Provável permease de Alantoina	8.0 x 10 ⁻³⁹	AAW46842.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CpN-2G06*
Provável permease de Alantoina	2.0 x 10 ⁻²⁰	AAW46842.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CpN-1B12*
Transportador de fosfato	8.0 x 10 ⁻⁷⁹	BAB43910.1	<i>Pholiota nameko</i>	CpN-2A02*
Transportador de íon metálico Cor A	6.0 x 10 ⁻⁰⁵	XP753391.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	CpN-1F09*

Apêndice D - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de *Crinipellis pernicioso* foram submetidas ao banco NCBI e MIPS. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional. Derivada de análise de ontologia gênica

(continuação)

Anotação^a	Valor <i>E</i>^b	NCBI/MIPS^c	Organism	Unigenes
NADPH2 desidrogenase	3.0 x 10 ⁻¹⁹	fg03262	<i>Fusarium graminearum</i>	CpN-2E05
1.4-Benzoquinona redutase	9.4 x 10 ⁻³⁴	fg01403	<i>Fusarium graminearum</i>	Contig4*
Clatrina	2.0 x 10 ⁻⁶⁰	AAW44707.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CpN-1A05*
SRP1	4.3 x 10 ⁻²⁸	um10699	<i>Ustilago maydis</i>	CpN-1D05*
Virulência, Defesa e Reposta Celular				
Proteína similar a Asp f 13	4.0 x 10 ⁻³⁰	AAQ87930.1	<i>Cochliobolus lunatus</i>	CpN-1E02*
Manoproteína imunoreativa de 88 kDa	1.0 x 10 ⁻⁶⁷	AAW41285.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CpN-2F10*
Síntese de proteína				
RpL 43B - 60S	2.1 x 10 ⁻²⁷	fg06757	<i>Fusarium graminearum</i>	CpN-2D07*
Proteína Ribossomal mitocondrial YML6	2.4 x 10 ⁻²⁶	fg09003	<i>Fusarium graminearum</i>	CpN-2F01*
Destinação Proteica				
Peptidilprolil isomerase	9.0 x 10 ⁻⁴⁶	AAH58369.1	<i>Mus musculus</i>	CpN-2E04*
Proteína 'Heat shock' pequena	9.0 x 10 ⁻²⁵	AAM78595.1	<i>Laccaria bicolor</i>	CpN-1A12*
Proteína "Heat shock"-Hsp20	9.0 x 10 ⁻⁰⁴	ZP00527347.1	<i>Solibacter usitatus</i>	CpN-1B04*
Destinação celular				
Provável proibitina	5.0 x 10 ⁻⁷⁹	AAT77148.1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	CpN-2D03*
Energia				
COX15	8.9 x 10 ⁻²³	fg08760	<i>Fusarium graminearum</i>	CpN-2F09*
Ciclo Celular e Processamento de DNA				
Histona H4.2	5.0 x 10 ⁻³⁸	CAA78838.1	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	CpN-1G04*
Componente do complexo 2 da Gama-tubulina	6.0 x 10 ⁻³⁴	AAW40876.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CpN-2H07*

Apêndice D - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de *Crinipellis perniciososa* foram submetidas ao banco NCBI e MIPS. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional. Derivada de análise de ontologia gênica

(continuação)

Anotação ^a	Valor <i>E</i> ^b	NCBI/MIPS ^c	Organism	Unigenes
Biogênese de Componentes Celulares				
O-metiltransferase	2.0 x 10 ⁻³³	ZP01195890.1	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	CpN-1E08*
Função biológica desconhecida				
Aril-álcool oxidase	1.0 x 10 ⁻²²	AAC72747.1	<i>Pleurotus eryngii</i>	CpN-1E10*
Aril-álcool oxidase	2.0 x 10 ⁻⁰⁴	AAC72747.1	<i>Pleurotus eryngii</i>	CpN-1G09
Aril-álcool oxidase	3.0 x 10 ⁻²⁷	AAC72747.1	<i>Pleurotus eryngii</i>	Contig17*
Aril-álcool oxidase	1.1 x 10 ⁻¹⁵	fg12161	<i>Fusarium graminearum</i>	Contig3
Ich1	2.0 x 10 ⁻¹¹	BAA32788.1	<i>Coprinopsis cinerea</i>	CpN-1F06
Citocromo P450	6.0 x 10 ⁻²²	BAA33717.1	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Contig13*
Versicolorina B sintase	5.5 x 10 ⁻¹⁰	fg12161	<i>Fusarium graminearum</i>	Contig25
Proteína hipotética UM06042.1	2.0 x 10 ⁻²⁹	UM06042.1	<i>Ustilago maydis</i>	CpN-1A02
O-metil-Esterigmatocistina oxidoreductase	1.0 x 10 ⁻¹⁰	fg12003	<i>Fusarium graminearum</i>	CpN-1B06*
Oxidoreductase	5.0 x 10 ⁻⁴⁹	fg03700	<i>Fusarium graminearum</i>	Contig15*
Proteína MGC81512	4.0 x 10 ⁻⁰⁵	AAH68851.1	<i>Xenopus laevis</i>	CpN-2H08*
Proteína hipotética	3.0 x 10 ⁻⁰⁸	XP961932.1	<i>Neurospora crassa</i>	CpN-2A12*
Proteína Bli 3	1.0 x 10 ⁻²¹	XP_962121.1	<i>Neurospora crassa</i>	CpN-1G12*
Proteína hipotética CNL05700	3.0 x 10 ⁻⁰⁷	AAW46587.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CpN-2G01
Proteína hipotética CNBM1020	7.0 x 10 ⁻³⁵	EAL17536.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CpN-1A10*
Metaloprotease 5	6.0 x 10 ⁻²⁰	AAN03640.1	<i>Trichophyton rubrum</i>	CpN-1C02*
Cloroperoxidase	8.0 x 10 ⁻⁴³	CAC03461.1	<i>Agaricus bisporus</i>	CpN-2B01*
Acyl-CoA desidrogenase	1.0 x 10 ⁻³⁵	ZP00837851.1	<i>Shewanella sp.</i>	CpN-1F08*
Proteína hipotética CNBA 7220	2.0 x 10 ⁻²⁶	EAL22954.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CpN-1A03

Apêndice D - Anotação e valores do BLASTX retornados quando as seqüências de unigenes representantes das bibliotecas de *Crinipellis pernicioso* foram submetidas ao banco NCBI e MIPS. As seqüências estão agrupadas de acordo com a classe funcional. Derivada de análise de ontologia gênica

(conclusão)

Anotação^a	Valor <i>E</i>^b	NCBI/MIPS^c	Organism	Unigenes
Proteína hipotética AN7069.2	7.0×10^{-17}	XP664673.1	<i>Aspergillus nidulans</i>	CpN-1A08*
Proteína hipotética conservada	3.0×10^{-14}	CAD73685.1	<i>Rhodopirellula baltica</i>	Contig16
Proteína hipotética CHGG_05529	4.0×10^{-36}	EAQ88910.1	<i>Chaetomium globosum</i>	CpN-1F10*
Proteína hipotética UM04978.1	3.0×10^{-08}	XP761125.1	<i>Ustilago maydis</i>	Contig24*
Proteína hipotética FG07643.1	7.0×10^{-37}	XP387819.1	<i>Gibberella zeae</i>	CpN-1C07*
Proteína hipotética	2.0×10^{-40}	XP366295	<i>Magnaporthe grisea</i>	CpN-2C02
Proteína hipotética	2.0×10^{-29}	XP503005.1	<i>Yarrowia lipolytica</i>	CpN-2D04*

^a Provável identificação indicada pelo menor *E-value* para seqüências de NCBI ou MIPS (*Ustilago maydis* ou *Fusarium graminearum*);

^b Valores $E > 10^{-4}$ não foram considerados significativos;

^c Numero de acesso nos bancos de dados Gene Bank ou MIPS (*Ustilago maydis*, um, ou *Fusarium graminearum*, fg);

*Seqüências identificadas no banco de dados Vassoura-de-Bruja.